



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112041349 A

(43) 申请公布日 2020.12.04

(21) 申请号 201980029116.9

(22) 申请日 2019.03.01

(30) 优先权数据

2018-036933 2018.03.01 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2020.10.29

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2019/008202 2019.03.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/168176 JA 2019.09.06

(71) 申请人 国立大学法人广岛大学

地址 日本广岛

(72) 发明人 横崎恭之 西道教尚

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理有限公司 11728

代理人 尹吉伟

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

A61P 1/18 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 13/12 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

权利要求书3页 说明书26页

序列表16页 附图10页

(54) 发明名称

抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体及其应用

(57) 摘要

提供一种能够治疗纤维化疾病的新型抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体。本发明的一个方面为抑制整合素 $\alpha 11$ 与胶原蛋白的结合的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体。

可变区序列

VH AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKGSGFTFSSYGMQWVRQAPGRGLEWV
AGIDDDGSFTLYGAAVDGRATISRDNQGTTVRLQLSDLRAEDTATYFCAK
GGYGWCWYGDAACIDAWGHGTEVIVSS

VL AVTQPSSVSANPGETVKITCSGGSDSWYGWYQQKSPGSAPVTVIYSNNO
RPSNIPSRFSGSTSGSTSTLTITGVQADDEAVYFCGSRDSSYDGIFGAGT
TLTVLK

— CDR1
..... CDR2
- - - - CDR3

1. 一种抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其抑制整合素 $\alpha 11$ 与胶原蛋白的结合。
2. 根据权利要求1所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其具有选自由细胞粘附抑制活性和细胞剥离活性组成的组中的至少一种活性。
3. 根据权利要求1或2所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其与整合素 $\alpha 11$ 特异性结合。
4. 根据权利要求1~3中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其与不同种类的多种哺乳动物来源的整合素 $\alpha 11$ 特异性结合。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其包括:
 - (a) 为以下 (a1) ~ (a3) 中任一种的重链可变区CDR1:
 - (a1) 由以序列号1所示的氨基酸序列构成的多肽;
 - (a2) 一种多肽,其由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR1的功能;
 - (a3) 一种多肽,其由与序列号1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR1的功能;
 - (b) 为以下 (b1) ~ (b3) 中任一种的重链可变区CDR2:
 - (b1) 由以序列号2所示的氨基酸序列构成的多肽;
 - (b2) 一种多肽,其由在序列号2所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR2的功能;
 - (b3) 一种多肽,其由与序列号2所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR2的功能;
 - (c) 为以下 (c1) ~ (c3) 中任一种的重链可变区CDR3:
 - (c1) 由以序列号3所示的氨基酸序列构成的多肽;
 - (c2) 一种多肽,其由在序列号3所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR3的功能;
 - (c3) 一种多肽,其由与序列号3所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR3的功能;
 - (d) 为以下 (d1) ~ (d3) 中任一种的轻链可变区CDR1:
 - (d1) 由以序列号4所示的氨基酸序列构成的多肽;
 - (d2) 一种多肽,其由在序列号4所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR1的功能;
 - (d3) 一种多肽,其由与序列号4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR1的功能;
 - (e) 为以下 (e1) ~ (e3) 中任一种的轻链可变区CDR2:
 - (e1) 由以序列号5所示的氨基酸序列构成的多肽;
 - (e2) 一种多肽,其由在序列号5所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR2的功能;
 - (e3) 一种多肽,其由与序列号5所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR2的功能;以及
 - (f) 为以下 (f1) ~ (f3) 中任一种的轻链可变区CDR3:
 - (f1) 由以序列号6所示的氨基酸序列构成的多肽;

(f2) 一种多肽,其由在序列号6所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR3的功能;

(f3) 一种多肽,其由与序列号6所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR3的功能。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的抗整合素 α 11单克隆抗体,其包括:

(g) 为以下(g1)~(g3)中任一种的重链可变区:

(g1) 由以序列号7所示的氨基酸序列构成的多肽;

(g2) 一种多肽,其由在序列号7所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区的功能;

(g3) 一种多肽,其由与序列号7所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区的功能;以及

(h) 为以下(h1)~(h3)中任一种的轻链可变区:

(h1) 由以序列号8所示的氨基酸序列构成的多肽;

(h2) 一种多肽,其由在序列号8所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区的功能;

(h3) 一种多肽,其由与序列号8所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区的功能。

7. 根据权利要求1~4中任一项所述的抗整合素 α 11单克隆抗体,其包括:

(a) 为以下(a1)~(a3)中任一种的重链可变区CDR1:

(a1) 由以序列号1所示的氨基酸序列构成的多肽;

(a2) 一种多肽,其由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR1的功能;

(a3) 一种多肽,其由与序列号1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR1的功能;

(b) 为以下(b1)~(b3)中任一种的重链可变区CDR2:

(b1) 由以序列号2所示的氨基酸序列构成的多肽;

(b2) 一种多肽,其由在序列号2所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR2的功能;

(b3) 一种多肽,其由与序列号2所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR2的功能;

(c') 重链可变区CDR3,其是由以下式(1)所示的氨基酸序列构成的多肽;

$G(X_1X_2X_3X_4)C(X_5X_6)GDAACIDA\cdots\cdots(1)$

式中, X_1 是S、H或E, X_2 是A、T、F、S、M或E, X_3 是G、D、V或A, X_4 是W或D, X_5 是W, X_6 是M;

(d) 为以下(d1)~(d3)中任一种的轻链可变区CDR1:

(d1) 由以序列号4所示的氨基酸序列构成的多肽;

(d2) 一种多肽,其由在序列号4所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR1的功能;

(d3) 一种多肽,其由与序列号4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR1的功能;

(e) 为以下 (e1) ~ (e3) 中任一种的轻链可变区 CDR2:

(e1) 由以序列号 5 所示的氨基酸序列构成的多肽;

(e2) 一种多肽, 其由在序列号 5 所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成, 并具有作为轻链可变区 CDR2 的功能;

(e3) 一种多肽, 其由与序列号 5 所示的氨基酸序列具有 80% 以上同源性的氨基酸序列构成, 并且具有作为轻链可变区 CDR2 的功能; 以及

(f) 为以下 (f1) ~ (f3) 中任一种的轻链可变区 CDR3:

(f1) 由以序列号 6 所示的氨基酸序列构成的多肽;

(f2) 一种多肽, 其由在序列号 6 所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成, 并具有作为轻链可变区 CDR3 的功能;

(f3) 一种多肽, 其由与序列号 6 所示的氨基酸序列具有 80% 以上同源性的氨基酸序列构成, 并且具有作为轻链可变区 CDR3 的功能。

8. 一种多核苷酸, 其包含编码权利要求 5~7 中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体的碱基序列。

9. 一种载体, 其包含权利要求 8 所述的多核苷酸。

10. 一种纤维化疾病的处理剂, 其包含权利要求 1~7 中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、权利要求 8 所述的多核苷酸或权利要求 9 所述的载体作为有效成分。

11. 根据权利要求 10 所述的处理剂, 所述纤维化疾病是选自由肺纤维症、肝纤维症、肾硬化症、心肌病、肝硬化、胰腺纤维化和硬皮病组成的组中的至少一种疾病。

12. 权利要求 1~7 中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、权利要求 8 所述的多核苷酸或权利要求 9 所述的载体在纤维化疾病的处理剂的制造中的应用。

13. 一种纤维化疾病的诊断剂, 其包含权利要求 1~7 中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、权利要求 8 所述的多核苷酸或权利要求 9 所述的载体。

抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、包含编码前述抗体的碱基序列的多核苷酸以及包含前述多核苷酸的载体。本发明还涉及前述抗体、前述多核苷酸或前述载体的应用。

背景技术

[0002] 整合素 $\alpha 11$ 亚单位(以下也简称为“整合素 $\alpha 11$ ”或“ $\alpha 11$ ”)与整合素 $\beta 1$ 亚单位形成二聚体,是具有与胶原蛋白的结合活性的细胞粘附分子之一。

[0003] 已知整合素 $\alpha 11$ 参与组织纤维化(非专利文献1)。因此,整合素 $\alpha 11$ 被认为是与组织纤维化相关的疾病例如纤维化疾病的有希望的治疗靶标,并且正在尝试开发以整合素 $\alpha 11$ 作为靶标的医药(非专利文献2)。例如,非专利文献2中报道了通过使用siRNA抑制整合素 $\alpha 11$ 的表达可以防止向肝硬化的转变。

[0004] 现有技术文献

[0005] 非专利文献

[0006] 非专利文献1:Sergio Carracedo等,J Biol Chem.,285(14):10434-10445,2010。

[0007] 非专利文献2:Ruchi Bansal等,Exp Mol Med.,49(11):e396,2017。

发明内容

[0008] 发明所要解决的课题

[0009] 迄今为止,尚未发现可适用于治疗纤维化疾病的、与整合素 $\alpha 11$ 结合的单克隆抗体。

[0010] 本发明的一个方面目的在于提供一种新型的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体。

[0011] 用于解决问题的手段

[0012] 本发明人等为了实现上述目的反复进行了锐意研究,结果,成功地获得了新型抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,并且通过确定其氨基酸序列从而完成了本发明。即,本发明的一实施方式包含以下构成。

[0013] <1>一种抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其抑制整合素 $\alpha 11$ 与胶原蛋白的结合。

[0014] <2>根据<1>所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其具有选自自由细胞粘附抑制活性和细胞剥离活性组成的组中的至少一种活性。

[0015] <3>根据<1>或<2>所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其与整合素 $\alpha 11$ 特异性结合。

[0016] <4>根据<1>~<3>中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其与不同种类的多种哺乳动物来源的整合素 $\alpha 11$ 特异性结合。

[0017] <5>根据<1>~<4>中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其包括:

[0018] (a) 为以下(a1)~(a3)中任一种的重链可变区CDR1:

[0019] (a1) 由以序列号1所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0020] (a2) 一种多肽,其由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR1的功能;

- [0021] (a3) 一种多肽,其由与序列号1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR1的功能;
- [0022] (b) 为以下(b1)~(b3)中任一种的重链可变区CDR2:
- [0023] (b1) 由以序列号2所示的氨基酸序列构成的多肽;
- [0024] (b2) 一种多肽,其由在序列号2所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR2的功能;
- [0025] (b3) 一种多肽,其由与序列号2所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR2的功能;
- [0026] (c) 为以下(c1)~(c3)中任一种的重链可变区CDR3:
- [0027] (c1) 由以序列号3所示的氨基酸序列构成的多肽;
- [0028] (c2) 一种多肽,其由在序列号3所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR3的功能;
- [0029] (c3) 一种多肽,其由与序列号3所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR3的功能;
- [0030] (d) 为以下(d1)~(d3)中任一种的轻链可变区CDR1:
- [0031] (d1) 由以序列号4所示的氨基酸序列构成的多肽;
- [0032] (d2) 一种多肽,其由在序列号4所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR1的功能;
- [0033] (d3) 一种多肽,其由与序列号4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR1的功能;
- [0034] (e) 为以下(e1)~(e3)中任一种的轻链可变区CDR2:
- [0035] (e1) 由以序列号5所示的氨基酸序列构成的多肽;
- [0036] (e2) 一种多肽,其由在序列号5所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR2的功能;
- [0037] (e3) 一种多肽,其由与序列号5所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR2的功能;以及
- [0038] (f) 为以下(f1)~(f3)中任一种的轻链可变区CDR3:
- [0039] (f1) 由以序列号6所示的氨基酸序列构成的多肽;
- [0040] (f2) 一种多肽,其由在序列号6所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR3的功能;
- [0041] (f3) 一种多肽,其由与序列号6所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR3的功能。
- [0042] <6>根据<1>~<5>中任一项所述的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其包括:
- [0043] (g) 为以下(g1)~(g3)中任一种的重链可变区:
- [0044] (g1) 由以序列号7所示的氨基酸序列构成的多肽;
- [0045] (g2) 一种多肽,其由在序列号7所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区的功能;
- [0046] (g3) 一种多肽,其由与序列号7所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区的功能;以及

- [0047] (h) 为以下 (h1) ~ (h3) 中任一种的轻链可变区：
- [0048] (h1) 由以序列号8所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0049] (h2) 一种多肽，其由在序列号8所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为轻链可变区的功能；
- [0050] (h3) 一种多肽，其由与序列号8所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为轻链可变区的功能。
- [0051] <7>根据<1>~<4>中任一项所述的抗整合素 α 11单克隆抗体，其包括：
- [0052] (a) 为以下 (a1) ~ (a3) 中任一种的重链可变区CDR1：
- [0053] (a1) 由以序列号1所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0054] (a2) 一种多肽，其由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为重链可变区CDR1的功能；
- [0055] (a3) 一种多肽，其由与序列号1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为重链可变区CDR1的功能；
- [0056] (b) 为以下 (b1) ~ (b3) 中任一种的重链可变区CDR2：
- [0057] (b1) 由以序列号2所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0058] (b2) 一种多肽，其由在序列号2所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为重链可变区CDR2的功能；
- [0059] (b3) 一种多肽，其由与序列号2所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为重链可变区CDR2的功能；
- [0060] (c') 重链可变区CDR3，其是由以下式 (1) 所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0061] $G(X_1X_2X_3X_4)C(X_5X_6)GDAACIDA\cdots(1)$
- [0062] (式中， X_1 是S、H或E， X_2 是A、T、F、S、M或E， X_3 是G、D、V或A， X_4 是W或D， X_5 是W， X_6 是M。)；
- [0063] (d) 为以下 (d1) ~ (d3) 中任一种的轻链可变区CDR1：
- [0064] (d1) 由以序列号4所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0065] (d2) 一种多肽，其由在序列号4所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为轻链可变区CDR1的功能；
- [0066] (d3) 一种多肽，其由与序列号4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为轻链可变区CDR1的功能；
- [0067] (e) 为以下 (e1) ~ (e3) 中任一种的轻链可变区CDR2：
- [0068] (e1) 由以序列号5所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0069] (e2) 一种多肽，其由在序列号5所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为轻链可变区CDR2的功能；
- [0070] (e3) 一种多肽，其由与序列号5所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为轻链可变区CDR2的功能；以及
- [0071] (f) 为以下 (f1) ~ (f3) 中任一种的轻链可变区CDR3：
- [0072] (f1) 由以序列号6所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0073] (f2) 一种多肽，其由在序列号6所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为轻链可变区CDR3的功能；
- [0074] (f3) 一种多肽，其由与序列号6所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸

序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR3的功能。

[0075] <8>一种多核苷酸,其包含编码<5>~<7>中任一项所述的抗整合素 α 11单克隆抗体的碱基序列。

[0076] <9>一种载体,其包含<8>所述的多核苷酸。

[0077] <10>一种纤维化疾病的处理剂,其包含<1>~<7>中任一项所述的抗整合素 α 11单克隆抗体、<8>所述的多核苷酸或<9>所述的载体作为有效成分。

[0078] <11>根据<10>所述的处理剂,前述纤维化疾病是选自由肺纤维症、肝纤维症、肾硬化症、心肌病、肝硬化、胰腺纤维化和硬皮病组成的组中的至少一种疾病。

[0079] <12><1>~<7>中任一项所述的抗整合素 α 11单克隆抗体、<8>所述的多核苷酸或<9>所述的载体在纤维化疾病的处理剂的制造中的应用。

[0080] <13>一种纤维化疾病的诊断剂,其包含<1>~<7>中任一项所述的抗整合素 α 11单克隆抗体、<8>所述的多核苷酸或<9>所述的载体。

[0081] 发明效果

[0082] 根据本发明的一个方面,能够提供一种用于处理纤维化疾病的新型手段。

附图说明

[0083] 图1是表示本发明一个方面的抗体的可变区的氨基酸序列的图。

[0084] 图2是表示通过FACS解析本发明的一方面的抗体对整合素 α 11的反应性的结果的图。(a)使用了CHO细胞(对照), (b)使用了人整合素 α 11导入的CHO细胞。

[0085] 图3(a)是表示通过FACS确认SW480细胞表达整合素 α 1、2的结果的图。(b)是表示使用SW480细胞,通过FACS解析本发明一个方面的抗体对整合素 α 1、2的非反应性的结果的图。

[0086] 图4(a)是表示通过蛋白质印迹法确认人整合素 α 10导入的CHO细胞表达整合素 α 10的结果的图。(b)是表示使用人整合素 α 10导入的CHO细胞,通过FACS解析本发明一个方面的抗体对整合素 α 10的非反应性的结果的图。

[0087] 图5是表示通过FACS解析本发明一个方面的抗体对大鼠肝星状细胞的反应性的结果的图。(a)表示培养第5天的结果, (b)表示培养第10天的结果。

[0088] 图6是表示通过FACS解析本发明的一方面的抗体对大鼠整合素 α 11导入的CHO细胞的反应性的结果的图。(a)表示抗体对CHO细胞(对照)的反应性, (b)表示抗体对大鼠整合素 α 11导入的CHO细胞的反应性。

[0089] 图7是表示本发明一个方面的抗体的细胞粘附抑制活性的解析结果的图。

[0090] 图8是表示本发明一个方面的抗体的细胞剥离活性的解析结果的图。

[0091] 图9是表示本发明一个方面的抗体的细胞延伸抑制活性的解析结果的图。

[0092] 图10是表示本发明一个方面的抗体的成肌纤维细胞化抑制试验的结果的图(后述实施例6(实验1))。

[0093] 图11是表示本发明一个方面的抗体的成肌纤维细胞化抑制试验的结果的图(后述实施例6(实验2))。

[0094] 图12是表示本发明一个方面的抗体的成肌纤维细胞化抑制试验的结果的图(后述实施例6(实验3))。

[0095] 图13是表示本发明的一方面中的抗体和改性抗体的重链可变区CDR3内的一部分

氨基酸序列的图。图中，下划线部分表示热点。

[0096] 图14是表示关于本发明一个方面的抗体在特定胶原蛋白浓度下的细胞粘附抑制试验的结果的图(后述的实施例4)。

[0097] 图15是表示关于本发明一个方面的抗体在特定胶原蛋白浓度下的细胞粘附抑制试验的结果的图(后述的实施例4)。

[0098] 图16是表示了人、小鼠和鸡中整合素 $\alpha 11$ 的I结构域蛋白质的氨基酸序列的图。

具体实施方式

[0099] 下面将对本发明的一个实施方式进行说明,但是本发明不限于此。

[0100] 只要本说明书中没有特别记载,表示数值范围的“A~B”表示“A以上且B以下”。

[0101] 在本说明书中,“基因”是指核苷酸的聚合物,并且“多核苷酸”、“核酸”或“核酸分子”同义使用。基因可以以DNA的形式(例如cDNA或基因组DNA)存在,也可以以RNA(例如mRNA)的形式存在。DNA或RNA可以是双链的,也可以是单链的。单链DNA或RNA可以是编码链(有义链),也可以是非编码链(反义链)。基因可以是化学合成的。另外,在本说明书中记载为“多核苷酸”的情况下,可以是DNA,也可以是RNA。

[0102] 在本说明书中,“蛋白质”与“肽”或“多肽”同义使用。

[0103] 在本说明书中,碱基和氨基酸的表示法适宜使用由IUPAC和IUB定义的单字母表示法或三字母表示法。

[0104] [1、抗体]

[0105] 本发明的一实施方式的抗体是抑制整合素 $\alpha 11$ 与胶原蛋白的结合的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体(以下称为“本发明的抗体”)。

[0106] 据报道,整合素是通常作为以 α 链和 β 链构成的异二聚体存在于细胞膜表面的受体,主要起到作为细胞外基质的受体的作用。已知在亚单位中有18条 α 链和8条 β 链,总共存在有24种整合素。

[0107] 其中,作为本发明的抗体的靶标分子的整合素 $\alpha 11$ 是与 $\beta 1$ 形成异二聚体的整合素,并具有与胶原蛋白结合的活性。由于整合素 $\alpha 11$ 的过表达促进组织纤维化,因此认为整合素 $\alpha 11$ 与纤维化疾病(例如组织纤维化、肿瘤等)有关。因此,迄今为止,许多研究者以开发针对纤维化疾病的抗体医药为目的,尝试获得针对整合素 $\alpha 11$ 的单克隆抗体。然而,尽管进行了许多这样的研究,但到目前为止,仍未获得针对整合素 $\alpha 11$ 的单克隆抗体。其理由是,以动物作为宿主的抗体产生是使用异种蛋白质作为抗原,基于与宿主蛋白质的不同而产生的抗原性。然而, $\alpha 11$ 在哺乳动物之间被很好地保存(即,其氨基酸序列的同源性高),即使用人 $\alpha 11$ 免疫了作为通用宿主的小鼠,作为异物的反应的程度也被认为是较弱的。使用大鼠、兔子的情况也一样。然而,如本发明所示,当将鸡用作宿主时,鸟类和哺乳动物之间的蛋白质差异大,从而认为人或小鼠 $\alpha 11$ 具有高抗原性。

[0108] 本发明人等为了获得抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,反复进行了锐意研究,结果,通过用小鼠整合素 $\alpha 11$ 的I结构域蛋白(图16)对鸡进行免疫,并基于从免疫后的鸡脾脏获得的淋巴细胞来源的RNA,制备了scFv噬菌体抗体文库并进行筛选,从而首次成功获得抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体。

[0109] 本发明的抗体具有以下特征。

[0110] • 具有抑制整合素 $\alpha 11$ 和胶原蛋白结合的活性(参见实施例4)。

[0111] • 具有细胞粘附抑制活性(参见实施例4)。

[0112] • 具有细胞剥离活性(参见实施例5)。

[0113] • 具有细胞延伸抑制活性(参见实施例5)。

[0114] • 具有组织纤维化抑制活性(参见实施例6)。

[0115] • 与整合素 $\alpha 11$ 特异性结合(参见实施例2)。

[0116] • 与不同种类的多种哺乳动物来源的整合素 $\alpha 11$ 特异性结合(参见实施例3)。

[0117] 在上述特征中,特别是关于细胞剥离活性,几乎没有关于具有这些活性的抗体的报告。另外,关于细胞剥离活性的机制,也基本没有被阐明。令人惊讶的是,在这种情况下,本发明人等成功获得了抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,并且该抗体具有上述活性。因此,期望本发明的抗体通过具有上述效果而在纤维化疾病的处理等方面极其有效。

[0118] 进一步地,本发明人等从亲和性的观点出发对上述获得的本发明的抗体进行了详细的研究。具体而言,认为重链可变区CDR3对于决定抗体的亲和性是最重要的。已知抗体中存在热点,热点是在亲和性成熟期间频繁发生变异的位点。据报道,通过在试管内在该热点位点导入变异从而产生了具有高亲和性的改性抗体(Chowdhury PS等,Nat.Biotechnol.,1999年6月;17(6):568-72)。

[0119] 因此,关于上述获得的本发明的抗体,对重链可变区CDR3进行了各种改性并进行了研究,结果成功获得了与上述抗体相比细胞粘附抑制活性更高的抗体。因此,这种重链可变区CDR3改性后的、细胞粘附抑制活性高的抗体也包含在本发明的抗体中。

[0120] 在本说明书中,“抗体”是指能够特异性结合抗原上特定抗原表位的分子。

[0121] 在本说明书中,“单克隆抗体”是指从实质上均匀的抗体的群体中获得的抗体。即,除了仅少量可能存在的、可以自然发生的突变之外,构成群体的各个抗体包含相同的抗体。单克隆抗体是高度特异的,各单克隆抗体对应于抗原的单一抗原表位。制造单克隆抗体的方法没有特别限制,并且可以使用本领域中的任何方法。例如,可以通过杂交瘤法(Kohler G,Milstein C.,Nature,1975年8月7日;256(5517):495-497.)、重组方法(美国专利号4816567)、从噬菌体抗体文库分离(Clackson等,Nature,1991年8月15日;352(6336):624-628或Marks等,J Mol Biol.,1991年12月5日;222(3):581-597.)、单克隆抗体的一般生产方法(蛋白质实验手册,羊土社(2003):92-96(タンパク質実験ハンドブック、羊土社(2003):92-96。))等来制造本发明的抗体。本发明的抗体优选通过后述的实施例中记载的方法来制造。

[0122] 本发明的抗体包含各种形式,例如不仅是全长抗体,还可以是使用抗体片段的小分子抗体。作为小分子抗体,例如,可以例举出Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、双特异抗体(diabody)、单链抗体(例如scFv、dsFv)、含有CDR的肽、多价特异性抗体(例如二价特异性抗体)等。本发明的抗体也可以是小鼠嵌合抗体、鸡嵌合抗体、人源化抗体等。本发明的抗体可以进一步是与现有的化学合成医药品原料药或医药品制剂结合的小分子抗体或糖链改性抗体的形式。关于上述各种形式的抗体,例如记载在抗体-实验室手册,Edward A.Greenfield编辑,冷泉港实验室出版社,纽约(Antibodies-A laboratory Manual-,Edward A.Greenfield Ed,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY)等中。

[0123] 此外,本发明的抗体在作为治疗药使用时,为了降低免疫原性或者为了提高稳定

性,可以适当地选择上述各种形式。例如,为了降低免疫原性,本发明的抗体优选使用嵌合抗体、人源化抗体等。

[0124] 为了获得上述那样的小分子抗体,可以通过已知的克隆技术或化学合成方法来制造。例如,如果使用克隆技术,则可以制备编码上述抗体片段(小分子抗体)的DNA,并将该DNA插入可自主复制的载体中以获得重组DNA,将该重组DNA导入大肠杆菌、枯草杆菌、放线菌、酵母、丝状菌、植物细胞、昆虫细胞、动物细胞等合适的宿主中以获得转化体,并从其培养物中收集含有该氨基酸序列的肽(例如,参见Co, M.S等, *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M.和Horwitz, A.H., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A.和Skerra, A., *Methods Enzymol.* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J.等, *Methods Enzymol.* (1986) 121, 663-669; Bird, R.E.和Walker, B.W., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-137)。

[0125] 另外,还可以制备编码上述小分子抗体的DNA,并使用小麦胚芽或大肠菌细胞提取液等,通过无细胞蛋白质合成系统进行合成。另外,也可以通过利用“固相法”或“液相法”等常用的肽化学合成方法使氨基酸依次进行脱水缩合、延伸,从而获得上述小分子抗体。

[0126] 本发明的抗体具有选自细胞粘附抑制活性和细胞剥离活性组成的组中的至少一种活性。

[0127] 在本说明书中,“细胞粘附抑制活性”是指抑制具有整合素 $\alpha 11$ 的细胞与胶原蛋白结合的活性。即,本发明的抗体具有抑制具有整合素 $\alpha 11$ 的、未结合状态的细胞与胶原蛋白结合的活性。粘附抑制是由于 $\alpha 11$ 形成的整合素 $\alpha 11\beta 1$ 不能与配体结合而产生的现象,反映了由配体结合产生的 $\alpha 11\beta 1$ 来源的细胞内信号转导的消失。本发明的抗体通过具有细胞粘附抑制活性,可以预防组织纤维化并抑制纤维化的发展。细胞粘附抑制活性的测定没有特别限制,可以利用本领域中的任何方法进行。细胞粘附抑制活性例如可以通过后述的实施例中记载的方法进行测定。另外,细胞粘附抑制活性也可以通过作为细胞粘附抑制的结果而产生的细胞延伸抑制活性或组织纤维化抑制活性来评估。

[0128] 在本说明书中,“细胞剥离活性”是指使具有整合素 $\alpha 11$ 的细胞从胶原蛋白上解离的活性。即,本发明的抗体具有使结合状态的整合素 $\alpha 11\beta 1$ 与胶原蛋白解离的活性。本发明的抗体通过具有细胞剥离活性,可以治疗已纤维化的组织。细胞剥离活性的测定没有特别限制,可以利用本领域中的任何方法进行。细胞剥离活性例如可以通过后述的实施例中记载的方法进行测定。

[0129] 此外,迄今为止,关于细胞剥离活性的机制,还没有通过晶体解析等进行直接证明。然而,认为与抑制性抗体的抗原表位和配体的结合位点在整合素 α 亚单位上至少部分重叠(竞争型)或者在稍远的部位(变构型)有关(参见Mold AP, *Biochem J.*, 464(3):301-13, 2014; Mold AP, *J Biol Chem.*, 291:20993-1007, 2016)。

[0130] 本发明的抗体与整合素 $\alpha 11$ 特异性结合。

[0131] 在本说明书中,“特异性结合”是指仅与靶标物质结合而不与任何其他物质结合。“特异性结合”还包括仅优先与靶标物质结合。如后述的实施例所示,本发明的抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,但对与整合素 $\alpha 11$ 结构相似的整合素 $\alpha 1$ 、整合素 $\alpha 2$ 和整合素 $\alpha 10$ 不显示结合活性。因此,认为本发明的抗体对整合素 $\alpha 11$ 具有特异性。

[0132] 本发明的抗体与不同种类的多种哺乳动物来源的整合素 $\alpha 11$ 特异性结合。

[0133] 在后述的实施例中,证明了本发明的抗体与不同种类的多种哺乳动物来源的整合素 $\alpha 11$ (在实施例中为人整合素 $\alpha 11$ 和大鼠整合素 $\alpha 11$)结合。因此,可以得到对不同种类的多种哺乳动物来源的整合素 $\alpha 11$ 具有交叉反应性的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体。

[0134] 在本说明书中,“交叉反应性”是指某一抗体对具有类似结构的两种以上的抗原的任一种均具有有意义的结合亲和性性质的总称。在此,具有类似结构的抗原包括同源性高的蛋白质。

[0135] 本发明的抗体对人、小鼠(マウス)、豚鼠、仓鼠、大鼠(ラット)、鼠(ネズミ)、兔子、猪、绵羊、山羊、牛、马、猫、狗、狢、猴子、黑猩猩等的 $\alpha 11$ 表现出交叉反应性,优选对人、小鼠、大鼠、猴子的 $\alpha 11$ 表现出交叉反应,更优选对人、小鼠的 $\alpha 11$ 表现出交叉反应。

[0136] 由于本发明的抗体可以结合不同种类的多种哺乳动物,因此可以适当地用作在验证对多种哺乳动物的效果所需的临床前试验中的处理剂等。

[0137] 本发明的抗体是如下所示的抗体。

[0138] 一种抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其包括:

[0139] (a)为以下(a1)~(a3)中任一种的重链可变区CDR1:

[0140] (a1)由以序列号1所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0141] (a2)一种多肽,其由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR1的功能;

[0142] (a3)一种多肽,其由与序列号1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR1的功能;

[0143] (b)为以下(b1)~(b3)中任一种的重链可变区CDR2:

[0144] (b1)由以序列号2所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0145] (b2)一种多肽,其由在序列号2所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR2的功能;

[0146] (b3)一种多肽,其由与序列号2所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR2的功能;

[0147] (c)为以下(c1)~(c3)中任一种的重链可变区CDR3:

[0148] (c1)由以序列号3所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0149] (c2)一种多肽,其由在序列号3所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR3的功能;

[0150] (c3)一种多肽,其由与序列号3所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR3的功能;

[0151] (d)为以下(d1)~(d3)中任一种的轻链可变区CDR1:

[0152] (d1)由以序列号4所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0153] (d2)一种多肽,其由在序列号4所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR1的功能;

[0154] (d3)一种多肽,其由与序列号4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR1的功能;

[0155] (e)为以下(e1)~(e3)中任一种的轻链可变区CDR2:

[0156] (e1)由以序列号5所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0157] (e2) 一种多肽,其由在序列号5所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR2的功能;

[0158] (e3) 一种多肽,其由与序列号5所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR2的功能;以及

[0159] 为以下(f1)~(f3)中任一种的轻链可变区CDR3:

[0160] (f1) 由以序列号6所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0161] (f2) 一种多肽,其由在序列号6所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR3的功能;

[0162] (f3) 一种多肽,其由与序列号6所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR3的功能。

[0163] 对前述(a)的多肽进行具体说明。(a)的多肽在本发明的抗体中构成重链可变区CDR1。

[0164] 前述(a1)的序列号1是鸡来源的多肽,为全长由5个氨基酸残基构成的多肽。

[0165] 前述(a2)的多肽是具有序列号1所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等同的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分多肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为重链可变区CDR1的功能,其具体序列就不受限制。在此,只要不丧失前述功能,可以缺失、取代或添加的氨基酸的数量不受限制,为通过位点特异性突变诱导法等已知的导入法可以进行缺失、替换或添加的程度的数量即可,优选在3个氨基酸以内(例如3、2或1个氨基酸)。此外,在说明书中,“变异”主要是指通过位点特异性突变诱导法等人为导入的变异,也可以是天然存在的相同变异。

[0166] 变异的氨基酸残基优选变异为保留氨基酸侧链的性质的其他氨基酸。例如,作为氨基酸侧链的性质,可以例举出疏水性氨基酸(A、I、L、M、F、P、W、Y、V)、亲水性氨基酸(R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T)、具有脂肪族侧链的氨基酸(G、A、V、L、I、P)、具有含羟基侧链的氨基酸(S、T、Y)、具有含硫原子侧链的氨基酸(C、M)、具有含羧酸和酰胺侧链的氨基酸(D、N、E、Q)、具有含碱基侧链的氨基酸(R、K、H)、具有含芳香族侧链的氨基酸(H、F、Y、W)(括号中的所有氨基酸均以单字母表示法表示)。已知,具有对于某一氨基酸通过缺失、添加一个或多个氨基酸残基和/或用其它氨基酸进行取代而修饰的氨基酸序列的多肽保持了其生物学活性。进一步地,更优选将靶氨基酸残基变异为具有尽可能多的共同特性的氨基酸残基。

[0167] 在本说明书中,“功能上等同”是指作为对象的多肽具有与作为目的的多肽等同(相同和/或相似)的生物学功能或生物化学功能。生物学性质可以包括表达位点的特异性、表达量等。导入了变异的多肽是否具有期望的功能可以通过检查该变异多肽是否具有作为重链可变区CDR1的功能来判断。

[0168] 为了判定多肽是否为具有作为重链可变区CDR1的功能的多肽,测试当使包含该多肽和上述(b)~(f)的多肽的抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,该抗体是否与整合素 $\alpha 11$ 结合即可。即,当该抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,如果该抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,则可以判定该多肽为具有作为重链可变区CDR1的功能的多肽。对具体的判定方法没有特别限制,并且可以使用本领域中已知的任何方法。

[0169] 前述(a3)的多肽还指具有序列号1所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等同的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分肽,或与其他蛋白质·肽的融合

蛋白等,只要其具有作为重链可变区CDR1的功能,其具体序列就不受限制。氨基酸序列的同源性是指在整个氨基酸序列(或功能表达所需的区域)中,具有至少为80%以上,更优选为90%以上,进一步更优选为95%以上(例如95%、96%、97%、98%、99%以上)的序列同源性。可以利用BLASTN(核酸水平)、BLASTX(氨基酸水平)程序(Altschul等,J.Mol.Biol., 215:403-410,1990)来确定氨基酸序列的同源性。该程序基于Karlin和Altschul的算法BLAST(Proc.Natl.Acad.Sci.USA,87:2264-2268,1990,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,90:5873-5877,1993)。当通过BLASTN解析碱基序列时,参数设为例如得分(score)=100、字长(wordlength)=12。另外,当通过BLASTX解析碱基序列时,参数设为例如得分(score)=50和字长(wordlength)=3。另外,当使用Gapped BLAST程序解析氨基酸序列时,可以如Altschul等(Nucleic Acids Res.25:3389-3402,1997)中所述的进行。在使用BLAST和Gapped BLAST程序时,使用各程序的默认参数。这些解析方法的具体方法是已知的。为了以最佳状态比对比较对象的碱基序列或氨基酸序列,可以容许添加或缺失(例如间隙等)。

[0170] 在本说明书中,“同源性”是指性质相似的氨基酸残基的比例(homology、positive等),更优选为相同氨基酸残基的比例,即同一性(identity)。此外,氨基酸的性质如上所述。

[0171] 本发明中的多肽可以是氨基酸与肽结合的多肽,但不限于此,也可以是包含糖链、类异戊二烯基等肽以外的结构的复合肽。氨基酸的官能基团可以被修饰。优选氨基酸为L型,但不限于此。

[0172] 作为得到上述多肽的方法,可以使用常用的多核苷酸改性方法。即,通过取代、缺失、插入和/或添加具有蛋白质的遗传信息的多核苷酸的特定碱基,可以制备具有期望的重组蛋白质的遗传信息的多核苷酸。作为变换多核苷酸的碱基的具体方法,例如,可以例举出,使用市售的试剂盒(KOD-Plus Site-Directed Mutagenesis Kit;东洋纺织,Transformer Site-Directed Mutagenesis Kit;Clontech制造,QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit;Stratagene制造等),或利用聚合酶链反应法(polymerase chain reaction:PCR)。这些方法是本领域技术人员已知的。

[0173] 另外,本发明的多肽可以根据本领域中已知的任何方法容易地制备,并且例如可以由已经导入了多肽的表达载体的转化体表达,也可以化学合成。作为化学合成法,可以例举出固相法或液相法。在固相法中,例如,可以利用市售的各种肽合成装置(Model MultiPep RS(Intavis AG)等)。

[0174] 接下来,对于(b)~(f)的多肽,仅说明与上述(a)不同的部分。

[0175] 前述(b)的多肽在本发明的抗体中构成重链可变区CDR2。

[0176] 前述(b1)的序列号2是鸡来源的多肽,为全长由17个氨基酸残基构成的多肽。

[0177] 前述(b2)的多肽是具有序列号2所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等同的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分多肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为重链可变区CDR2的功能,其具体序列就不受限制。导入了变异的多肽是否具有期望的功能可以通过检查该变异多肽是否具有作为重链可变区CDR2的功能来判断。

[0178] 为了判定多肽是否为具有作为重链可变区CDR2的功能的多肽,测试当使包含该多肽以及上述(a)和(c)~(f)的多肽的抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,

该抗体是否与整合素 $\alpha 11$ 结合即可。即,当该抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,如果该抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,则可以判定该多肽为具有作为重链可变区CDR2的功能的多肽。

[0179] 前述(b3)的多肽还指具有序列号2所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等价的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为重链可变区CDR2的功能,其具体序列就不受限制。

[0180] 前述(c)的多肽在本发明的抗体中构成重链可变区CDR3。

[0181] 前述(c1)的序列号3是鸡来源的多肽,为全长由16个氨基酸残基构成的多肽。

[0182] 前述(c2)的多肽是具有序列号3所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等价的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分多肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为重链可变区CDR3的功能,其具体序列就不受限制。导入了变异的多肽是否具有期望的功能可以通过检查该变异多肽是否具有作为重链可变区CDR3的功能来判断。

[0183] 为了判定多肽是否为具有作为重链可变区CDR3的功能的多肽,测试当使包含该多肽以及上述(a)、(b)和(d)~(f)的多肽的抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,该抗体是否与整合素 $\alpha 11$ 结合即可。即,当该抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,如果该抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,则可以判定该多肽为具有作为重链可变区CDR3的功能的多肽。

[0184] 前述(c3)的多肽还指具有序列号3所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等价的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为重链可变区CDR3的功能,其具体序列就不受限制。

[0185] 前述(d)的多肽在本发明的抗体中构成轻链可变区CDR1。

[0186] 前述(d1)的序列号4是鸡来源的多肽,为全长由9个氨基酸残基构成的多肽。

[0187] 前述(d2)的多肽是具有序列号4所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等价的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分多肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为轻链可变区CDR1的功能,其具体序列就不受限制。导入了变异的多肽是否具有期望的功能可以通过检查该变异多肽是否具有作为轻链可变区CDR1的功能来判断。

[0188] 为了判定多肽是否为具有作为轻链可变区CDR1的功能的多肽,测试当使包含该多肽以及上述(a)~(c)和(e)~(f)的多肽的抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,该抗体是否与整合素 $\alpha 11$ 结合即可。即,当该抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,如果该抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,则可以判定该多肽为具有作为轻链可变区CDR1的功能的多肽。

[0189] 前述(d3)的多肽还指具有序列号4所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等价的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为轻链可变区CDR1的功能,其具体序列就不受限制。

[0190] 前述(e)的多肽在本发明的抗体中构成轻链可变区CDR2。

[0191] 前述(e1)的序列号5是鸡来源的多肽,为全长由7个氨基酸残基构成的多肽。

[0192] 前述(e2)的多肽是具有序列号5所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等价的变

异体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分多肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为轻链可变区CDR2的功能,其具体序列就不受限制。导入了变异的多肽是否具有期望的功能可以通过检查该变异多肽是否具有作为轻链可变区CDR2的功能来判断。

[0193] 为了判定多肽是否为具有作为轻链可变区CDR2的功能的多肽,测试当使包含该多肽以及上述(a)~(d)和(f)的多肽的抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,该抗体是否与整合素 $\alpha 11$ 结合即可。即,当该抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,如果该抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,则可以判定该多肽为具有作为轻链可变区CDR2的功能的多肽。

[0194] 前述(e3)的多肽还指具有序列号5所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等等的变异体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为轻链可变区CDR2的功能,其具体序列就不受限制。

[0195] 前述(f)的多肽在本发明的抗体中构成轻链可变区CDR3。

[0196] 前述(f1)的序列号6是鸡来源的多肽,为全长由10个氨基酸残基构成的多肽。

[0197] 前述(f2)的多肽是具有序列号6所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等等的变异体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分多肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为轻链可变区CDR3的功能,其具体序列就不受限制。导入了变异的多肽是否具有期望的功能可以通过检查该变异多肽是否具有作为轻链可变区CDR3的功能来判断。

[0198] 为了判定多肽是否为具有作为轻链可变区CDR3的功能的多肽,测试当使包含该多肽以及上述(a)~(e)的多肽的抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,该抗体是否与整合素 $\alpha 11$ 结合即可。即,当该抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,如果该抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,则可以判定该多肽为具有作为轻链可变区CDR3的功能的多肽。

[0199] 前述(f3)的多肽还指具有序列号6所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等等的变异体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为轻链可变区CDR3的功能,其具体序列就不受限制。

[0200] 另外,本发明的抗体是如下所示的抗体。

[0201] 一种抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其包括:

[0202] (g)为以下(g1)~(g3)中任一种的重链可变区:

[0203] (g1)由以序列号7所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0204] (g2)一种多肽,其由在序列号7所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区的功能;

[0205] (g3)一种多肽,其由与序列号7所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区的功能;以及

[0206] (h)为以下(h1)~(h3)中任一种的轻链可变区:

[0207] (h1)由以序列号8所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0208] (h2)一种多肽,其由在序列号8所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区的功能;

[0209] (h3) 一种多肽,其由与序列号8所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区的功能。

[0210] 以下,对于(g)~(h)的多肽,仅说明与上述(a)不同的部分。

[0211] 前述(g)的多肽在本发明的抗体中构成重链可变区。

[0212] 前述(g1)的序列号7是鸡来源的多肽,为全长由125个氨基酸残基构成的多肽。

[0213] 前述(g2)的多肽是具有序列号7所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等同的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分多肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为重链可变区的功能,其具体序列就不受限制。导入了变异的多肽是否具有期望的功能可以通过检查该变异多肽是否具有作为重链可变区的功能来判断。

[0214] 为了判定多肽是否为具有作为重链可变区的功能的多肽,测试当使包含该多肽的抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,该抗体是否与整合素 $\alpha 11$ 结合即可。即,当该抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,如果该抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,则可以判定该多肽为具有作为重链可变区的功能的多肽。

[0215] 前述(g3)的多肽还指具有序列号7所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等同的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为重链可变区的功能,其具体序列就不受限制。

[0216] 前述(h)的多肽在本发明的抗体中构成轻链可变区。

[0217] 前述(h1)的序列号8是鸡来源的多肽,为全长由105个氨基酸残基构成的多肽。

[0218] 前述(h2)的多肽是具有序列号8所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等同的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分多肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为轻链可变区的功能,其具体序列就不受限制。导入了变异的多肽是否具有期望的功能可以通过检查该变异多肽是否具有作为轻链可变区的功能来判断。

[0219] 为了判定多肽是否为具有作为轻链可变区的功能的多肽,测试当使包含该多肽的抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,该抗体是否与整合素 $\alpha 11$ 结合即可。即,当该抗体与整合素 $\alpha 11$ (或包含整合素 $\alpha 11$ 的样品)接触时,如果该抗体与整合素 $\alpha 11$ 结合,则可以判定该多肽为具有作为轻链可变区的功能的多肽。

[0220] 前述(h3)的多肽还指具有序列号8所示的氨基酸序列的蛋白质的、功能上等同的变体、衍生物、变体、等位基因、同系物、直向同源物、部分肽,或与其他蛋白质·肽的融合蛋白等,只要其具有作为轻链可变区的功能,其具体序列就不受限制。

[0221] 另外,本发明的抗体是如下所示的抗体。

[0222] 一种抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其包括:

[0223] (a) 为以下(a1)~(a3)中任一种的重链可变区CDR1:

[0224] (a1) 由以序列号1所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0225] (a2) 一种多肽,其由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR1的功能;

[0226] (a3) 一种多肽,其由与序列号1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR1的功能;

[0227] (b) 为以下(b1)~(b3)中任一种的重链可变区CDR2:

[0228] (b1) 由以序列号2所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0229] (b2) 一种多肽,其由在序列号2所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为重链可变区CDR2的功能;

[0230] (b3) 一种多肽,其由与序列号2所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为重链可变区CDR2的功能;

[0231] (c') 重链可变区CDR3,其是由以下式(1)所示的氨基酸序列构成的多肽:

[0232] $G(X_1X_2X_3X_4)C(X_5X_6)GDAACIDA\cdots(1)$

[0233] (式中, X_1 是S、H或E, X_2 是A、T、F、S、M或E, X_3 是G、D、V或A, X_4 是W或D, X_5 是W, X_6 是M。);

[0234] (d) 为以下(d1)~(d3)中任一种的轻链可变区CDR1:

[0235] (d1) 由以序列号4所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0236] (d2) 一种多肽,其由在序列号4所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR1的功能;

[0237] (d3) 一种多肽,其由与序列号4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR1的功能;

[0238] (e) 为以下(e1)~(e3)中任一种的轻链可变区CDR2:

[0239] (e1) 由以序列号5所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0240] (e2) 一种多肽,其由在序列号5所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR2的功能;

[0241] (e3) 一种多肽,其由与序列号5所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR2的功能;以及

[0242] (f) 为以下(f1)~(f3)中任一种的轻链可变区CDR3:

[0243] (f1) 由以序列号6所示的氨基酸序列构成的多肽;

[0244] (f2) 一种多肽,其由在序列号6所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成,并具有作为轻链可变区CDR3的功能;

[0245] (f3) 一种多肽,其由与序列号6所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成,并且具有作为轻链可变区CDR3的功能。

[0246] 即,本方面中的抗体是对于前述(c)的重链可变区CDR3,以本发明的抗体具有各种活性作为指标,而使其序列最优化的抗体。

[0247] 通过将变异导入前述(c1)的多肽中的热点位点并进行适当筛选,可以获得前述(c')的多肽。例如,前述(c')的多肽可以通过后述的实施例中记载的方法获得。

[0248] 由于本方面的抗体特别是在细胞粘附抑制活性和/或细胞剥离活性方面具有优异的效果,因此,作为后述的纤维化疾病的处理剂等非常有用。

[0249] 在上述式(1)中, X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 、 X_5 、 X_6 是为了提高本发明抗体的效果的重要序列。在上述式(1)中, X_1 可以是S、H或E, X_2 可以是A、T、F、S、M或E, X_3 可以是G、D、V或A, X_4 可以是W或D, X_5 可以是W, X_6 可以是M。另外,在上述式(1)中, X_4 优选为W。

[0250] 在本发明的一个实施方式中,重链可变区CDR3是由上述式(1)所示的氨基酸序列构成的多肽,其优选为由以序列号57~62中任一个所示的氨基酸序列构成的多肽。即,在本发明的一个实施方式中,本发明的抗体可以是以下所示的抗体。

[0251] 一种抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体,其包括:

[0252] (a) 为以下(a1)~(a3)中任一种的重链可变区CDR1:

- [0253] (a1) 由以序列号1所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0254] (a2) 一种多肽，其由在序列号1所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为重链可变区CDR1的功能；
- [0255] (a3) 一种多肽，其由与序列号1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为重链可变区CDR1的功能；
- [0256] (b) 为以下(b1)～(b3)中任一种的重链可变区CDR2：
- [0257] (b1) 由以序列号2所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0258] (b2) 一种多肽，其由在序列号2所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为重链可变区CDR2的功能；
- [0259] (b3) 一种多肽，其由与序列号2所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为重链可变区CDR2的功能；
- [0260] (c'') 重链可变区CDR3，其是由以序列号57～62中任一个所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0261] (d) 为以下(d1)～(d3)中任一种的轻链可变区CDR1：
- [0262] (d1) 由以序列号4所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0263] (d2) 一种多肽，其由在序列号4所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为轻链可变区CDR1的功能；
- [0264] (d3) 一种多肽，其由与序列号4所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为轻链可变区CDR1的功能；
- [0265] (e) 为以下(e1)～(e3)中任一种的轻链可变区CDR2：
- [0266] (e1) 由以序列号5所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0267] (e2) 一种多肽，其由在序列号5所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为轻链可变区CDR2的功能；
- [0268] (e3) 一种多肽，由与序列号5所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为轻链可变区CDR2的功能；以及
- [0269] (f) 为以下(f1)～(f3)中任一种的轻链可变区CDR3：
- [0270] (f1) 由以序列号6所示的氨基酸序列构成的多肽；
- [0271] (f2) 一种多肽，其由在序列号6所示的氨基酸序列中缺失、取代或添加一个或多个氨基酸的氨基酸序列构成，并具有作为轻链可变区CDR3的功能；
- [0272] (f3) 一种多肽，其由与序列号6所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成，并且具有作为轻链可变区CDR3的功能。
- [0273] 此外，在本发明的另一个实施方式中，上述(c'')可以是重链可变区CDR3，其是由以序列号57、58、59、61和62中任一个所示的氨基酸序列构成的多肽。
- [0274] 此外，在包括(c')或(c'')的上述实施方式中，关于除(c')和(c'')以外的多肽(即(a)、(b)、(d)～(f))的多肽，如上所述。
- [0275] [2、多核苷酸]
- [0276] 根据本发明一个实施方式的多核苷酸(以下称为“本发明的多核苷酸”)包含编码上述1的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体的碱基序列。
- [0277] 本发明的多核苷酸可以仅由编码上述1的抗体的多核苷酸构成，也可以添加其他

碱基序列。作为添加的碱基序列没有特别限制,可以例举出,编码标记(例如组氨酸标签、Myc标签、FLAG标签等)、融合蛋白(例如链霉亲和素、细胞色素、GST、GFP、MBP等)、信号序列(例如囊泡转移信号序列、分泌序列等)的碱基序列等。添加这些碱基序列的位点没有特别限制,例如可以是待翻译蛋白质的N末端,也可以是其C末端。

[0278] [3、载体]

[0279] 本发明一实施方式的载体(以下称为“本发明的载体”)包含上述2的多核苷酸。

[0280] 本发明的载体没有特别限制,可以是表达载体,也可以是克隆载体。在下文中,将详细描述本发明的载体是表达载体的情况。

[0281] 作为基体载体,本发明的载体可以使用各种常用的载体,并且可以根据待导入的细胞或导入方法进行适当选择。具体而言,可以将质粒、噬菌体、粘粒等用作基体载体。载体的具体类型没有特别限制,可以适当选择能够在宿主细胞中表达的载体。

[0282] 作为上述表达载体的例子,可以例举出,噬菌体载体、质粒载体、病毒载体、逆转录病毒载体、染色体载体、附加体载体和病毒来源的载体(细菌质粒、细菌噬菌体、酵母附加体等)、酵母染色体单元(element)和病毒(杆状病毒、乳多空病毒、牛痘病毒、腺病毒、禽痘病毒(トリポックスウイルス)、假性狂犬病病毒、疱疹病毒、慢病毒、逆转录病毒等)、以及其组合来源的载体(粘粒、噬菌粒等)。

[0283] 本发明的载体进一步包含用于转录起始和转录终止的位点,并且优选在转录区中包含核糖体结合位点。载体中成熟转录物的编码部分在待翻译多肽的起始端包含转录起始密码子AUG,并包含适当地位于终止端的终止密码子。

[0284] 为了在宿主内表达本发明的抗体,本发明的载体可以包含启动子序列。上述启动子序列可以根据宿主细胞的种类适当地选择。

[0285] 本发明的载体可以包含用于增强来自DNA的转录的序列。在一实施方式中,上述用于增强来自DNA的转录的序列是增强子序列。作为上述增强子,例如,可以例举出SV40增强子、巨细胞病毒的初期启动子增强子、多瘤增强子(ポリオーマエンハンサー)、腺病毒增强子等。

[0286] 本发明的载体可以包含用于稳定被转录的RNA的序列。在一实施方式中,上述用于稳定被转录的RNA的序列可以是polyA添加序列(聚腺苷酸化序列,polyA)。作为polyA添加序列,可以例举出生长激素基因来源的polyA添加序列、牛生长激素基因来源的polyA添加序列、人生长激素基因来源的polyA添加序列、SV40病毒来源的polyA添加序列、人或兔的β-珠蛋白基因来源的polyA添加序列等。

[0287] 当将本发明的多核苷酸用作处理剂时,优选将多核苷酸插入预定的表达载体中。通过将本发明的多核苷酸插入预定的表达载体中,例如,可以更有效地将多核苷酸递送至靶标位点,或可以提高将多核苷酸摄取至靶标位点处细胞中的效率。作为其结果,能够有效地处理作为本发明的对象的疾病。

[0288] 这样的载体在药物递送系统(Drug Delivery System(DDS))领域中正处于开发中,可以适当选择具有期望的递送和表达效果的载体。作为这种载体的一个例子,可以例举出病毒载体(例如,逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒载体等)、DNA载体(例如pUMVC4a等)等,但不限于此。

[0289] 上述的本发明的载体可以通过已知方法制备。作为这样的方法,例如,可以例举

出,在用于制备载体的试剂盒中所附的实施手册中记载的方法、各种指南中记载的方法等。

[0290] [4、纤维化疾病的处理剂]

[0291] 本发明一实施方式的纤维化疾病的处理剂(以下称为“本发明的处理剂”)包含上述1的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、上述2的多核苷酸或上述3的载体(以下称为“本发明的抗体等”)作为有效成分。

[0292] 由于本发明的处理剂包含本发明的抗体、本发明的多核苷酸或本发明的载体,因此具有根据其作用能够治疗纤维化疾病的效果。

[0293] 在本说明书中,“纤维化疾病”是指由组织纤维化本身引起的疾病以及与其他疾病或病态相关的组织纤维化病态。作为纤维化疾病,例如,可以例举出肺纤维症、肝纤维症、肾硬化症、心肌病、肝硬化、胰腺纤维化和硬皮病等,但伴随所有疾病和病态在组织中产生的纤维化(例如,肿瘤中的组织纤维化)也作为对象。

[0294] 在本说明书中,“处理”指对需要处理的对象实施产生处理效果的行为。处理效果包含预防效果和治疗效果,例如可以是以下所示的效果。

[0295] (1) 与不给药药剂的情况相比,防止与疾病有关的一种以上症状发病,或降低与疾病有关的一种以上症状发病的风险。

[0296] (2) 与不给药药剂的情况相比,防止与疾病有关的一种以上症状复发,或降低与疾病有关的一种以上症状复发的风险。

[0297] (3) 与不给药药剂的情况相比,防止产生与疾病有关的一种以上症状的征兆,或降低产生与疾病有关的一种以上症状的征兆的风险。

[0298] (4) 与不给药药剂的情况相比,降低与疾病有关的一种以上症状的严重程度。

[0299] (5) 与不给药药剂的情况相比,防止与疾病有关的一种以上症状的严重程度的增加或发展。

[0300] (6) 与不给药药剂的情况相比,减缓与疾病有关的一种以上症状的严重程度的增加速度或发展速度。

[0301] 因此,本发明的处理剂包含预防剂和治疗剂二者。

[0302] 本发明的处理剂可以含有除本发明的抗体等以外的其他有效成分作为有效成分。作为这样的其他有效成分,优选通过与本发明的抗体等组合,可以期待与单独使用本发明的抗体等的情况相比更有效的处理效果。本发明的处理剂中所含的其他有效成分可以是一种,也可以是多种。

[0303] 另外,本发明的处理剂可以包含药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂等。药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂等 在药学领域是众所周知的,如 Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A.R.Gennaro 编辑,1985) 中所记载。

[0304] 药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂的选择可以由本领域技术人员根据药剂的给药途径和标准药学惯例容易地选择。另外,本发明的处理剂可以进一步包含粘合剂、润滑剂、悬浮剂、涂覆剂、增溶剂等。

[0305] 本发明的处理剂在处理时通过任何有效的给药途径来给药。本发明的处理剂例如可以经口服、肌内、静脉内、皮下、腹膜内或经皮给药至处理对象。作为给药方式,例如可以是注射剂、胶囊剂、片剂、颗粒剂等。

[0306] 由本发明的处理剂处理的对象没有特别限制,只要是需要处理的对象即可。作为

由本发明的处理剂处理的对象,例如,可以例举出哺乳动物,例如人、小鼠、豚鼠、仓鼠、大鼠、鼠、兔子、猪、绵羊、山羊、牛、马、猫、狗、狢、猴子、黑猩猩等。

[0307] 本发明的处理剂的给药方法没有特别限制,可以用本领域中使用的任何方法。本发明的处理剂的处方可以由本领域技术人员根据疾病的严重程度、有效成分、给药途径等适当地设定。

[0308] [5、在纤维化疾病的处理剂的制造中的应用]

[0309] 在本发明的一实施方式中,提供了上述1的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、上述2的多核苷酸或上述3的载体在纤维化疾病的处理剂的制造中的应用。

[0310] 如上所述,由于本发明的抗体等具有与抑制整合素 $\alpha 11$ 和胶原蛋白之间的结合有关的一系列活性,因此其可用于制造纤维化疾病的处理剂。

[0311] [6、诊断剂]

[0312] 本发明一实施方式的纤维化疾病的诊断剂(以下称为“本发明的诊断剂”)包含上述1的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、上述2的多核苷酸或上述3的载体。

[0313] 本发明的诊断剂由于包含与整合素 $\alpha 11$ 结合的本发明的抗体等,因此可适用于诊断与整合素 $\alpha 11$ 相关的疾病(特别是纤维化疾病)。

[0314] “纤维化疾病”如上述4中所记载。

[0315] 本发明的诊断剂的使用方法没有特别限制。例如,可以通过检查和比较试验对象的细胞、血液、血清、体液、病理切片等与本发明的抗体之间的结合状态,以及标准对象的细胞、血液、血清、体液、病理切片等与本发明的抗体之间的结合状态,来诊断上述疾病。

[0316] 本发明的诊断剂的检测方法没有特别限制,例如可以使用放射免疫分析法、酶免疫分析法、荧光免疫分析法、发光免疫分析法、免疫沉淀法、免疫比浊法等。这些方法可以通过本领域中的任何方法来进行。

[0317] 本发明的诊断剂还可以向本发明的抗体等添加标记物质。作为标记物质,没有特别限制,例如可以使用荧光色素、酶、辅酶、化学发光物质、放射性物质等。具体地,可以使用放射性同位素(^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 、 ^{131}I 等)、荧光素、罗丹明、丹磺酰氯、伞形酮、荧光素酶、过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、辣根过氧化物酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶、微过氧化物酶、生物素等。这些标记物质可以根据诊断目的等适当地选择。

[0318] 此外,本发明的诊断剂还包含用于PET的试剂、实验使用的试剂或材料。

[0319] [7、其他]

[0320] 在本发明的其他实施方式中,提供了一种包括向需要处理的对象给药上述1的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、上述2的多核苷酸或上述3的载体的纤维化疾病的处理方法。

[0321] “需要处理的对象”没有特别限制,可以是患有纤维化疾病的患者,也可以是具有患有纤维化疾病风险的患者后备军。

[0322] 当给药上述2的多核苷酸或上述3的载体时,抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体在给药对象的体内表达,其结果,可以处理纤维化疾病。

[0323] “纤维化疾病”如上述4中所记载。

[0324] 另外,在本发明的其他实施方式中,提供了用于处理纤维化疾病的上述1的抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体、上述2的多核苷酸或上述3的载体。

[0325] 本发明不限于上述各种实施方式,并且在权利要求所示的范围内可以进行各种变

更,并且通过适当地组合在不同实施方式中公开的各种技术手段而获得的实施方式也包括在本发明的技术范围内。

[0326] 实施例

[0327] 下文将通过实施例对本发明进行更详细的说明,但是本发明不限于这些实施例。

[0328] [1、抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体]

[0329] [对鸡的免疫]

[0330] 通过重叠PCR连接编码小鼠整合素 $\alpha 11$ I结构域(胶原蛋白结合域,以下称为“小鼠I结构域”)的基因和编码鸡抗体L链前导序列的基因,然后将其克隆到用于哺乳动物细胞的表达载体pcDNA3.1 myc-His A载体中。接下来,将前述载体导入人胚胎肾细胞株293F细胞中,使重组小鼠I结构域蛋白质(His标签添加至C端)表达和分泌。使用Ni-NTA琼脂糖从293F细胞培养上清液中纯化分泌的重组小鼠I结构域蛋白质。然后,将GELBE佐剂和氯化锰(最终浓度为1mM)混合,并对鸡总共进行4次免疫。

[0331] 此外,下表1中总汇了本实施例中使用的各种引物序列。

[0332] 表1

[0333] (表1)

(1、抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体)			
小鼠整合素 $\alpha 11$ I结构域扩增用	mo $\alpha 11$ -F	CCTGGTGCAGGCACAGACTTACATGGACATC	序列号 9
	mo $\alpha 11$ -I-R-AgeI	GCACCGGTCAATCICAGCCAAAAG	序列号 10
鸡抗体L链前导序列扩增用	VL-L-F-BamHI	ATGGATCCGCCATGGCCTGGGCTCCTCTCCT	序列号 11
	VL-L-R	TGCCTGCACCAGGGAACCTG	序列号 12
scFv噬菌体抗体文库制备用(VH扩增用)	CHB	CTGATGGCGGCCGTGACGTT	序列号 13
	CHSF	TCCACCTGTGCACACGGTGACTTCGGT	序列号 14
scFv噬菌体抗体文库制备用(VL扩增用)	CLSB	TCTGACGTCGCGGTGACTCAGCC	序列号 15
	CLF	ATTAGCGCGCTTAAGGACGGTCAGGGTT	序列号 16
scFv噬菌体抗体文库制备用(连接用)	Linker	CCGTGTCGACAGGTGGAGGCGGCTCTGGTGGCGGTGGCA GTGGCGCGGAGGTTCTGACGTCGCGCTGA	序列号 17
	Linker-comp	TCAGCGGACGTCAGAACCTCCGCCACTGCCACCGC CACCAGAGCCGCTCCACCTGTCGACACGG	序列号 18
scFv噬菌体抗体文库制备用(scFv扩增用)	CRB	TATCTGATGGCGCGCTGA	序列号 19
	CRF	GACTATATTAGCGCGCTTAAGG	序列号 20
scFv抗体碱基序列确定用引物	M13R	GGAAACAGCTATGACCATG	序列号 21
	SLP1	AAGAAGCACACGACTGA	序列号 22
人 $\alpha 11$ 变异导入用	V144I-F	ATTGTCCTGGATGGCTCCAACAG	序列号 23
	V144I-R	AATGATGTCCATGTAGGTCTG	序列号 24
	E205A-F	GCAGCTGCCAGCCACATTGAGCAG	序列号 25
	E205A-R	CACCACATCTTTTACAGACCTG	序列号 26
	F222Y-F	TACGGCATTGAATTTGCACGCTC	序列号 27
	F222Y-R	TGCCGTCCGGTCTCTGTTCCCTC	序列号 28
	Q264D-F	GATAGCGAAAGAGACAACGTAAC	序列号 29
	Q264D-R	CTGGATCACCTTCTCCAGGTCTG	序列号 30
	D325E-F	GAGAGAATCTTCAGCCTGGAAGGC	序列号 31
	D325E-R	CCCCAGGGCATCGACAATGTCC	序列号 32
	T338I-F	ATCTCCTTTGGGCTGGAGATG	序列号 33
	T338I-R	CTCGTCTTGTGGTGCCTTCC	序列号 34

[0334]

[0335] 表2

[0336] (接表1)

(2、与整合素 $\alpha 11$ 的结合以及特异性)			
鸡VH扩增用	leader -VH-F	CCCCACAGGGCTGATGGCGGGCCGTGACGTTGGACG	序列号 3 5
	chVH-R	GGAGGAGACGATGACTTCGGT	序列号 3 6
鸡VL+小鼠C κ 扩增用	leader -VL-F	AGGTTCCCTGGTGCAGGCAGCAGTACTCAGCCGC	序列号 3 7
	moC κ - R-XbaI	ATCTAGATTAACACTCATTCTGTGAAGCTC	序列号 3 8
鸡抗体H链前 导序列扩增用	VH-L- F- HindII I	TTAAGCTTACCATGAGCCCACTCGTCTCC	序列号 3 9
	VH-L-R	CGCCATCAGCCCTGTGGGA	序列号 4 0
鸡抗体L链前 导序列扩增用	VL-L- F- HindII I	GCAAGCTTGCCATGGCCTGGGCTCCTCTC	序列号 4 1
	VL-L-R	TGCCTGCACCAGGGAACCTG	序列号 4 2
小鼠IgG1 CH1 扩增用	chVH- moCH1- F	GTCATCGTCTCCTCCGCCAAAACGACACCCCC	序列号 4 3
	moCH1- R	TCTTGCCACCTTGGTGCTGC	序列号 4 4
(6、组织纤维化抑制活性(体外))			
(实验1)			
大鼠 α -SMA基 因(Acta2) 扩增用	RatAct a2-qF	GACAATGGCTCCGGGCTCTGT	序列号 4 5
	RatAct a2-qR	TGCCGTGTTCTATCCGATAC	序列号 4 6
大鼠Rps18基因 扩增用(对照 基因)	RatRps 18-qF	TGTGGTGTGAGGAAAGCAG	序列号 4 7
	RatRps 18-qR	TGCCAGAACCTGGCTATAC	序列号 4 8
(实验2)			
人 α -SMA基因 (Acta2)扩增 用	HuActa 2-qF	TTCAATGTCCCAGCCATGTA	序列号 4 9
	HuActa 2-qR	GAAGGAATAGCCACGCTCAG	序列号 5 0
人Rps18基因扩 增用(对照基 因)	HuRps1 8-qF	GAGGATGAGGTGGAACGTGT	序列号 5 1
	HuRps1 8-qR	TCTTCAGTCGCTCCAGGTCT	序列号 5 2
(实验3)			
小鼠 α -SMA基因 (Acta2)扩增 用	MoActa 2-qF	AATGGCTCTGGGCTCTGTAA	序列号 5 3
	MoActa 2-qR	CTCTTGCTCTGGGCTTCATC	序列号 5 4
小鼠GAPDH基因 扩增用(对照 基因)	MoGAPD H-qF	TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	序列号 5 5
	MoGAPD H-qR	TTGCTGTTGAAGTCGAGGAG	序列号 5 6

[0337]

[0338] [抗体文库的制备]

[0339] 从最终免疫后的鸡中摘除脾脏,并分离出淋巴球。然后,提取RNA并合成cDNA以制备scFv噬菌体抗体文库。根据Nakamura N等,J Vet Med Sci.2004年7月;66(7):807-14中记载的方法制备噬菌体抗体文库。

[0340] [抗体筛选]

[0341] 通过细胞淘选法(セルパニング法)筛选抗体以获得与在细胞膜上表达的整合素 α 11反应的抗体。具体地,将噬菌体抗体文库与仓鼠卵巢细胞株(CHO细胞:内源不具有整合素 α 11的细胞株)混合以去除吸附在CHO细胞上的噬菌体抗体。接下来,使残余的噬菌体抗体与变异型人整合素 α 11导入的CHO细胞反应。用有机溶剂清洗前述细胞后,回收结合的噬菌体并感染大肠杆菌。4次淘选后,通过FACS确认文库对CHO细胞和人整合素 α 11导入的CHO细胞的反应性。使用噬菌体抗体文库(和后述的噬菌体抗体克隆)的FACS的反应条件如下。即,将50 μ l噬菌体抗体溶液作为第一抗体加入到细胞中,并在冰上反应25分钟。清洗后,将FITC标记的抗小鼠Igk抗体作为第二抗体以5 μ g/ml的浓度加入到细胞中,并在冰上反应15分钟。细胞淘选根据Giordano RJ等,Nat Med.2001年11月;7(11):1249-53中记载的方法进行。

[0342] 此外,上述变异型人整合素 α 11是通过变异导入PCR,将人 α 11的第144位缬氨酸取代为异亮氨酸、将第205位谷氨酸取代为丙氨酸、将第222位苯丙氨酸取代为酪氨酸、将第264位谷氨酰胺取代为天冬氨酸、将第325位天冬氨酸取代为谷氨酸、将第338位苏氨酸取代为异亮氨酸的变异体。在变异导入之前,与相应的小鼠 α 11的氨基酸序列一致,而在变异导入之后,被替换为相应的鸡 α 11的氨基酸序列。

[0343] [单克隆化和抗体序列确定]

[0344] 从第三轮的淘选文库中发现了48个克隆的噬菌体抗体克隆,并通过FACS研究了它们对于CHO细胞和人整合素 α 11导入的CHO细胞的反应性。确定了仅与人整合素 α 11导入的CHO细胞反应的47个克隆中的18个克隆的碱基序列。其结果表明,抗体集中于一个克隆。

[0345] 另外,确定上述分离的抗体片段(scFv)的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列(包括各CDR的序列)(图1、表2)。

[0346] 表3

[0347] (表2)

抗体位点	氨基酸序列	序列号
重链可变区 CDR 1	SYGMQ	序列号 1
重链可变区 CDR 2	GIDDDGSFTLYGAAVDG	序列号 2
重链可变区 CDR 3	GGYGYCWYGDAACIDA	序列号 3
轻链可变区 CDR 1	SGGSDSWYG	序列号 4
轻链可变区 CDR 2	SNNQRPS	序列号 5
轻链可变区 CDR 3	GSRDSSYDGI	序列号 6
重链可变区	AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKGSGFTFSSYGMQWVRQAPGRGLEWVAGID DDGSFTLYGAAVDGRATISRDNQTTVRLQLSDLRAEDTATYFCAKGGYGYC WYGDAACIDAWGHGTEVIVSS	序列号 7
轻链可变区	AVTQPSSVSNPGETVKITCSGGSDSWYQWYQQKSPGSAPVTVIYSNNQRPS NIPSRFSGSTSGSTSTLITITGVQADDEAVYFCGSRDSSYDGI K	序列号 8

[0349] (2、与整合素 $\alpha 11$ 的结合以及特异性)

[0350] [抗体的IgG化]

[0351] 以上述1的scFv抗体基因作为模板,分别对鸡抗体VH和VL基因进行PCR扩增。接下来,分别通过重叠PCR将VH与鸡抗体H链前导序列和小鼠IgG1恒定区连接,将VL与鸡抗体L链前导序列和小鼠Ig κ 区连接,以制备鸡-小鼠嵌合IgG1表达载体。将制备的H链和L链表达载体导入293F细胞,表达并分泌嵌合IgG1(His标签添加至C末端,以下称为“IgG”)。使用Ni-NTA琼脂糖从293F细胞培养上清液中纯化分泌的IgG。嵌合IgG抗体的重组根据Tateishi Y等,J Vet Med Sci 2008年4月;70(4):397-400中记载的方法进行。

[0352] [对 $\alpha 11$ 的反应性(特异性)的研究]

[0353] IgG化的抗体对 $\alpha 11$ 的反应性(特异性)的研究是根据对其他胶原蛋白结合性整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 10$ 有无反应性而进行的。首先,通过FACS研究了本抗体对CHO细胞和人整合素 $\alpha 11$ 导入的CHO细胞的反应性。接下来,通过FACS研究了本抗体对人结肠癌细胞株(SW480细胞:内源表达 $\alpha 1$ 和 $\alpha 2$ 的细胞株)和人整合素 $\alpha 10$ 导入的CHO细胞的反应性。使用前述IgG抗体的FACS的反应条件如下。即,将本抗体作为第一抗体以 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度加入到细胞中,并在冰上反应25分钟。清洗后,将PE标记的抗小鼠IgG抗体作为第二抗体以 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度加入到细胞中,并在冰上反应15分钟。此外,关于随后的FACS,也在相同条件下进行。结果如图2~4所示。

[0354] 其结果,本抗体显示出对整合素 $\alpha 11$ 的反应,但是未显示出对整合素 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 、 $\alpha 10$ 的反应。因此,明确了本抗体与整合素 $\alpha 11$ 特异性结合。

[0355] (3、与不同种类动物的交叉反应性)

[0356] [对大鼠整合素 $\alpha 11$ 的反应性]

[0357] 通过FACS分析了本抗体对导入大鼠整合素 $\alpha 11$ 的CHO细胞的反应性。结果如图6所示。

[0358] [对大鼠肝星状细胞的反应性]

[0359] 已知,大鼠肝星状细胞每当经过数日培养被活化(成纤维细胞化)时, $\alpha 11$ 的表达增加。因此,从12周龄Wister大鼠(雄性)的肝脏中分离出肝星状细胞并进行培养。在培养的第5天和第10天,通过FACS分析本抗体对肝星状细胞的反应性($\alpha 11$ 的表达)。根据Kristensen DB等,Hepatology,2000年8月;32(2):268-77中记载的方法分离大鼠肝星状细胞。结果如图5所示。

[0360] 综上所述,本抗体显示出与大鼠来源的整合素 $\alpha 11$ 的反应。结合上述2的结果,明确了本抗体对多种不同动物表现出交叉反应性。

[0361] (4、抑制(中和)活性)

[0362] [细胞粘附抑制试验-1]

[0363] 将大鼠尾部来源的I型胶原蛋白或牛皮肤来源的III型胶原蛋白分别以 $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度固定在96孔板上过夜。将 5×10^4 个与各种浓度(终浓度为 $0.078\mu\text{g}/\text{ml} \sim 20\mu\text{g}/\text{ml}$)的本抗体在室温下反应15分钟的人整合素 $\alpha 11$ 导入的小鼠成肌细胞株(C2C12细胞:所有胶原蛋白结合性整合素均不内源表达的细胞株)加入至同一孔中,并培养1小时以粘附至各种胶原蛋白。用含有0.5%结晶紫的20%甲醇溶液固定粘附细胞并染色,然后使其可溶。之后,在570nm处测量吸光度,将其数值化。结果如图7所示。

[0364] 由于通过添加本抗体,减少了与胶原蛋白结合的细胞数量,因此表明本抗体具有细胞粘附抑制活性。

[0365] [细胞粘附抑制试验-2]

[0366] <改性抗体的制备>

[0367] 为了制备改性抗体,在上述2中获得的抗体(也称为“野生型#33”)中检索了重链可变区CDR3中的热点。另外,热点是在对抗原的亲合性成熟过程中频繁发生变异的位点。其结果,发现6个部位的氨基酸是热点。因此,设计引物以在相同的部位随机导入变异。设计的引物序列如表3所示。

[0368] 表4

[0369] (表3)

iPCR中使用的引物		
#33VH-CD	TACTTCTGCGCCAAGGGTNNNSNNNSNNSTGTNNSN	序列号63
R3MUT-F	NSGGTGATGCTGCTTGTATTGACG	
#33VH-CD	GGTGGCGGTGTCCTCAGCCCTGAGGTC	序列号64
R3MUT-R		

[0371] 此外,在表3中,N是A、T、G、C中的任何一个,并且S是C或G。

[0372] 使用上述设计的引物,通过以野生型#33scFv噬菌粒载体为模板的反向PCR(iPCR)扩增变异(改性)#33DNA。

[0373] 接下来,通过Dpn I处理来消化模板,并且通过自连接使变异#33 DNA环化。用环化的变异#33 DNA制备重链可变区CDR3变异#33 scFv噬菌体抗体文库,并通过上述细胞淘选法浓缩特异性抗体。从第四轮淘选文库发现了143个克隆的噬菌体抗体克隆,并确定了显示出与人整合素 $\alpha 11$ 导入的CHO细胞的反应性的142个克隆的碱基序列和氨基酸序列。其结果,确认了6个与野生型#33不同的克隆。6个克隆的变异部位的氨基酸序列如图13所示。另外,6

个克隆的重链可变区CDR3的氨基酸序列如表4所述。

[0374] 表5

[0375] (表4)

[0376]

改性抗体的重链可变区CDR3的氨基酸序列		序列号
# 3 3 - 4 5	GSAGWCWMGDAACIDA	序列号 5 7
# 3 3 - 4 6	GHTDWCWMGDAACIDA	序列号 5 8
# 3 3 - 5 2	GEFGWCWMGDAACIDA	序列号 5 9
# 3 3 - 7 2	GSSVDCWMGDAACIDA	序列号 6 0
# 3 3 - 9 2	GSMGWCWMGDAACIDA	序列号 6 1
# 3 3 - 1 0 4	GSEAWCWMGDAACIDA	序列号 6 2

[0377] <改性抗体的细胞粘附抑制试验>

[0378] 首先,对于野生型#33 IgG,研究了在高浓度胶原蛋白固相条件下的细胞粘附抑制效果。

[0379] 具体而言,将大鼠尾部来源的I型胶原蛋白以10 μ g/ml的高浓度固定在96孔板上过夜。将5 \times 10⁴个在室温下与20 μ g/ml野生型#33 IgG反应15分钟的人整合素 α 11导入的C2C12细胞加入至同一孔中,并培养1小时以粘附至胶原蛋白。用含有0.5%结晶紫的20%甲醇溶液固定粘附细胞并染色,然后使其可溶。之后,在570nm处测量吸光度,将其数值化。结果如图14所示。如图14所示,在高浓度胶原蛋白的条件下,野生型#33 IgG几乎不抑制细胞对胶原蛋白的粘附。

[0380] 接下来,通过上述2中记载的方法将上述获得的6个克隆IgG化,并用于人整合素 α 11导入的C2C12细胞的细胞粘附抑制试验。

[0381] 具体而言,将5 \times 10⁴个与20 μ g/ml的各种改性#33 IgG(#33-45、#33-46、#33-52、#33-72、#33-92、#33-104)在室温下反应15分钟的人整合素 α 11导入的C2C12细胞加入同一孔中,并培养1小时以粘附至胶原蛋白。用含有0.5%结晶紫的20%甲醇溶液固定粘附细胞并染色,然后使其可溶。之后,在570nm处测量吸光度,将其数值化。结果如图15所示。如图15所示,发现即使在高浓度胶原蛋白条件下,5个克隆(#33-45、#33-46、#33-52、#33-92和#33-104)也抑制细胞对胶原蛋白的粘附,并且与野生型#33 IgG相比,细胞抑制活性提高。

[0382] 如上所述,由于通过添加本改性抗体,减少了与胶原蛋白结合的细胞数量,因此表明本改性抗体具有细胞粘附抑制活性。

[0383] (5、细胞剥离活性和细胞延伸抑制活性)

[0384] [细胞剥离试验]

[0385] 将大鼠尾部来源的I型胶原蛋白或牛皮肤来源的III型胶原蛋白分别以0.4 μ g/ml的浓度固定在96孔板上过夜。将5 \times 10⁴个人整合素 α 11导入的C2C12细胞加入至同一孔中,并培养45分钟以使细胞粘附。接下来,加入各种浓度(最终浓度为0.078~20 μ g/ml)的本抗体,并进一步培养1.5小时。以与上述4相同的方式将细胞固定、染色并使其可溶。然后,在570nm处测量吸光度并评价细胞剥离和细胞延伸。结果如图8、9所示。

[0386] 由于通过加入本抗体,减少了与胶原蛋白结合的细胞数量,因此表明本抗体具有细胞剥离活性。另外,由于通过加入本抗体抑制了细胞的延伸,因此表明本抗体还具有伴随细胞粘附抑制的细胞延伸抑制活性。

[0387] (6、组织纤维化抑制活性(体外))

[0388] [肌成纤维细胞化抑制试验]

[0389] 以成纤维细胞标志物 α -SMA基因的表达作为指标,评价本抗体的肌成纤维细胞化抑制活性。

[0390] (实验1) 以与上述3相同的方式,从大鼠肝脏分离肝星状细胞并进行培养。在培养的第3天,以20 μ g/ml的终浓度添加本抗体。在培养的第5、7、11和14天回收细胞并提取RNA。由提取的RNA合成cDNA,并通过定量PCR分析 α -SMA基因 (Acta2) 的表达。结果如图10所示。

[0391] (实验2) 将人乳腺癌细胞株Hs578T(确认 α 11在细胞表面表达) 在无血清培养基中培养过夜,然后以20 μ g/ml的终浓度添加本抗体并培养2小时。然后,以终浓度5ng/ml加入重组人TGF- β 1,并在无血清条件下进一步培养2天。从培养后的细胞中提取了RNA。由提取的RNA合成cDNA,并通过定量PCR分析 α -SMA基因 (Acta2) 的表达。结果如图11所示。

[0392] (实验3) 将在无血清培养基中培养过夜的人整合素 α 11导入的C2C12细胞从培养皿剥离。然后,以25 μ g/ml的终浓度添加本抗体,并在室温下反应15分钟。将 2×10^5 个反应后的细胞添加至其中使大鼠尾部来源的I型胶原蛋白以2 μ g/ml的浓度固定过夜的孔中,并在无血清条件下培养24小时。回收培养后的细胞,并提取RNA。由提取的RNA合成cDNA,并通过定量PCR分析 α -SMA基因 (Acta2) 的表达。结果如图12所示。

[0393] 从上述实验1至3中,可以明确本抗体具有组织纤维化抑制活性。

[0394] 工业适用性

[0395] 由于本发明可以抑制整合素 α 11与胶原蛋白的结合,因此可以广泛地用于医药、农林水产、生命科学、生命工学、基因治疗等领域。

序列表

<110> 国立大学法人广岛大学

<120> 抗整合素 $\alpha 11$ 单克隆抗体及其应用

<130> HU19008

<150> JP 2018-036933

<151> 2018-03-01

<160> 64

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 原鸡

<400> 1

Ser Tyr Gly Met Gln

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 原鸡

<400> 2

Gly Ile Asp Asp Asp Gly Ser Phe Thr Leu Tyr Gly Ala Ala Val Asp

1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 原鸡

<400> 3

Gly Gly Tyr Gly Tyr Cys Trp Tyr Gly Asp Ala Ala Cys Ile Asp Ala

1 5 10 15

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 原鸡

<400> 4

Ser Gly Gly Ser Asp Ser Trp Tyr Gly

1 5

<210> 5

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

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 9

cctggtgcag gcacagactt acatggacat c 31

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 10

gcaccggtca tctccagccc aaaag 25

<210> 11

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 11

atggatccgc catggcctgg gctcctctcc t 31

<210> 12

<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 12
tgcctgcacc agggaacctg 20
<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 13
ctgatggcgg ccgtgacgtt 20
<210> 14
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 14
tccacctgtc gacacggtga cttcgggt 27
<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 15
tctgacgtcg cgctgactca gcc 23
<210> 16
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 16
attagcgcgc ttaaggacgg tcagggtt 28

<210> 17
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 17
ccgtgtcgac aggtggagge ggctctggtg gcggtggcag tggcggcgga gtttctgacg 60
tcgcgctga 69
<210> 18
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 18
tcagcgcgac gtcagaacct ccgcccgcac tgccaccgcc accagagccg cctccacctg 60
tcgacacgg 69
<210> 19
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 19
tatctgatgg cggccgtga 19
<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 20
gactatatta gcgcgcttaa gg 22
<210> 21
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 引物
<400> 21
ggaaacagct atgaccatg 19
<210> 22
<211> 17
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 22
aagaagcaca cgactga 17
<210> 23
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 23
attgtcctgg atggctccaa cag 23
<210> 24
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 24
aatgatgtcc atgtaggtct g 21
<210> 25
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 25
gcagctgcca gccacattga gcag 24
<210> 26
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物
<400> 26
caccacatct tttacagacc tg 22
<210> 27
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 27
tacggcattg aatttgcacg ctc 23
<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 28
tgccgtccgg gtctctgttc ctc 23
<210> 29
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 29
gatagcgaag gagacaacgt aac 23
<210> 30
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 30
ctggatcacc ttctccaggt ctg 23
<210> 31
<211> 24
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 31
gagagaatct tcagcctgga aggc 24
<210> 32
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 32
ccccagggca tcgacaatgt cc 22
<210> 33
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 33
atctcctttg ggctggagat g 21
<210> 34
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 34
ctcgttcttg ttggtgcctt cc 22
<210> 35
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 35
ccccacaggg ctgatggcgg ccgtgacgtt ggacg 35
<210> 36
<211> 21

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 36
ggaggagacg atgacttcgg t 21
<210> 37
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 37
aggttcctg gtgcaggcag cagtgactca gccgc 35
<210> 38
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 38
atctagatta acactcattc ctgttgaagc tc 32
<210> 39
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 39
ttaagcttac catgagccca ctcgtctec 29
<210> 40
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 40
cgccatcagc cctgtgggga 20
<210> 41

<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 41
gcaagcttgc catggcctgg gctcctctc 29
<210> 42
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 42
tgctgcacc agggaacctg 20
<210> 43
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 43
gtcatcgtct cctccgcaa aacgacacce cc 32
<210> 44
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 44
tcttgtccac cttggtgctg c 21
<210> 45
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 45
gacaatggct ccgggctctg t 21

<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 46
tgccgtgttc tatcggatac 20
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 47
tgtggtgttg aggaaagcag 20
<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 48
tggccagaac ctggctatac 20
<210> 49
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 49
ttcaatgtcc cagccatgta 20
<210> 50
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 引物
<400> 50

gaaggaatag ccacgctcag 20

<210> 51

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 51

gaggatgagg tggaacgtgt 20

<210> 52

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 52

tcttcagtcg ctccaggtct 20

<210> 53

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 53

aatggctctg ggctctgtaa 20

<210> 54

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 54

ctcttgctct gggettcatc 20

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 55

tgtgtccgtc gtggatctga 20

<210> 56

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 56

ttgctgttga agtcgcagga g 21

<210> 57

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 改性序列

<400> 57

Gly Ser Ala Gly Trp Cys Trp Met Gly Asp Ala Ala Cys Ile Asp Ala

1 5 10 15

<210> 58

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 改性序列

<400> 58

Gly His Thr Asp Trp Cys Trp Met Gly Asp Ala Ala Cys Ile Asp Ala

1 5 10 15

<210> 59

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 改性序列

<400> 59

Gly Glu Phe Gly Trp Cys Trp Met Gly Asp Ala Ala Cys Ile Asp Ala

1 5 10 15

<210> 60

<211> 16

<212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 改性序列
 <400> 60
 Gly Ser Ser Val Asp Cys Trp Met Gly Asp Ala Ala Cys Ile Asp Ala
 1 5 10 15
 <210> 61
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 改性序列
 <400> 61
 Gly Ser Met Gly Trp Cys Trp Met Gly Asp Ala Ala Cys Ile Asp Ala
 1 5 10 15
 <210> 62
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 改性序列
 <400> 62
 Gly Ser Glu Ala Trp Cys Trp Met Gly Asp Ala Ala Cys Ile Asp Ala
 1 5 10 15
 <210> 63
 <211> 61
 <212> DNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (19) .. (20)
 <223> n为a,c,g或t
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (21) .. (21)
 <223> s为c或g
 <220>
 <221> misc_feature

<222> (22) .. (23)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (24) .. (24)
<223> s为c或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (25) .. (26)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (27) .. (27)
<223> s为c或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (28) .. (29)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (30) .. (30)
<223> s为c或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (34) .. (35)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (36) .. (36)
<223> s为c或g
<220>
<221> misc_feature
<222> (37) .. (38)
<223> n为a、c、g或t
<220>
<221> misc_feature
<222> (39) .. (39)
<223> s为c或g
<400> 63

tacttctgcg ccaagggttn snnsnnsnns tgtnnsnmsg gtgatgctgc ttgtattgac 60

g 61

<210> 64

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 64

ggtggcgggtg tcctcagccc tgaggte 27

可变区序列

VH AVTLDESGGGLQTPGGALSLVCKGSGFTFSSYGMQWVRQAPGRGLEWV
 AGIDDDGSFTLYGAAVDGRATISRDNQTTVRLQLSDLRAEDTATYFCAK
 GGYGYCWYGDAACIDAWGHGTEVIVSS

VL AVTQPSSVSANPGETVKITCSGGSDSWYGWYQQKSPGSAPVTVIYSNNQ
 RPSNIPSRFSGSTSGSTSTLTITGVQADDEAVYFCGSRDSSYDGIFGAGT
 TLTVLK

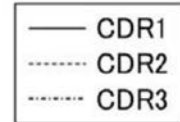


图1

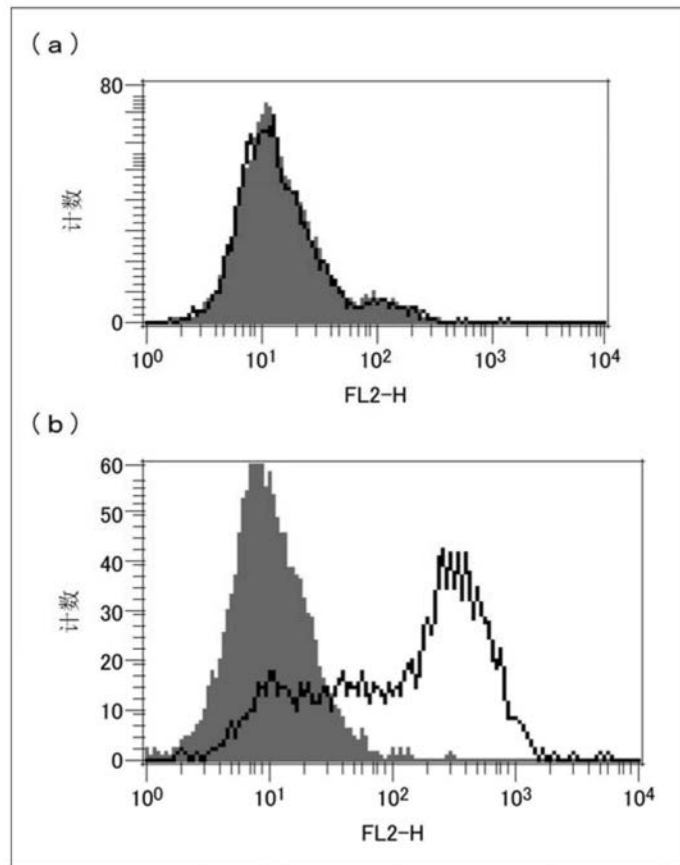


图2

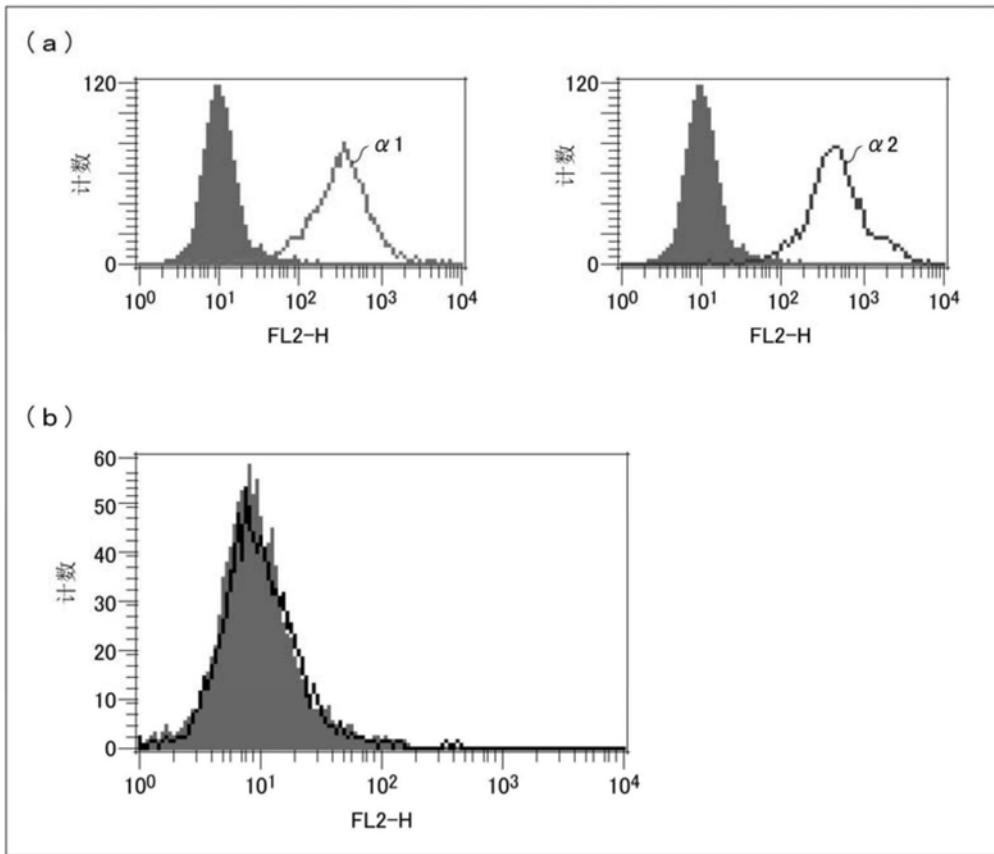


图3

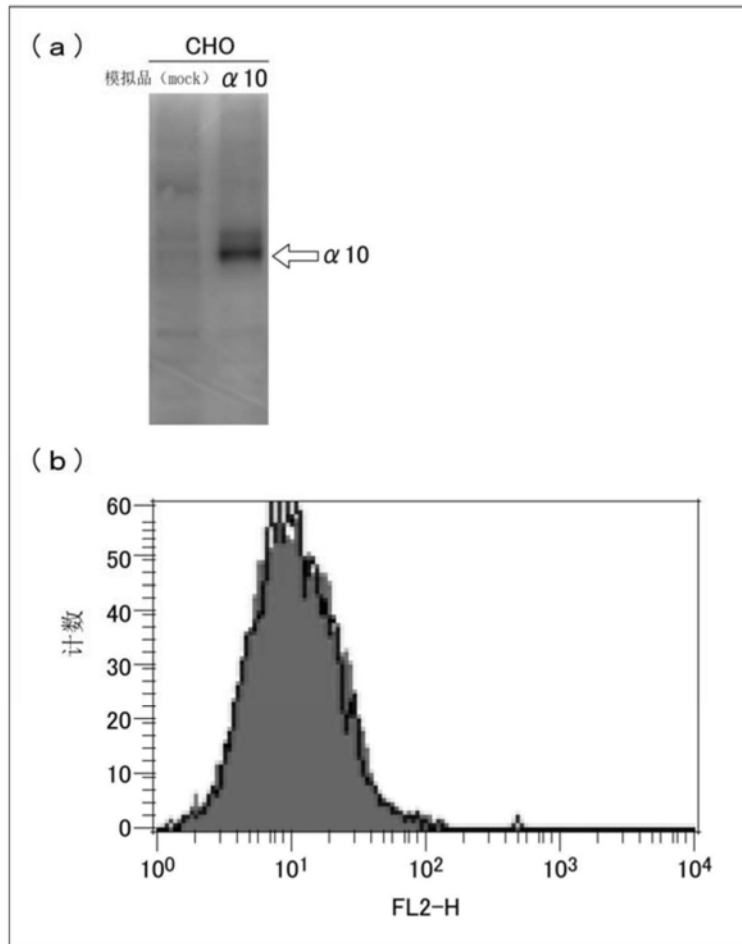


图4

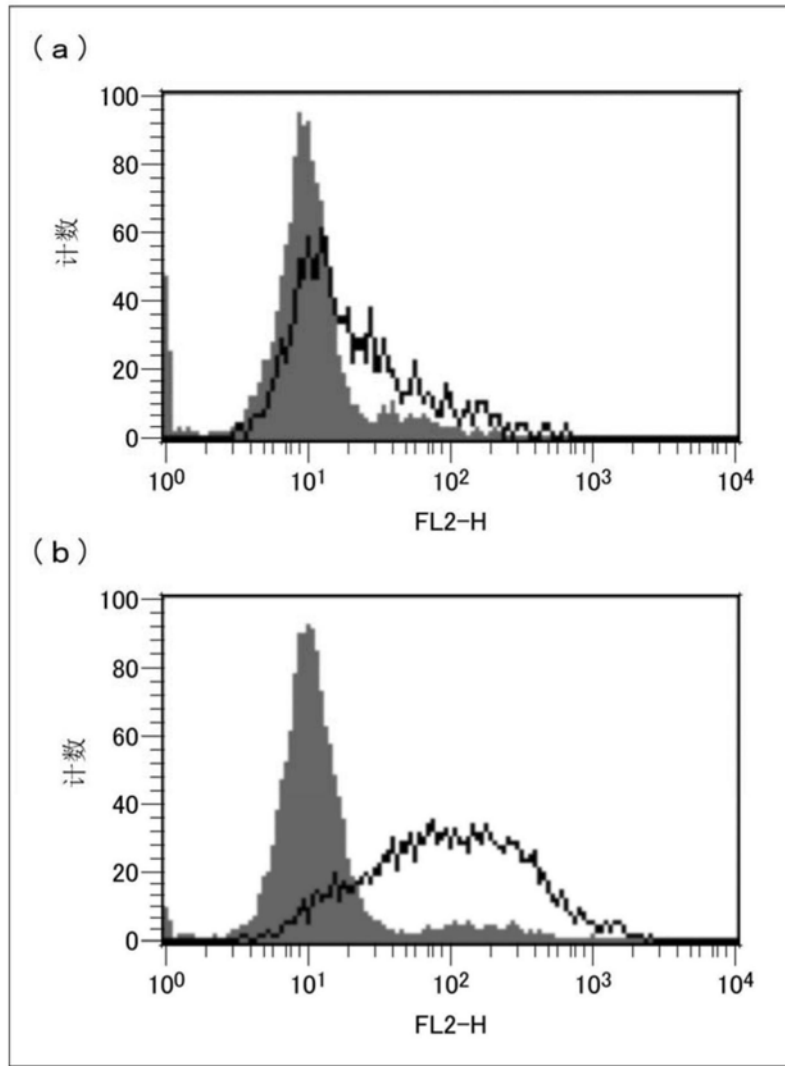


图5

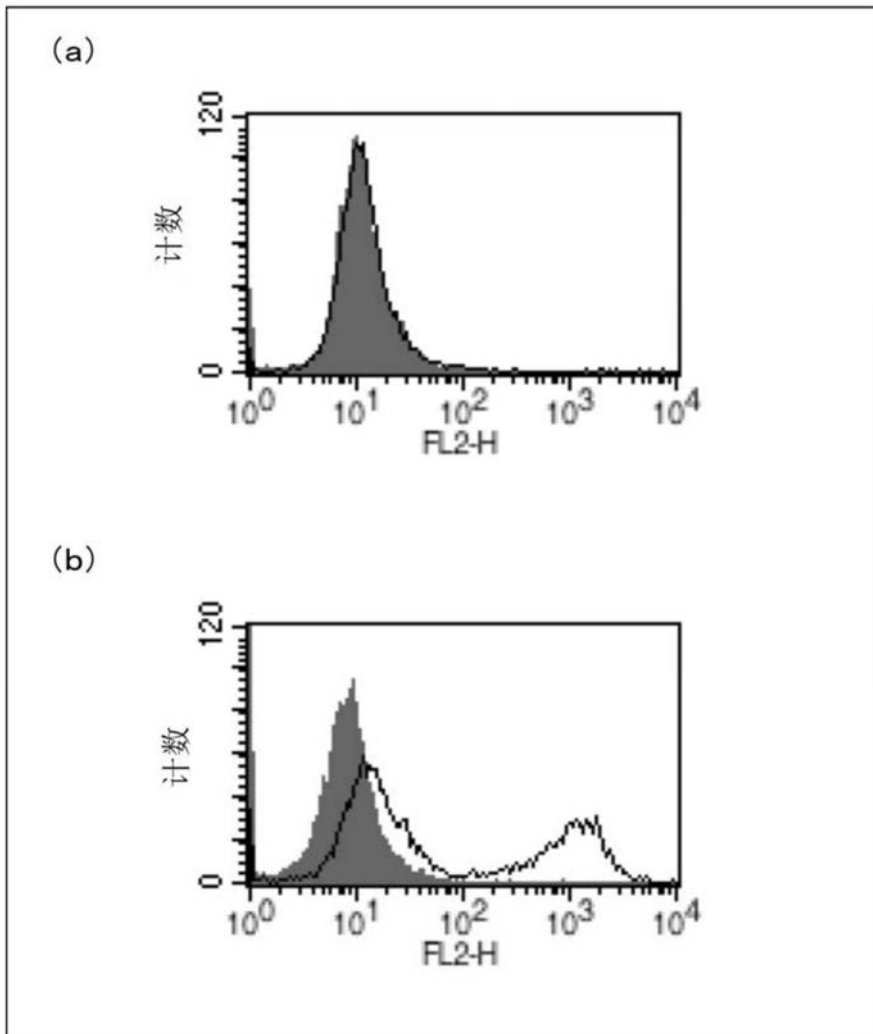


图6

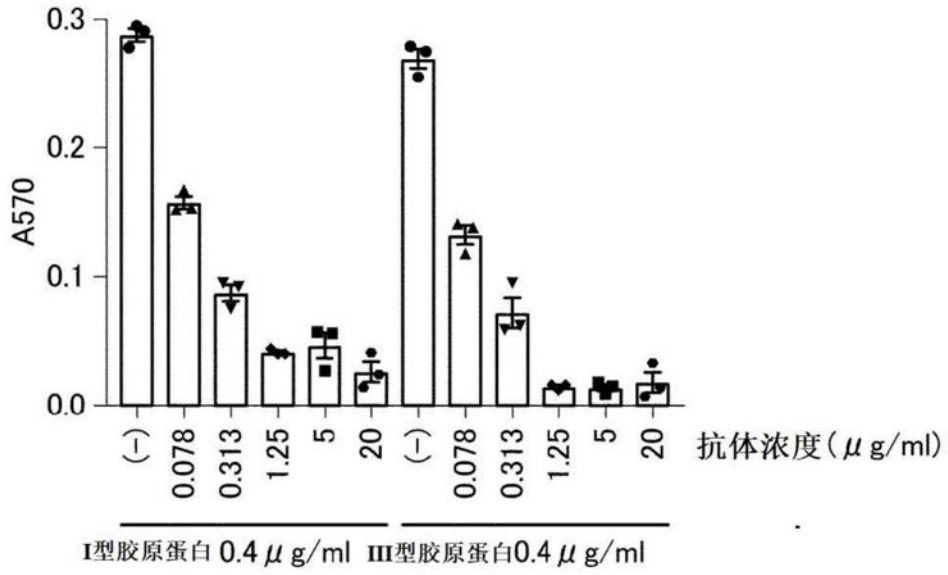


图7

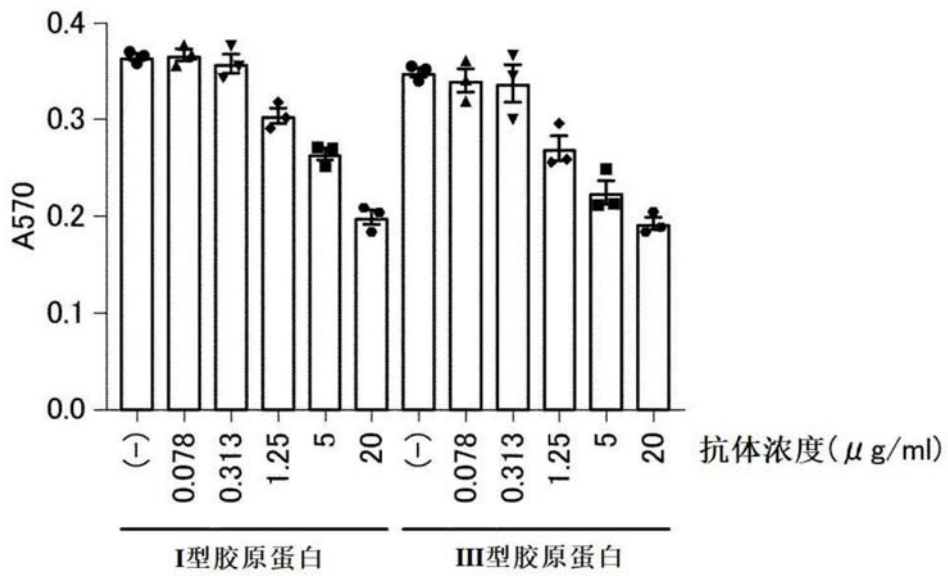


图8

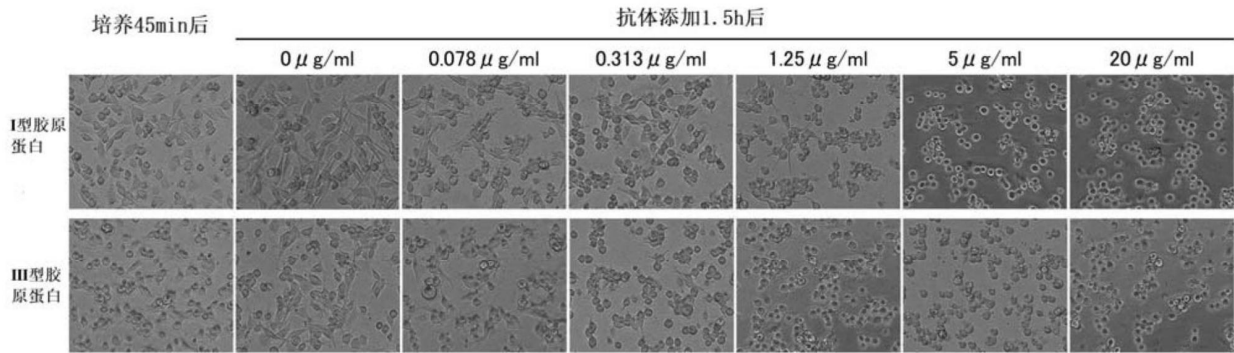


图9

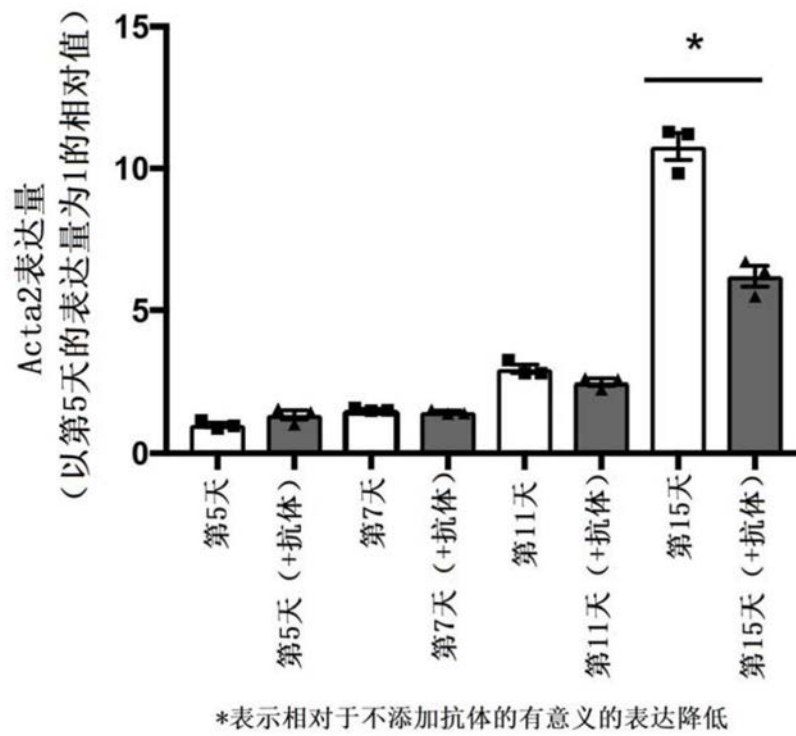


图10

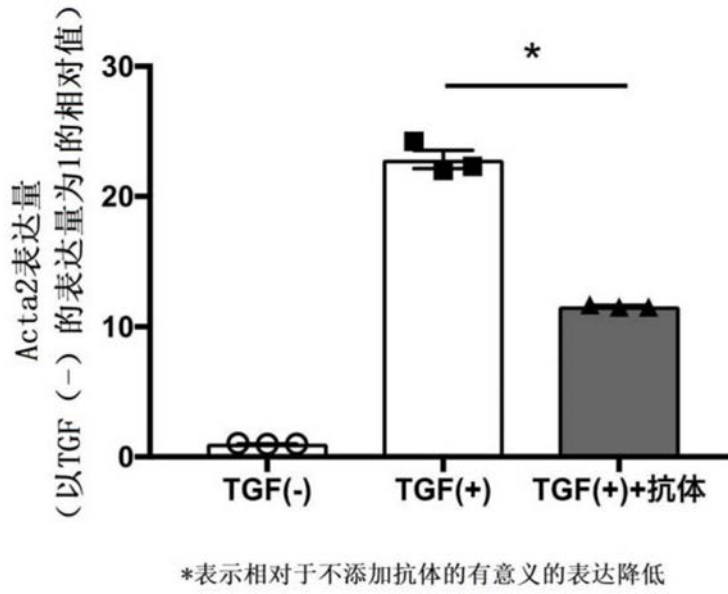


图11

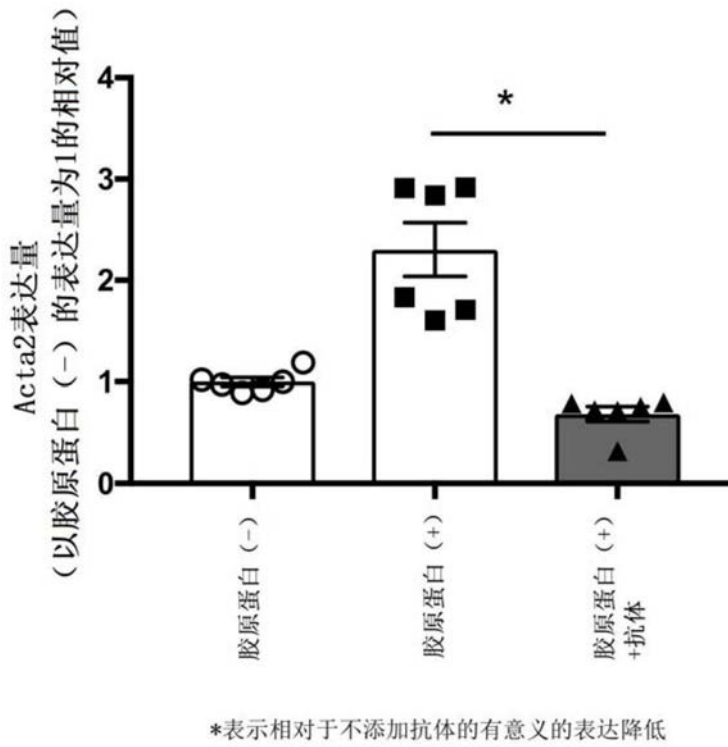


图12

野生型#33	<u>GYGYCWY</u>
#33-45	<u>SAGWCWM</u>
#33-46	<u>HTDWCWM</u>
#33-52	<u>EFGWCWM</u>
#33-72	<u>SSVDCWM</u>
#33-92	<u>SMGWCWM</u>
#33-104	<u>SEAWCWM</u>

图13

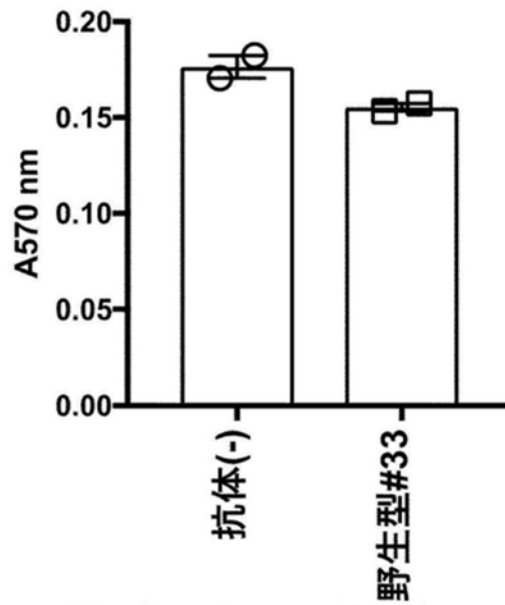


图14

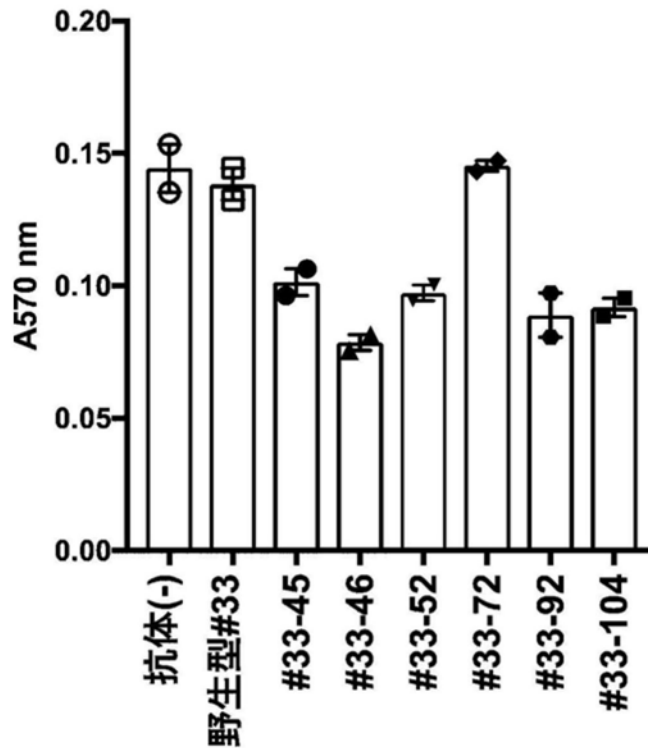


图15

(人) QTYMDIVIVLDGSNSIYPWVEVQHFLINILKKFYIGPGQIQVGVVQYGEDVVHEFHLNDY
 (小鼠) QTYMDIVIVLDGSNSIYPWVEVQHFLINILKKFYIGPGQIQVGVVQYGEDAVHEFHLNDY
 (鸡) QTYMDIIVLDGSNSIYPWVEVQHFLINILKKFYIGPGQIQVGVVQYGEDVVHEFHLNDY

(人) RSVKDVVEAASHIEQRGGTETRRTAFGIEFARSEAFQKGGGRKGAKKVMIVITDGESHDSPD
 (小鼠) RSVKDVVEAASHIEQRGGTETRRTAFGIEFARSEAFQKGGGRKGAKKVMIVITDGESHDSPD
 (鸡) RSVKDVVAASHIEQRGGTETRRTAYGIEFARSEAFQKGGGRKGAKRVMIVITDGESHDSPD

(人) LEKVIQQSERDNVTRYAVAVLGYNRRGINPETFLNEIKYIASDPDDKHFFNVTDEAALK
 (小鼠) LEKVIRQSEKDNVTRYAVAVLGYNRRGINPETFLNEIKYIASDPDDKHFFNVTDEAALK
 (鸡) LEKVIEDSEKDNVTRYAVAVLGYNRRGINPEAFLNEIKFIASDPDDKHFFNVTDEAALK

(人) DIVDALGDRIFSLEGTNKNETSFGLEM
 (小鼠) DIVDALGDRIFSLEGTNKNETSFGLEM
 (鸡) DIVDALGERIFSLEGTNKNEISFGLEM

图16