

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5354823号
(P5354823)

(45) 発行日 平成25年11月27日(2013.11.27)

(24) 登録日 平成25年9月6日(2013.9.6)

(51) Int.Cl.	F I
C07K 16/18 (2006.01)	C O 7 K 16/18 Z N A
A61K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
A61P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00
A61P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10 I O I
G01N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53 V
請求項の数 9 (全 19 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2012-508894 (P2012-508894)	(73) 特許権者	500185689
(86) (22) 出願日	平成22年5月3日(2010.5.3)		セントロ ド インムノロジア モレキュ ラー
(65) 公表番号	特表2012-526056 (P2012-526056A)		キューバ国, シウダッド ド ラ ハバナ , プラヤ, アタベイ, カルレ 2 1 6 イ 1 5
(43) 公表日	平成24年10月25日(2012.10.25)	(74) 代理人	110000855
(86) 国際出願番号	PCT/CU2010/000002		特許業務法人浅村特許事務所
(87) 国際公開番号	W02010/127642	(74) 代理人	100066692
(87) 国際公開日	平成22年11月11日(2010.11.11)		弁理士 浅村 皓
審査請求日	平成23年12月14日(2011.12.14)	(74) 代理人	100072040
(31) 優先権主張番号	2009-0071		弁理士 浅村 肇
(32) 優先日	平成21年5月4日(2009.5.4)	(74) 代理人	100173473
(33) 優先権主張国	キューバ(CU)		弁理士 高井良 克己
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 スルファチド及び硫酸化プロテオグリカンを認識する抗体並びにその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

スルファチド及び/又は硫酸化プロテオグリカンに特異的に結合するモノクローナル抗体であって、

重鎖及び軽鎖の可変領域の相補性決定領域(CDR)の配列が、
重鎖

【化1】

HCDR1配列番号1 RYSVH
HCDR2配列番号2 MIWGGGSTDYNSALKS
HCDR3配列番号3 SGVRRGRAQAWFAY
軽鎖
LCDR1配列番号4 KASQDVSTAVA
LCDR2配列番号5 SASRYT
LCDR3配列番号6 QQHYSTPWT

10

である、

上記モノクローナル抗体。

20

【請求項 2】

重鎖及び軽鎖の可変領域内のフレームワーク領域の配列が、
重鎖

【化 2】

HFR1配列番号7 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL S
HFR2配列番号8 WVRQPPGKGLEWLG
HFR3配列番号9 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR
HFR4配列番号10 WGQGTLVTVSA

10

軽鎖

【化 3】

LFR1配列番号11 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC
LFR2配列番号12 WYQQKPGQSPKLLIY
LFR3配列番号13 GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYC
LFR4配列番号14 FGGGTKLELK

20

である、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 3】

定常領域の配列が、重鎖についてはヒト I g G 1 であり、軽鎖については C である、
請求項 2 に記載のモノクローナル抗体。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 に記載のモノクローナル抗体のいずれかを含む、医薬組成物。

【請求項 5】

薬学的に許容できる賦形剤をさらに含む、請求項 4 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

アジュバントをさらに含む、請求項 5 に記載の医薬組成物。

30

【請求項 7】

請求項 1 ~ 3 に記載のモノクローナル抗体のいずれかを含む、アテローム硬化性病変の
診断において有用な試薬キット。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 3 に記載のモノクローナル抗体のいずれかを含む、アテローム性動脈硬化症
の治療において有用な医薬組成物。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 3 に記載のモノクローナル抗体のいずれかを含む、イディオタイプワクチン
。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、スルファチド及び硫酸化プロテオグリカンを特異的に、且つ高い親和性で認識する、新規なモノクローナル抗体 (M A b) に関する。また、本発明は、本発明のモノクローナル抗体又はこれらの抗体に由来する断片を含む医薬組成物に関する。さらに、本発明は、本発明の A b 又はその断片を含む、心血管疾患の診断において有用な試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

30年を超える、マウスMAbを得るためのハイブリドーマ技術の開発(Koehler及びMilstein、Nature、256:495~497、(1975))の後、これらが疾病の診断及び基礎研究において非常に有用であることは明らかにされているが、ヒトの治療法に登録されているものは、わずか20のAbのみである(Pharmavitae、Monoclonal Abs Update、6~363、2008)。これは、主に、患者に注射された場合に、血液中におけるそれらの半減期が短いこと、並びに、これらのAbがマウス由来のものであるため、ヒトの免疫系による、及びさらに免疫応答による、マウスのエフェクター機能の認識が乏しいことに起因する(ヒト抗マウスAbの頭字語である、HAMAb応答)。いくつかの研究によって、外因性の抗体を投与した後に、患者において生じる免疫応答が非常に強く、初期治療後の抗体の治療上の有用性を大幅に解消し得ることが示されている。さらに、Khazaeli、M.B.ら、Journal of Immunotherapy 15:42~52(1994)の報告によると、患者にマウスMAbを投与した後、次に無関連のマウスAbを用いて治療することは、交差反応性のHAMAb応答に起因して、効果的でない可能性があるか、又はその上、危険であり得る。

10

【0003】

上記の情報から、容易に且つ経済的に得られ、治療用製剤の製造及び他の用途に適した、ヒトにおいて免疫原性の低い治療的Abの型を得ることが必要となる。Morrisson S.L.ら、Adv Immunol.、44:65~92(1989)。

【0004】

マウス又はラットから得られるAbをヒト化し、それによって、ヒトに注射された場合のこれらの外因性タンパク質に対する異種応答を低減させるための、いくつかの方法が開発されている。免疫原性を低減させるための第1の試みの1つは、マウスタンパク質の可変ドメインがヒト分子の定常ドメインに付着している「キメラ」Abを生成して、免疫原性の低減だけではなく、免疫エフェクター機能の活性化も達成することである。Morrisson S.L.ら、PNAS USA、81:6851~6855(1984)。これらのキメラ分子は、抗原の結合に関して元の抗体の特徴を維持しているが、その定常領域は免疫原性ではない(Estas moléculas quiméricas mantienen las características del anticuerpo original en relación con la unión al antígeno y su región constante no es inmunogénica)。これらのキメラ分子は、抗原の結合に関して元の抗体の特徴を維持しているが、その定常領域は免疫原性ではない。

20

30

【0005】

アテローム性動脈硬化症及びその結果は、世界人口に対する大きな影響力を有し、先進国における(Melian、A.ら、Am. J. Pathol.、155:775、1999)、また数年前からはキューバにおける(OMS、2004、Anuario Estadístico、MINSAP、2007)、罹患率及び死亡率の主な原因である。

【0006】

アテローム性動脈硬化症は、心筋及び脳の梗塞、壊疽、並びに手足の機能の喪失の病因の大きな一因となる、多因子性の慢性炎症性疾患である。Greaves、D.R.ら、Trends Immunol 22:180~181(2001); Ross、R.ら、Am Heart J 138(5 Pt 2):S419~20(1999)。

40

【0007】

アテローム性動脈硬化症の主な原因の1つは、高コレステロール血症である。動脈壁を通過している低分子量リポタンパク質(LDL)は、プロテオグリカンとの相互作用によって、動脈内膜の細胞外マトリクス内に捕捉され、酸化修飾を受ける。動脈内膜のプロテオグリカンに結合しているリポタンパク質は、それらのアテローム形成能力を増大させる、酸化及び酵素加水分解などの、脂質部分及びタンパク質部分の両方における変化を、より受けやすい。ApoB-100は、それを介してプロテオグリカンのグリコサミノグリ

50

カン鎖に結合し得る、複数の塩基性アミノ酸の存在を共通して有するいくつかの領域を含有する。Camejo, G., E.ら、*Atherosclerosis* 139:205~22、(1998); Chang, T.Y.ら、*Curr Opin Lipidol* 12:289~96(2001); Camejo, G., U.ら、*Atheroscler Suppl* 3:3~9(2002)。

【0008】

グリコサミノグリカン上の負の電荷の密度は、LDLとの相互作用に影響し、これには、硫酸化の程度が、LDLとプロテオグリカンとの相互作用に影響する。Sambandam T.ら、*Arterioascler Thromb*、11:561~568(1991)。

10

【0009】

さらに、酸化されたLDLは、マクロファージによって、これらの細胞の表面上のスカベンジャー受容体を介して内在化されて、細胞内でのコレステロールの蓄積をもたらし、その後、泡沫細胞を形成させ得る。これらの事象は、単球/マクロファージ、肥満細胞、樹状細胞、T細胞、及びNK Tの関与を伴う、炎症性応答を開始するための主なステップに相当する。Camejo, G.ら、*Atherosclerosis* 139(2):205~22(1998); Hurt-Camejo, E.ら、*Invest Clin* 42 Suppl 1:43~73(2001); Skalen, K., M.ら、*Nature* 417:750~754(2002)。

【0010】

20

マクロファージの表面上に存在するプロテオグリカンが、最終的には泡沫細胞の形成を生じさせる、酸化されたLDLのこれらの細胞への結合、及びこれらの粒子の内在化又は組み込みに関与することを実証する、実験的証拠が存在する。Halvorsen B.ら、*Biochem J*、331:743~752(1998)。

【0011】

抗血栓剤及び脂質低減剤の使用と組み合わせ、より健康なライフスタイルを送ることが、心血管系の事象の発症リスクの低減に対する影響を有していることは確かであるが、これらの戦略は、依然として、これらのリスクを完全に解消するには不十分である。

【0012】

上述したように、アテローム性動脈硬化症は、その発症において複数の抗原が重要である、多因子性の炎症性疾患であり、したがって、この疾患に対する、より優れた治療的影響を得ることを目的として、能動免疫療法及び受動免疫療法のための種々の戦略が開発されている。

30

【0013】

これらの戦略の1つは、HDL-コレステロールと心血管疾患との間の逆相関に起因する、HDLを増大させる治療法である。CETPは、HDLの代謝における鍵となる酵素であり、その活性が低減するとHDLのレベルが増大するため、治療法の潜在的な標的であると考えられる。CETPに結合し、その機能を阻害し得るAbを誘発するワクチンを用いる戦略は、WO1997/041227及びWO2006/133196において記載されている。しかし、CETP阻害剤であるトルセトラピブを用いる第III相臨床試験の失敗を示す最近の研究によって、この戦略について疑問が投げかけられている。Nicholls S.J.ら、*Circulation*、9、118:2506~14(2008); Hermann M.ら、*Curr Hypertens Rep*、11:76~80(2009)。

40

【0014】

一部の著者は、アテローム硬化性プラークの形成を阻害するための、酸化されたLDLを免疫原として用いたワクチンを記載している。Palinski W.ら、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:821~25(1995); Ameli S.ら、*Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 16:1074~79(1996); Freigang S.ら、*Arterioscl. Thromb*

50

. Vasc. Biol. 18: 1972~829 (1998); Zhou X.ら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21: 108~114 (2001); George J.ら、Atherosclerosis 138: 147~52 (1998); Fredrikson G.N.ら、Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 23: 879~884 (2003); US 2008/0070265 A1。

【0015】

別の戦略は、アテローム硬化性病変の形成を予防し得るか又は低減させ得る免疫応答を誘発することを目的とした、酸化されたアポリタンパク質C - IIIの特異的断片に基づいた予防用及び治療用ワクチンの開発である (WO 2001/064008、WO 2003/020765、WO 2004/080375、及びWO 2004/081045)。

10

【0016】

記載されている別のワクチンアプローチは、T細胞のアルファ/ベータ受容体と相互作用するAbを誘発してアテローム硬化性病変の形成を予防するための、MDA又は4 - HNEなどのアルデヒドにコンジュゲートしたペプチドに基づくものである (WO 2001/068119)。

【0017】

一部の著者は、アテローム硬化性プラークの発症を予防するための、アテローム性動脈硬化症における病原体に対するワクチンの重要性を唱えている (WO 1998/033510、US 006291437 B1、US 6471965 B1、US 006808713 B1)。

20

【0018】

食品コレステロールの摂取により生じるアテローム性動脈硬化症を遅らせるか、又はその重症度を低減させるための、別の提案された戦略は、ステロールに対するワクチンの使用である (US 2002/0018808 A1)。

【0019】

治療的ツールとしての受動免疫療法はまた、アテローム性動脈硬化症において重要な役割を有し得る。Apo B100の酸化された又は修飾された断片に対するヒトAbを用いることによる、アテローム性動脈硬化症を治療又は予防するための受動免疫化が、記載されている (US 005196324^a、US 2007/0098725 A1、US 2008/0075716 A1)。

30

【0020】

さらに、ホスホリルコリンに対する特異的Abでの受動免疫化が、アテローム性動脈硬化症を治療又は予防するための治療的組み合わせとして提案されている (US 2007/0286868 A1、US 2007/0122419 A1)。

【0021】

記載されている別の戦略は、ヒトM - CSFに特異的に結合するAb又は抗原結合断片の使用である (US 2007326414 B2)。

【0022】

血管内皮への単球の接着を予防し、それによりこれらの細胞による内皮及び周辺組織への侵入を予防するMAbの使用は、この疾患のための別の治療的アプローチである (US 005541296 A)。

40

【0023】

糖タンパク質IIb / IIIa受容体の阻害剤として、ひいては血小板凝集の阻害剤としてのモノクローナルAbの使用が記載されている (WO 1999/052551、US 005976532 A)。

【0024】

さらに、受動免疫療法において用いるために、ヒトモノクローナルAbが、CIIIアポリタンパク質の防御的ペプチドエピトープに対して得られた (WO 2004/081

50

046)。

【0025】

また、静脈内免疫グロブリン (I V I G) の使用は、抗アテローム効果を有し得る。U
d i Nら、Autoimmunity reviews 7 : 445 ~ 452 (200
8) 。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

低用量で投与された場合にアテローム硬化性病変の形成を阻害する能力及びこれらの硫
酸化分子に対する抗体応答を誘発する能力を有する、スルファチド及び硫酸化グリコサミ
ノグリカンと反応するか又はマクロファージ及びアテローム硬化性病変を認識するキメラ
M A b は、記載されていない。

10

【課題を解決するための手段】

【0027】

本発明は、硫酸化された、及び硫酸化プロテオグリカン又はそれらに由来する断片を認
識するように特徴付けされたモノクローナル A b に関する。

【0028】

本発明の抗スルファチド A b 及び抗硫酸化プロテオグリカン A b は、好ましくは、モノ
クローナルである。本発明の範囲内にはまた、本明細書において提供される抗スルファチ
ド A b 及び抗硫酸化プロテオグリカン A b の F a b 断片、F a b '、F a b ' - S H、及
び F (a b ') 2 などの A b 断片が含まれる。これらの A b 断片は、酵素消化などの従来
の手段によって生じさせることができるか、又は、組換え技術によって生産することがで
きる。これらの A b 断片は、キメラであり得るか又はヒト化されていてよい。これらの断
片は、本明細書において説明される診断的及び治療的目的に有用である。本発明はまた、
実質的に純粋な A b 及び断片の実施形態を含む。

20

【0029】

特定の実施形態において、本発明の A b は、重鎖及び軽鎖の可変領域の以下の配列によ
って特徴付けされる。

【0030】

重鎖：

30

【化1】

HCDR1配列番号1 RYSVH

HCDR2配列番号2 MIWGGGSTDYNSALKS

HCDR3配列番号3 SGVRRGRAQAWFAY

HFR1配列番号7 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL S

HFR2配列番号8 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3配列番号9 RLSISKDNSK SQVFLKMNSLQTDDTAMYYCAR

HFR4配列番号10 WGQGTLVTVSA

40

【0031】

軽鎖：

【化2】

LCDR1配列番号4 KASQDVSTAVA

LCDR2配列番号5 SASRYT

LCDR3配列番号6 QQHYSTPWT

LFR1配列番号11 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR2配列番号12 WYQQKPGQSPKLLIY

LFR3配列番号13 GVPDRFTGSGSGTDFFTISSVQAEDLAVYYC

LFR4配列番号14 FGGGTKLELK

10

【0032】

さらに、本発明の抗体は、重鎖についてはヒトIgG1の定常領域を、且つ軽鎖についてはヒトCを含む。

【0033】

本発明は、本発明の抗スルファチド抗体及び抗硫酸化プロテオグリカン抗体又はそれ由来する断片を含む、医薬組成物を含めた組成物を包含する。本明細書において用いられる場合、組成物は、スルファチド及び硫酸化プロテオグリカンに結合する1つ又は複数のAbを含む。

20

【0034】

これらの組成物は、さらに、緩衝溶液又はアジュバントを含めた薬学的に許容できる賦形剤などの適切な担体を含み得、これらは技術水準において周知である。

【0035】

別の実施形態において、本発明は、重鎖及び軽鎖の可変領域配列を以下に示すMAbを含む、医薬組成物に関する。

【0036】

重鎖：

【化3】

HCDR1配列番号1 RYSVH

HCDR2配列番号2 MIWGGGSTDYNSALKS

HCDR3配列番号3 SGVRRGRAQAWFAY

30

HFR1配列番号7 QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSL

HFR2配列番号8 WVRQPPGKGLEWLG

HFR3配列番号9 RLSISKDNSKSQVFLKMNSLQDDTAMYYCAR

HFR4配列番号10 WGQGTLVTVSA

40

【0037】

軽鎖：

【化4】

LCDR1配列番号4 KASQDVSTAVA

LCDR2配列番号5 SASYRYT

LCDR3配列番号6 QQHYSTPWT

LFR1配列番号11 DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC

LFR2配列番号12 WYQQKPGQSPKLLIY

LFR3配列番号13 GVPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYC

LFR4配列番号14 FGGGTKLELK

10

【0038】

第3の態様において、本発明は、本発明のA b又はそれに由来する断片の1つを含む、アテローム硬化性病変の診断において有用な試薬キットに関する。より特徴的には、試薬のセットは、上記の重鎖及び軽鎖の可変領域の配列を有するM A bを含む。

【0039】

さらなる態様において、本発明は、心血管疾患、特にアテローム硬化性病変の形跡を示す心血管疾患を治療するための、本発明のA bの使用に関する。

【図面の簡単な説明】

20

【0040】

【図1】抗S O 3キメラM A bによるスルファチドの認識を示す図である。様々な濃度の抗S O 3キメラM A b及びアイソタイプ対照キメラM A bを、スルファチドで被覆されたE L I S Aプレートに、メタノール内で4 μ g / m Lの濃度で添加した。反応性を、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトガンマ鎖抗血清で検出した。生成物の405 nmでの吸光度を、E L I S Aリーダーで定量した(* p < 0 . 0 5、マンホイットニーのU検定)。

【図2】抗S O 3キメラM A bによるヘパリンの認識を示す図である。様々な濃度の抗S O 3キメラM A b及びアイソタイプ対照キメラM A bを、ヘパリンで被覆されたE L I S Aプレートに、H B S S内で10 μ g / m Lの濃度で添加した。反応性を、アルカリホスファターゼにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトガンマ鎖抗血清で検出した。生成物の405 nmでの吸光度を、E L I S Aリーダーで定量した(* p < 0 . 0 5、マンホイットニーのU検定)。

30

【図3】抗S O 3キメラM A bによるJ 7 7 4細胞系の認識を示す図である。細胞を、10 μ g / m Lのビオチン化されたA bと共にインキュベートした。反応を、F I T Cにコンジュゲートしたヤギ抗ヒトI g G抗血清で顕在化させ、フローサイトメトリーによって分析した。

【図4】抗S O 3キメラM A bによるヒトのアテローム硬化性プラークの認識を示す図である。ホルマリン内に固定されパラフィン内に包埋された、ヒト大動脈の断片(4 μ m)を、ビオチン化された抗S O 3キメラA b及びアイソタイプ対照A bと共にインキュベートした。反応を、ストレプトアビジン - ペルオキシダーゼ複合体で顕在化させた。抗S O 3 - M A bによって認識されるエピトープを、濃い茶色で示し、細胞の核を、ヘマトキシリンで対比染色した(400 \times)。

40

【図5】抗S O 3キメラM A bで免疫化することにより誘発される、ヘパリンに対するA b応答を示す図である。抗S O 3キメラM A bを用いる免疫化スキームの0日目及び49日目にB A L B / cマウスから得られた血清試料を、E L I S Aによってアッセイした。各記号は、マウスの血清で得られた値である。p l及びh lは、それぞれ、免疫前及び過免疫である(* p < 0 . 0 5、マンホイットニーのU検定)。

【図6】ウサギのリポファンジンモデルにおけるアテローム硬化性病変の発症における、抗S O 3キメラM A bでの治療の効果を示す図である。異なる研究群の代表であるウサギ

50

胸部大動脈の組織学的切片。(A)群1、未治療動物、変化を伴わない、動脈の正常な構造を示す。(B)群2、リポファンジンで治療した動物、筋肉と弾性線維とコラーゲン線維との間での細胞外物質の蓄積、及び組織構造の歪みを伴う、動脈内膜の肥厚が観察される。(C及びD)群3、抗SO3キメラMAbで免疫化し、後にリポファンジンを投与した動物、明らかな組織の損傷又は内膜の肥厚は観察されなかった。ヘマトキシリン-エオシン染色、180x。

【発明を実施するための形態】

【0041】

抗体という用語は、全体を通して、MAbを言い、より特徴的には、マウスMAb又はキメラAbを言う。

10

【0042】

抗体の獲得：

全体を通して、本発明の抗スルファチドMAb及び抗硫酸化プロテオグリカンMAbは、天然の又は合成の由来源から得られた糖脂質抽出物で免疫化されたマウスから、Kohlerら、Nature、256：495(1975)において最初に記載されたハイブリドーマ法によって得ることができる。免疫化されたマウスから得られる脾臓細胞を、骨髄腫細胞P3.X63Ag8.6.5.3と融合し、記載された選択培地において培養し、ELISAによる培養物の上清における免疫グロブリンの検出によって生産クローンを選択する。

【0043】

20

所望の特異性、親和性、及び/又は活性を有するAbを生産するハイブリドーマ細胞を同定した後、Ab生産クローンを、限界希釈手順によってサブクロニングすることができる、細胞培養物を成長させる標準的な方法によって成長させることができる(Goding、Monoclonal Abs: Principles and Practice、59~103頁(Academic Press、1986))。この目的に適した培養培地には、例えば、D-MEM培地又はRPMI-1640培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、腹水腫瘍の形で、動物においてインビボで成長させることができる。

【0044】

サブクローンによって分泌されるMAbを、免疫グロブリンを精製するための従来の手順、例えば、タンパク質A-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーによって、培養培地、腹水、又は血清から適切に分離する。

30

【0045】

本発明のAbはまた、マウスの免疫グロブリン遺伝子を適正に操作する遺伝子操作技術によって得ることができる。例えば、本発明のキメラAbは、技術水準において記載されているもの、例えばSambrookら、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、N.Y. Current Protocols in molecular biology (F.M. Ausubelら編、(2003)); la serie Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A practical approach (M.J. MacPherson、B.D. Hames、及びG.R. Taylor編(1995))、Harlow及びLane編(1988) ABS, A laboratory manual, y Animal cell culture (R.I. Freshney編(1987))において記載されているものの中でも、増幅、クローニング、遺伝子配列決定、及び消化などの、遺伝子を操作するための従来の技術によって、マウスモノクローナルAbを生産する細胞から精製されるRNAから得ることができる。

40

【0046】

50

A bの可変領域のcDNA合成及びPCR増幅(ポリメラーゼ連鎖反応の頭字語)は、マウスAbをコードするRNAから実施することができ、cDNAを合成し、VK及びVHの可変領域をPCRによって増幅し、これは、技術水準における目的のために記載された従来技術に従って行うことができる。

【0047】

重鎖及び軽鎖のそれぞれについてのPCR産物を、それぞれ、遺伝子配列決定に用いるベクター内にクローニングする。得られたクローンを、この目的のために記載された方法のいずれかを用いて、例えば、製造者の仕様書に従ってT7 DNAポリメラーゼを用いるジデオキシヌクレオチド法を用いて、配列決定する。

【0048】

重鎖の可変領域VH及び軽鎖の可変領域VKの遺伝子を、中間構築物の酵素制限によって得、キメラ遺伝子を構築するための従来技術に従って、それぞれの発現ベクター内にクローニングする。このような目的のためには、組換えタンパク質、特にMAbの効率的な発現のために記載されたいずれのベクターも有用である。

【0049】

キメラAbの発現のために、NS0細胞を用いることができ、これに、Ab遺伝子を含有するそれぞれの発現ベクター内のDNA構築物をエレクトロポレーションする。これらの細胞を選択培地内で成長させる。免疫グロブリン生産クローンの検出を、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)を用いる、培養物の上清における測定によって実施する。

【0050】

所望の特異性及び機能を有するAbの選択:

特定の実施形態において、本発明のAbは、技術水準における、この目的のために記載された様々な技術によって、例えばELISAによって検出することができる。

【0051】

本発明の特定の実施形態において、生産されるAbの生物学的活性が分析される。いくつかの実施形態において、本発明のAbを、それらの抗原結合活性について試験する。

【0052】

特殊性で知られており、且つ本明細書において用いられ得る、抗原結合アッセイには、とりわけ、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA、二重抗体免疫アッセイ(サンドイッチ)、免疫沈降アッセイ、蛍光免疫アッセイ、及びタンパク質A免疫アッセイなどの技術を用いる、直接的結合アッセイ又は競合的結合アッセイが含まれる。抗原結合についての例示的なアッセイは、実施例の節において、後に含まれる。

【0053】

さらに、本発明において、ヒト大動脈組織切片におけるアテローム硬化性プラークを認識し得るAbを生産するクローンを同定することができ、これは、技術水準における、記載されている従来技術免疫組織化学的技術を用いて行うことができる。

【0054】

別の態様において、本発明のAbによる、マウスにおける抗ヘパリン応答を誘発する能力を測定することができる。このためには、異なる群の動物を本発明のAbで免疫化し、これらの動物の血清試料を、抗ヘパリンAbの存在について試験する。

【0055】

さらなる態様において、本発明のAbの抗アテローム硬化性効果を測定することができ、このために、リポファンジンを用いる、ウサギにおけるアテローム硬化性病変の誘発モデルを用いることができる。(Takacs E、Harsing J、Fuzesi S、Jellinek H. 1986、「リポファンジンの投与後のウサギにおけるアテローム性動脈硬化症の発症(Arteriosclerosis developing in rabbits after lipofundin administration)」、Morphol Igazsagugyi Orv Sz. 26:99~105; Noa M及びMas R(1992)。「アテロミクスルと、リポファンジンを用いて誘発されるウサギにおけるアテローム硬化性病変(Ateromixoly

10

20

30

40

50

lesion aterosclerótica en conejos inducida por lipofundin.)」、Progresos en Ciencias Medicas、6:14~19)。

【0056】

医薬組成物：

1つの実施形態において、本発明は、1つ又は複数の本発明のAbを含む医薬組成物を提供する。1つの実施形態において、抗体を含む組成物はさらに、薬学的に許容できる賦形剤を含む。

【0057】

1つの態様において、本発明は、1つ又は複数の本発明のAbを含み、且つさらに緩衝溶液を含み得る、試薬キットを提供する。1つの実施形態において、溶液緩衝液は薬学的に許容できるものである。1つの実施形態において、Abを含む組成物はまた、担体分子を含み、この担体分子は、いくつかの実施形態において、薬学的に許容できるものである。1つの実施形態において、試薬キットはまた、組成物の投与又は使用(例えば、対象へのAb)のための指示を含む。

10

【0058】

本発明のAbを含む医薬組成物は、それらの保存のために、所望の程度の純度を有するAbと担体分子、場合による賦形剤、又は生理学的に許容できる安定剤(Remington: The Science and Practice of Pharmacy 第20版(2000))とを混合することによって、水性溶液、凍結乾燥物、又は他の凍結乾燥された製剤の形態で調製される。許容できる媒体、賦形剤、又は安定剤は、採用される全ての用量及び濃度でレシピエントにとって無毒である。

20

【0059】

本発明のMAbは、意図された目的のために効果的な量で組み合わされて、医薬組成物内に存在する。

【0060】

インビボで投与するための製剤は、無菌でなくてはならない。これは、滅菌濾過膜を介した濾過によって達成される。

【0061】

1つの態様において、本発明は、心血管疾患などの障害の治療的及び/又は予防的治療のための薬剤の調製における本発明のAbの使い方を示す。

30

【0062】

本発明のAbは、アテローム硬化性病変を治療するため、阻害するため、進行を遅らせるため、発病を予防する/遅らせるため、1つ又は複数の抗原性分子の発現及び/又は活性に関連する疾患、障害、又はプロセスを改善又は予防するために用いることができる。

【0063】

本発明に従うと、これらのAbの治療的用量は、1投与当たり10マイクログラムから10mgの間にわたり、好ましくは1投与当たり100マイクログラムから1mgの間にわたる。

【0064】

本発明のMAb(単数又は複数)は、非経口経路、皮下経路、腹腔内経路、肺内経路、及び鼻腔内経路を含む、且つ、局所的治療のために所望により病変内経路を含む、あらゆる適切な手段によって投与される。

40

【0065】

別の態様において、本発明は、心血管疾患などの障害を診断するための試薬キットを提供する。

【実施例】

【0066】

以下の実施例は、本発明の範囲を限定することなく、本発明を例示することを意図したものである。

50

【 0 0 6 7 】

以下の実施例において、用いられる全ての制限酵素又は修飾酵素並びに試薬及び材料は、別段の特定がない限り、市販の由来源から得た。

【 0 0 6 8 】

(例 1)

抗 S O 3 キメラ M A b によるウシ脳スルファチドの認識

E L I S A を用いて、P o l y S o r p プレート、N u n c を、メタノール内で $4 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度の、 $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ のウシ脳スルファチド溶液で被覆し、溶媒を、 37°C で 90 分間にわたりインキュベートすることによって蒸発させた。次に、プレートを、1 % ウシ血清アルブミン (S A B) を含有する $200 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ のリン酸緩衝生理食塩水 (P B S) で、室温で 1 時間にわたりブロックした。その後、P B S 内で異なる濃度の、 $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ の抗 S O 3 キメラ抗体を添加し、 37°C で 1 時間にわたりインキュベートした。次に、プレートを P B S で洗浄し、 $50 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ の、アルカリホスファターゼ (S i g m a) にコンジュゲートしたヤギ抗ヒトガンマ鎖抗血清を添加した。プレートを 37°C で 1 時間にわたりインキュベートした後、それを再び洗浄し、ジエタノールアミン緩衝液 (p H 9 . 8) 内の $1 \text{mg} / \text{mL}$ の p - ニトロフェニルホスフェートからなる、 $100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$ の基質溶液を添加した。室温で 30 分間インキュベートした後、反応生成物の吸光度を E L I S A リーダーで 405nm で測定した。

10

【 0 0 6 9 】

陰性対照として、抗 S O 3 キメラモノクローナル抗体の 98 位で重鎖の可変領域の R を S で置き換えることによって改変されたキメラ M A b を用いた。図 1 は、異なるキメラ M A b のスルファチドに対する反応性を示す。グラフは、抗 S O 3 キメラモノクローナル抗体が、わずか $0.01 \text{mg} / \text{mL}$ の濃度でもスルファチドを認識することを示す。逆に、98 位で改変されたキメラ M A b はいずれの反応性も示さない。

20

【 0 0 7 0 】

(例 2)

ヘパリン認識試験

次に、抗 S O 3 キメラモノクローナル抗体が、スルファチドよりも複雑な硫酸化分子を認識するかどうかを評価した。この研究のために、硫酸化グリコサミノグリカンのモデルとして用いられる、高度に硫酸化された分子であるヘパリンを選択した。

30

【 0 0 7 1 】

抗ヘパリン反応性のためのアッセイは、わずかに変更した、S k a l e n , K . M . ら (N a t u r e 417 : 750 ~ 754, 2002) により開発された、ビグリカンのための E L I S A 技術に基づいて行った。M a x i s o r p マイクロタイタープレート (N u n c) を、H e p e s 緩衝生理食塩水 (H B S S) (20mM の H e p e s, 150mM の N a C l, p H 7 . 4) 内で $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ($100 \mu\text{L} / \text{ウェル}$) のヘパリン (S i g m a) で被覆し、 4°C で一晩インキュベートした。プレートを H B S S で 3 回洗浄し、次に、1 % S A B を含有する H B S S (H B S S - B S A) で、室温で 1 時間にわたりブロックした。プレートを 0 . 0 2 % の H B S S - T w e e n 20 (H B S S - T) で 3 回洗浄し、室温で 1 時間の間、結合緩衝液 (10mM の H e p e s, 20mM の N a C l, 2mM の C a C l 2, 2mM の M g C l 2, p H 7 . 4) 内で $40 \mu\text{g} / \text{mL}$ の初期濃度から、抗 S O 3 キメラモノクローナル抗体の連続希釈物を添加した。陰性対照として、抗 S O 3 キメラモノクローナル抗体の 98 位で重鎖の可変領域の R を S で置き換えることによって改変されたキメラ A b を用いた。プレートを H B S S - T で 2 回洗浄し、次に、0 . 1 % S A B を含有する H B S S - T 内で、アルカリホスファターゼ (S i g m a - A l d r i c h, U S A) にコンジュゲートしたヤギ抗ヒトガンマ鎖抗血清と共に、室温で 1 時間にわたりインキュベートした。所要の洗浄を行い、ジエタノールアミン緩衝液 (p H 9 . 8) 内に溶解した基質 p - ニトロフェニルホスフェートを用いて、反応物を発色させた。生成物の 405nm での吸光度を、E L I S A リーダー (O r g a n o n T e k n i c a, A u s t r i a) で定量した。

40

50

【0072】

図2に示すように、抗SO3キメラモノクローナル抗体は、ヘパリンに対する高い反応性を有していた。逆に、アイソタイプ対照として用いた改変されたキメラAbは、研究した濃度のいずれにおいても反応性を示さなかった。

【0073】

(例3)

フローサイトメトリーによるJ774細胞系の認識

単球及びマクロファージは、アテローム性動脈硬化症などの炎症性プロセスにおいて重要である(Osterud B Bjorklid E. *Physiol Rev* 83: 1069~1112, 2003)。これらの細胞はプロテオグリカンを合成し、マクロファージによる、酸化されたLDLを泡沫細胞の形成に組み込むための手段のいくつかが、細胞膜のプロテオグリカンを伴うことが示されている(Halvorsen Bら、*Biochem J*. 331: 743~752, 1998)。

10

【0074】

抗SO3キメラAbがマクロファージを認識し得るかどうかを決定するために、本発明者らは、8%ウシ胎児不活化血清(SFT, Gibco)、2mMのL-グルタミン、100U/mLのペニシリン、100µg/mLのストレプトマイシンを補ったDMEM-F12(Gibco BRL, Paisley, Scotland)において培養したマウスマクロファージ細胞系J774を用いて、フローサイトメトリー実験を実施した。

【0075】

細胞(1試験管当たり 0.5×10^6 個)を、20µL/試験管の不活化ウサギ血清と共に37で10分間にわたりインキュベートして、Fcガンマ受容体をブロックした。その後、氷浴内で30分間にわたり、1%ウシ血清アルブミン(Sigma, St. Louis, MO)及び0.01%アジ化ナトリウムを含有するPBS(pH7.4)内で10µg/mLで、共にビオチン化された抗SO3キメラMAb及びアイソタイプ対照である改変されたキメラAbを添加した。細胞を洗浄した後、これらを、1/200希釈のストレプトアビジン-フルオレセインイソチオシアネート複合体(Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA)と共に、氷浴内で30分間にわたりインキュベートした。細胞を洗浄し、1%アジ化ナトリウムを含有するPBS内に再懸濁し、フローサイトメーター(Becton-Dickinson, San Jose, CA)で分析した。

20

30

【0076】

図3に示すように、アイソタイプ対照として用いたキメラAbは、細胞系J774を認識しなかった。逆に、抗SO3キメラAbは、細胞の93.7%を認識した。

【0077】

(例4)

ヒト大動脈におけるアテローム硬化性プラークの認識

抗SO3キメラAbの認識の免疫組織化学的決定を、ホルマリン内に固定しパラフィン内に包埋したヒト大動脈の断片で実施した。4µmの組織切片を用い、それをシラン処理したスライド上に載せ、68で12時間にわたりインキュベートした。組織切片をキシロール内で脱パラフィンし、濃度を低減させていったエタノール内で水和させた。次に、それを蒸留水内で5分間にわたり洗浄し、PBS内で洗浄した。100の温度に設定した恒温槽を用いて、抗原の賦活化を行った。シトレート緩衝液(pH6.0)内に浸したプレートを槽内に30分間にわたり維持し、次に、電子レンジを用いて、シトレート緩衝液(pH6.8)内で10分間にわたり沸騰した。スライスを20分間にわたり放置して冷却し、次に、蒸留水及びPBSで洗浄した。内因性ペルオキシダーゼを、3%H₂O₂溶液で、室温で10分間にわたり阻害し、PBSで洗浄し、ビオチン化された抗SO3キメラAb及びアイソタイプ対照Abを、50µg/mLの濃度で、室温で30分間にわたり添加した。後に、スライドをPBSで洗浄し、ストレプトアビジン-ペルオキシダーゼ複合体(Anacrom Diagnostics)を同一の時点及び温度で添加した。

40

50

最後に、組織切片を、1 mLの基質緩衝液内の3, 3'-ジアミノベンジジン(DAB)の新鮮な混合物溶液と共に、3から5分間にわたりインキュベートした。対比実験を、Mayerのヘマトキシリンを用いて実施し、試料を、増大させていったアルコール濃度内で脱水し、キシロール内で透徹し、最後に、永久的な媒質プレートであるEukitt(Kinder GmbH & Co.)内に載せた。白色光のマイクロスコープ(Leica)を用いて評価を行った。

【0078】

図4は、抗SO3キメラAbが、大動脈内に存在するアテローム硬化性病変の試料といかに強く反応したかを示す。脂質を有するマクロファージ又は泡沫細胞との反応性、及び病変の脂質コアとの反応性が観察された(反応性は、濃い茶色で示されている)。この図は、アイソタイプ対照として用いたAbがいかにヒト大動脈切片を認識しなかったかを示す。

10

【0079】

(例5)

抗SO3キメラAbによるマウスにおける抗ヘパリン応答を誘発する能力

BALB/c雌マウスを用いた。これらに、200 µL内の50 µgの抗SO3キメラAbを皮下投与した。免疫化は、全4回の投薬を完了するまで、14日ごとに行った。抗SO3キメラAbは、アジュバント又は担体タンパク質を伴わずに投与した。血清試料を0日目及び49日目(4回目の投薬の7日後)に採取した。

【0080】

20

免疫化した動物の血清における抗ヘパリンAbの存在を、ヘパリン(10 µg/mL、100 µL/ウェル)で被覆したMaxisorpプレートを用いる、例2において記載したELISA技術を用いて測定した。マウスの血清を、結合緩衝液内での1/100希釈、100 µL/ウェルで試験した。二次抗体として、アルカリホスファターゼ(Jackson)にコンジュゲートしたヤギ抗マウスIgG抗血清及びIgM抗血清を用いた。

【0081】

図5は、0日目及び49日目に採取したマウス血清でのアッセイの結果を示す。いずれの動物においても、免疫前血清(0日目)においては抗ヘパリンAbの存在は検出されなかった。逆に、マウスを抗SO3キメラAbで免疫化した後、これらの血清Abの存在は検出された。この結果は、抗SO3キメラAbが、ヘパリンを強力に認識するだけでなく、この分子に対する応答を誘発する驚くべき能力(ワクチン効果)を有することを示す。

30

【0082】

(例6)

抗SO3キメラAbの抗アテローム硬化性の効果

抗SO3キメラAbがインビボで生物学的効果をもたらし得るかどうかを評価するために、本発明者らは、以前に記載されている、リポファンジンを用いる、ウサギにおけるアテローム硬化性病変の誘発モデルを用いた(Takacs Eら、Morphol Igazsaguyi Orv Sz. 26:99~105、1998; Noa M&R. More Progress in Medical Sciences、6:14~19、1992)。

40

【0083】

各5頭からなる3つの群に分けられた15頭のニュージーランドウサギを用いた。群1には治療は行わなかった(陰性対照)。群2には、8日間にわたり毎日、1 kg当たり2 mLの20%リポファンジン(Braun)を静脈内投与した。群3には、PBS内の100 µgの抗SO3キメラAbを、7日間の間隔で3回皮下投薬し、最後の免疫化の日に、群2の動物において用いたものと同じスキームで、リポファンジンの毎日の投与を開始した。全てのウサギを、リポファンジンを最後に投薬した1日後に麻酔下で屠殺し、群1の陰性対照動物を、同一の日に屠殺した。大動脈を動物から採取し、巨視的及び微視的なアテローム硬化性病変の存在を決定するための病理学的研究を行った。

50

【 0 0 8 4 】

治療を行わなかった群1のウサギの大動脈は、肉眼的な病変を示さなかった。1kg当たり2mLのリポファンジン8日間をわたり投与した群2のウサギから得られた全ての大動脈において、肉眼的な病変が観察された。予め抗SO3キメラAbを3回投薬し、次にリポファンジンを投与したウサギの大動脈においては、巨視的な病変はなかった。

【 0 0 8 5 】

微視的な病変の研究のために、大動脈の断片をホルマリン内で固定し、パラフィン内に包埋した。4μmの組織切片を用い、シラン処理したスライド上に載せ、ヘマトキシリン-エオシンで染色した。白色光の顕微鏡(Leica)を用いて評価を行った。

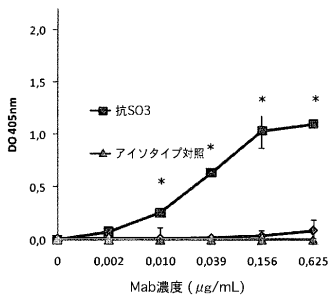
10

【 0 0 8 6 】

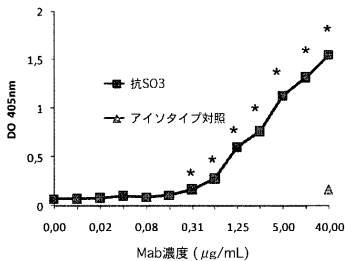
治療を行わなかったウサギの大動脈の組織切片を評価すると、図6に示すように、全てが、変化を伴わない、動脈の正常な構造を示した。リポファンジンを投与した群の全てのウサギから得られた大動脈切片において、筋肉と弾性線維とコラーゲン線維との間での細胞外物質の蓄積、及び組織構造の歪みを伴う、内膜の肥厚の存在という、特徴的な病変が観察された。逆に、抗SO3キメラAbを3回投薬し、次にリポファンジンを投与した3頭のウサギから得られた試料においては、微視的な病変は観察されなかった。残りの2頭のウサギの組織から得られた試料においては変化が観察され、変化は、線維間での細胞外物質の蓄積を伴う、動脈壁のいくつかの区域におけるいくつかの個別の肥厚にあった。内膜の肥厚はなかった。

20

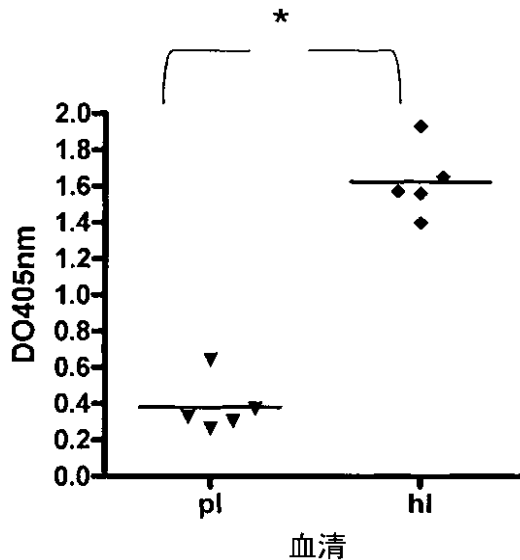
【 図 1 】



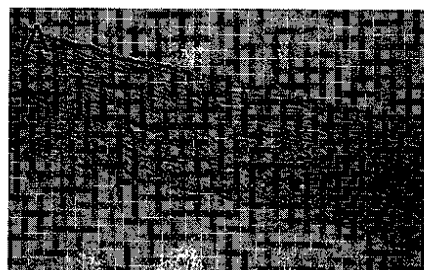
【 図 2 】



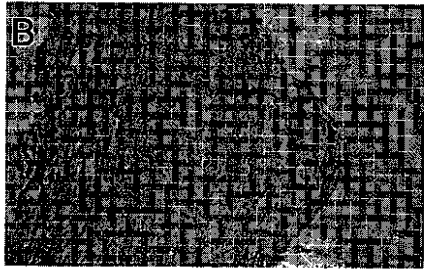
【 図 5 】



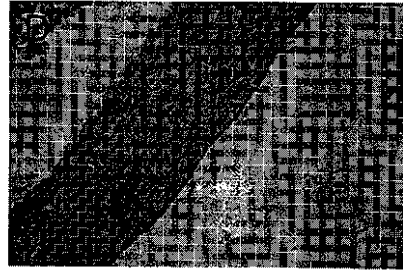
【 図 6 A 】



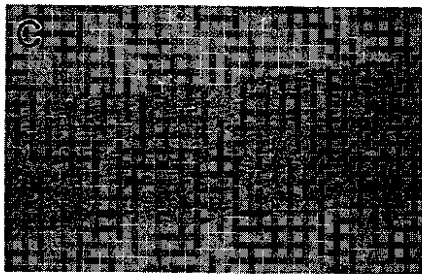
【図 6 B】



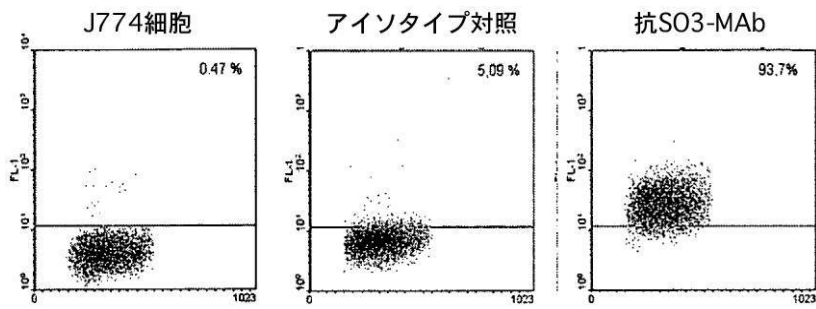
【図 6 D】



【図 6 C】



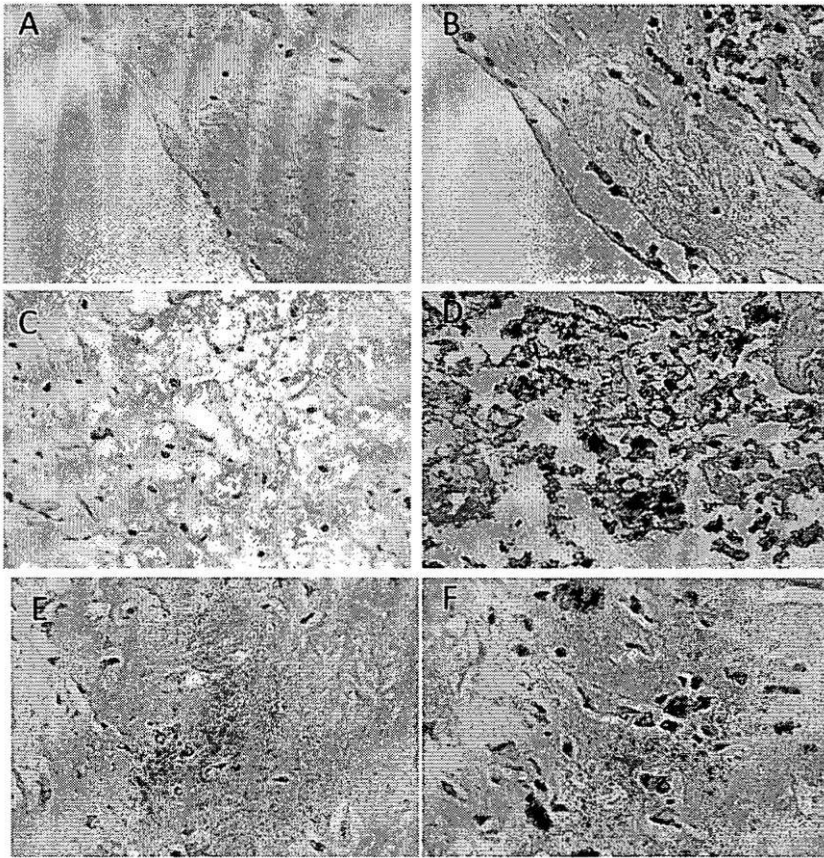
【図 3】



【図4】

アイソタイプ対照MAb

抗SO3-MAb



【配列表】

0005354823000001.app

フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/577 (2006.01) G 0 1 N 33/577 B
 C 1 2 P 21/08 (2006.01) C 1 2 P 21/08
- (74)代理人 100102897
 弁理士 池田 幸弘
- (72)発明者 マテオ デ アコスタ デル リオ、クリスティーナ マリア
 キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、ハバナ、アルタハバナ、カレ セ 9 5 1 0 エント
 レ 6 イ 1 0
- (72)発明者 バスケス ロベス、アナ マリア
 キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、ハバナ、マイア ロドリゲス 4 5 5 エントレ
 カルメン イ パトロッチーニョ
- (72)発明者 ロベス レケーナ、アレハンドロ
 キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、ハバナ、ユアン ブルーノ ザイアス 4 6 0 アパ
 ルトメント 8 エントレ カルメン イ パトロッチーニョ
- (72)発明者 フェルナンデス マツレロ、ユニエル
 キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、セントロ ハバナ、ラグナス ヌメロ 1 1 5 アパ
 ルトメント 1 エントレ カンパナリオ イ、マンリケ
- (72)発明者 ソートー ロベス、ヨスデル
 キューバ国、ラ ハバナ、アブニユ 2 4 1 ヌメロ14632 エントレ 1 4 6 イ 1 4 8
 バウタ
- (72)発明者 ブリトー ナバッコ、ビクター
 キューバ国、シウダッド ド ラ ハバナ、プラヤ、カレ 1ラ エディフィシオ 2 アパルト
 メント 1 1 エントレ 1 8 4 イ 1 8 6、リパルトミエント フロレス

審査官 榎引 明佳

- (56)参考文献 特開2007-204473(JP,A)
 特表2004-528033(JP,A)
 特表2010-504743(JP,A)
 Nakashima Y et al, Cardiovascular Research, 2008年, 79, P14-23
 Radhakrishnamurthy B et al, Atherosclerosis, 1993年, 98, p179-192
 LARK M W, ARTERIAL CHONDROITIN SULFATE PROTEOGLYCAN:LOCALIZATION WITH A MONOCLONAL ANT
 IBODY, THE JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY:OFFICIAL JOURNAL OF THE HISTOCHE
 MISTRY SOCIETY, 1988年10月, V36 N10, P1211-1221
 SOBUE M, PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF MONOCLONAL ANTIBODY TO DERMATAN SULFATE PR
 OTEOGLYCAN, JOURNAL OF HISTOCHEMISTRY AND CYTOCHEMISTRY, 1988年, V36 N5, P479-486
 LOPEZ-REQUENA A, CHIMERIC ANTI-N-GLYCOLYL-GANGLIOSIDE AND ITS ANTI-IDIOTYPIC MABS, HYB
 RIDOMA AND HYBRIDOMICS, 米国, 2003年 8月, V22 N4, P235-243, IMMUNODOMINANCE OF T
 HEIR VARIABLE REGIONS

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K 1 6 / 1 8
 A 6 1 K 3 9 / 3 9 5
 A 6 1 P 9 / 0 0
 A 6 1 P 9 / 1 0
 G 0 1 N 3 3 / 5 3
 G 0 1 N 3 3 / 5 7 7

C12P 21/08
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
UniProt/GeneSeq
CAplus/REGISTRY(STN)