

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年8月12日(12.08.2010)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/090272 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 16/18 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61P 43/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/051639
- (22) 国際出願日: 2010年2月4日(04.02.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-025707 2009年2月6日(06.02.2009) JP
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 学校法人東京理科大学(TOKYO UNIVERSITY OF SCIENCE EDUCATIONAL FOUNDATION ADMINISTRATIVE ORGANIZATION) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 深井 文雄 (FUKAI, Fumio) [JP/JP]; 〒1628601 東京都新宿区神楽坂一丁目3番地 学校法人東京理科大学内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 中島 淳, 外(NAKAJIMA, Jun et al.); 〒1600022 東京都新宿区新宿4丁目3番17号 H K新宿ビル7階 太陽国際特許事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト(規則5.2(a))



WO 2010/090272 A1

(54) Title: REMEDY FOR CHRONIC INFLAMMATION AND ANTIBODY TO BE USED THEREIN

(54) 発明の名称: 慢性炎症治療剤及びこれに用いる抗体

(57) Abstract: Provided are a remedy for chronic inflammation which comprises an antibody capable of recognizing a peptide (TNIII A2) derived from partial sequence A2 of human Tenascin-C fibronectin III-like repeats; and the anti-TNIII A2 antibody to be used therein.

(57) 要約: 本発明は、ヒトテネascin Cのフィブロネクチン III 様反復配列の A 2 配列部分に由来するペプチド(TN III A 2)を認識する抗体を含む慢性炎症治療剤と、これに用いられる抗TN III A 2抗体を提供する。

明 細 書

発明の名称：慢性炎症治療剤及びこれに用いる抗体

技術分野

[0001] 本発明は、慢性炎症治療剤及びこれに用いる新規抗体に関する。

背景技術

[0002] テネイシンCは、免疫組織を除いた正常細胞においてはほとんど発現が認められないが、炎症、腫瘍等の病態時に発現が誘導される化合物である。

テネイシンCを検出する方法として、いくつかの抗テネイシンC抗体が知られている（例えば、特開2004-217546号公報及び特開2002-234900号公報参照）。またテネイシンCをマーカーとして、関節炎の診断を行なう方法が知られている（例えば、特開2004-138489号公報参照）。

[0003] テネイシンCを構成するポリペプチドには、上皮増殖因子様ドメイン、フィブロネクチン（FN）III様ドメイン、およびフィブリノーゲン様ドメインが含まれている。このうちFNIII様ドメインでは、基本的な8種の反復配列（1-8）と、その5番目と6番目の間に挿入される9種のスプライシングされる反復配列（A1、A2、A3、A4、B、AD2、AD1、C、D）とが連続していることが知られている。またこれらのスプライシングされる反復配列部位は、マトリックスメタロプロテアーゼ（MMP）で切断されやすい部位であり、テネイシンCがMMPにより切断されて生成するペプチドは種々の機能を有していると考えられている。

[0004] 一方、慢性炎症においては、マクロファージなどの単球やリンパ球などの免疫系細胞が、血管から血管内皮を浸潤し、血管基底膜を突き抜けてその炎症部位に集まっていることが知られている。このような炎症部位における免疫系細胞の浸潤は、免疫系細胞膜上の接着分子インテグリンを介した免疫系細胞と血管内皮細胞・細胞外マトリクスとの相互作用で調節されている。インテグリンには活性型と不活性型の2つのコンフォメーションがあり、活性

型のみが細胞外マトリクスに接着しうることが知られている。

インテグリンの活性化を引き起こすペプチドとして、テネイシンCのFNIII様ドメインにおけるA2ドメインに由来するペプチド（以下、「TNIIIA2」ということがある）が知られている（例えば、J. Biol. Chem., Vol. 282, pp. 34929-34937（2007）参照）。

しかしながら、テネイシンCおよびそれに由来するペプチドの炎症部位における役割については詳細が不明であり、特に慢性炎症との関係性については明確な知見は得られていなかった。さらに従来知られている抗テネイシンC抗体では、炎症に対する作用が部位によって相反する場合があった。

発明の概要

課題を解決するための手段

[0005] 本発明は、慢性炎症に効果的な新たな薬剤を提供することを課題とする。

本発明の第一の態様は、ヒトテネイシンCのフィブロネクチンIII様反復配列のA2配列部位に由来するペプチドを認識する抗TNIIIA2抗体を提供する。前記抗体は配列番号1のアミノ酸配列を含むペプチドを認識することが好ましい。

本発明の第二の態様は、前記抗体を含む免疫系細胞の血管からの浸潤抑制剤を提供する。

本発明の第三の態様は、前記抗体を含む炎症細胞の細胞死誘導剤を提供する。

本発明の第四の態様は、前記抗体を含む慢性炎症治療剤を提供する

本発明によれば、慢性炎症に対する新たな薬剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0006] [図1]本発明の実施例1にかかるペプチドTNIIIA2誘導性の細胞接着に対する抗ヒトTNIIIA2抗体の抑制効果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0007] 本発明の抗体は、ヒトテネイシンCのフィブロネクチンIII様反復配列のA

2配列部位に由来するペプチドを認識する抗TNIII A 2抗体である。

本発明の抗体は、ヒトテネインCのフィブロネクチンIII様反復配列におけるA 2配列部分に由来するペプチド(TNIII A 2)を認識する。前記抗体がTNIII A 2に選択的に結合することにより、TNIII A 2によって誘導され得る免疫系細胞の浸潤を、抑制することができる。

本発明者は、ヒトテネインCに由来するペプチドTNIII A 2が、免疫系細胞の浸潤および、炎症部位における炎症細胞の細胞死の誘導機構に関与することを見出した。本発明は、この知見に基づくものである。

[0008] 本明細書において「工程」との語は、独立した工程だけでなく、他の工程と明確に区別できない場合であっても本工程の所期の作用が達成されれば、本用語に含まれる。

また、本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値及び最大値として含む範囲を示す。

以下、本発明について説明する。

[0009] 本発明における抗TNIII A 2抗体は、ヒトテネインCのFNIII様ドメインのA 2配列部分に由来するペプチド(TNIII A 2)を認識できるものであれば特に制限はなく、モノクローナル抗体であってもポリクローナル抗体であってもよい。

[0010] TNIII A 2は、RSTDLPLGLKAATHYTITIRGVC(配列番号1)の22個のアミノ酸からなるペプチドである(J. Biol. Chem., Vol. 282, pp. 34929-34937 (2007) 参照)。本発明の抗TNIII A 2抗体は、TNIII A 2を認識する抗体であって、配列番号1で示されるTNIII A 2のアミノ酸配列のうち少なくとも一部をエピトープとするものである。抗TNIII A 2に認識されるエピトープとしては、YTITIRGV(配列番号2)のアミノ酸配列を含む部分ペプチドであればよい。

[0011] 前記TNIII A 2を認識する抗体を作製するために用いられるペプチド、即ち本発明にかかる抗TNIII A 2抗体が認識するペプチド(標的ペプチド)としては、配列番号2を含むペプチドであればよく、全長(配列番号1)であ

ってもよい。抗原性や安定性を高める観点から、配列番号2のアミノ酸配列を有するペプチドに、リンカー機能又はリンカー機能を有する1つ以上の化合物、たとえばアミノ酸を追加してもよい。このような付加的なアミノ酸としては、キャリアタンパク質を結合するためのアミノ酸を配列番号2のアミノ酸配列を有するペプチドに付与可能とするアミノ酸を挙げることができ、例えばシステイン、酸性アミノ酸または塩基性アミノ酸等を挙げることができる。標的ペプチドとしては、中でも、C A T H T I T I R G V（配列番号3）のアミノ酸配列であることが、抗体作製効率の観点から更に好ましい。

[0012] 前記 T N I I I A 2 を認識する抗体は、上述した標的ペプチドを用いて、通常行われる方法によって調製することができる。

例えば、ポリクローナル抗体であれば、次のようにして得てもよい。前記配列番号1～配列番号3のアミノ酸配列のいずれか又はこれらの混合物を標的ペプチドとして使用し、この標的ペプチドをウサギ等の小動物に免疫して血清を得る。得られた血清を公知の抗体精製手段、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、前記特定ペプチドをカップリングしたアフィニティカラム等を用いることによって本抗体を精製することで調製できる。

[0013] また、例えばモノクローナル抗体であれば、前記標的ペプチドを、マウスなどの小動物に免疫を行い、同マウスより脾臓を摘出し、これをすりつぶして細胞を分離し、マウスミエローマ細胞とポリエチレングリコールなどの試薬により融合させ、これにより形成された融合細胞（ハイブリドーマ）の中から、前記標的ペプチドと結合する抗体を産生するクローンを選択する。次いで選択したハイブリドーマをマウス腹腔内に移植し、同マウスより腹水を回収し、得られたモノクローナル抗体を、例えば、硫酸沈殿、プロテインA、プロテインGカラム、DEAEイオン交換クロマトグラフィー、前記特定ペプチドをカップリングしたアフィニティカラム等を用いることによって本抗体を精製することで調製できる。

[0014] なお標的ペプチドは、抗原性を高めるために公知のキャリアタンパク質と

の融合タンパク質として免役に用いてもよい。このようなキャリアタンパク質としては、この目的で使用される公知の分子であれば特に制限なく使用することができ、例えば、KLH、GST、BSAなどを挙げることができる。

[0015] 本発明の抗TNF α 抗体によって浸潤が抑制される免疫系細胞としては、炎症部位において浸潤が観察される免疫系細胞であれば特に制限はない。このような免疫系細胞としては、好中球、好酸球、好塩基球、単球、リンパ球（プラズマ細胞を含む）やこれらの2種以上の組み合わせなどを挙げることができる。

本発明の抗TNF α 抗体は、特定理論に限定されないが、例えば、テネイシンC等によって誘導される免疫系細胞の表面に発現しているインテグリンの活性化を阻害することで、免疫系細胞の細胞外マトリクス（例えば、フィブロネクチン等）への接着を抑制することができると推測される。従って、本抗TNF α 抗体を用いることによって、免疫系細胞が血管内皮下へ浸潤することを抑制することができる。

[0016] また、慢性炎症における炎症部位においては、活性化した常在の免疫系細胞又は浸潤した免疫系細胞（これらの細胞を総称して「炎症細胞」ということがある）が通常に比べて長期に渡って生存することが知られている。本発明の抗TNF α 抗体は、このような炎症細胞の細胞死を誘導して、長期生存を抑制することができる。

[0017] 本発明の慢性炎症治療剤は、前記抗TNF α 抗体を含む。

抗TNF α 抗体を含むことにより、炎症部位における免疫系細胞の浸潤を抑制し、さらに炎症細胞の細胞死を誘導して炎症細胞の長期生存を抑制することで、慢性炎症を治療することができる。

前記慢性炎症治療剤の治療対象は、哺乳動物であることが好ましく、ヒトであることがより好ましい。

[0018] 本発明の慢性炎症治療剤は、経口的にまたは非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、

腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤などを選択することができる、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。また投与量についても患者の年齢、症状等により適宜選択することができる。

[0019] 本発明の慢性炎症治療剤は、投与経路に応じて医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜選択されるが、これらに限定されるものではない。

[0020] 本発明の免疫系細胞の浸潤抑制剤は、前記抗TNF α 抗体を含む。

抗TNF α 抗体を含むことにより、免疫系細胞の血管内皮下への浸潤を抑制することができ、例えば、慢性炎症抑制作用等を示すことができる。

前記免疫系細胞の浸潤抑制剤は、必要に応じて他の成分をさらに含んで構成することができる。他の成分としては前記慢性炎症治療剤における医薬的に許容される担体や添加物を同様に用いることができる。

[0021] 本発明の炎症細胞の細胞死誘導剤は、前記抗TNF α 抗体を含む。抗TNF α 抗体を含むことにより、炎症部位において炎症細胞の細胞死を誘導して長期生存を抑制し、例えば、慢性炎症による症状の緩和作用等を示すことができる。

前記炎症細胞の細胞死誘導剤は、必要に応じて他の成分をさらに含んで構成することができる。他の成分としては前記慢性炎症治療剤における医薬的

に許容される担体や添加物を同様に用いることができる。

[0022] また、本発明は、慢性炎症を生じている又は生じることが予測される患者に対して、本発明にかかる上述した抗TNF α 抗体を含む薬剤を投与することを含む慢性炎症治療又は予防方法を含む。ここで、「慢性炎症治療」には、症状の改善であればよく、症状の緩和や、重症化の抑制も、この用語に包含される。これにより、慢性炎症の症状、又は炎症によって生じる症状を予防又は、軽減若しくは緩和することができる。

[0023] 患者への投与量としては、適用される薬剤の剤型や、患者の性別、年齢、症状等又はこれらの組み合わせによって異なるが、一般に、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤、好ましくは静脈内注射とすることができる。

患者への投与方法としては、適用される薬剤の剤型や、患者の性別、年齢、症状等又はこれらの組み合わせによって異なるが、経口投与、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射、坐薬、注腸、経口性腸溶剤を挙げることができ、これらの投与方法から患者の状態によって適宜選択すればよい。本発明の抗体の治療上有効用量は、症状の程度や患者の状態によって異なるが、例えば、約0.1mg/kg体重～約50mg/kg体重とすることができるが、これに限定されない。また、投与頻度は、例えば、毎日2回ないし1週間に1回の範囲とすることができるが、これに限定されない。

実施例

[0024] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。尚、特に断りのない限り、「%」は質量基準である。

[0025] [実施例1]

<抗ヒトTNF α 抗体の作製>

配列番号3のアミノ酸配列を有するペプチドを常法により合成した。合成したペプチドを、ハプテンとしてKLHに融合し、得られた融合ペプチドを抗原ペプチドとして用いた。免疫は家兎を用いた通常の方法に従って行った

。得られた目的とする抗体を含む混合物を通常の方法により精製した。

以上のようにして、ヒトTNIII A 2に対するポリクローナル抗体（抗ヒトTNIII A 2抗体）を3種類（No. 1～No. 3）得た。

[0026] <抗体活性の評価>

上記で得られた抗ヒトTNIII A 2ポリクローナル抗体の抗体活性を、ヒトTNIII A 2によって誘導される細胞接着の抑制作用を指標とし、以下のようにして評価した。結果を図1に示した。

[0027] 細胞培地としてRPMI 1640（20%FBS添加）を用い、KOP2. 16細胞（マウス骨髄由来血管内皮細胞株）を96穴プレートの各ウェルに 5×10^4 cells / 200 μ L / wellの密度で播種し、37°C、5%CO₂で4時間培養した。培養上清の100 μ Lを取り除き、20%TCA水溶液を100 μ L添加した後、4°Cで一晩もしくは常温で1時間放置して固相化した。これをPBS×5、RPMI 1640（20%FBS添加）×1、PBS×1で順次洗浄し、各ウェルをKOP2. 16細胞でコートした96穴プレートを作製した。

[0028] 上記で得られたKOP2. 16細胞でコートした96穴プレートの各ウェルに12. 5 μ g / mLのヒトTNIII A 2を含むRPMI 1640（20%FBS添加）を加えた。上記で得られた抗ヒトTNIII A 2抗体（No. 1～3）を濃度が1. 5 μ g / mL、3 μ g / mL、6 μ g / mLとなるようにそれぞれ添加し、K562細胞（白血病細胞株）を 1.5×10^4 cells / wellの密度でそれぞれ播種して、37°C、5%CO₂で1時間培養した。

ホルマリンを添加してさらに1時間常温で放置して固定した後、PBSで3回洗浄し、リリーマイヤー・ヘマトキシリン染色を行なった。光学顕微鏡で観察し、所定の視野内の接着細胞数を計数した。

[0029] 図1から、正常ウサギIgGではヒトTNIII A 2によって誘導される細胞接着は抑制されないのに対して、本発明の抗ヒトTNIII A 2抗体は細胞接着を用量依存的に抑制することが分かる。またNo. 1～3のいずれの抗ヒト

TNIII A 2抗体も同等の抗体活性を示すことが分かる。さらに本発明の抗ヒトTNIII A 2抗体は、マグネシウムイオンで誘導される細胞接着の抑制作用を示さなかった。

以上から、本発明の抗ヒトTNIII A 2抗体は、ヒトTNIII A 2に特異的に結合し、その機能を抑制できることが分かる。

[0030] [実施例 2]

<浸潤抑制性評価 1 >

抗ヒトTNIII A 2抗体による、Jurkat細胞（T細胞系細胞株）の血管内皮に対する浸潤抑制を以下のようにして評価した。

96穴プレートの各ウェルにヒトテネイシンCを $5\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加し、 37°C で1時間インキュベートした。BSAを $2.5\text{mg}/\text{mL}$ の濃度で加えて、 37°C で1時間インキュベートしてブロッキングした。PBSで3回で洗浄し、各ウェルをヒトテネイシンCでコートしたアッセイ用ウェルプレートを得た。

次いで、このアッセイ用ウェルプレートの各ウェルに、DMEM（+）培地に懸濁したKOP2.16（マウス骨髄由来血管内皮細胞）を $5.0 \times 10^4\text{ cells}/\text{well}$ の条件で播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で3時間培養した。これによりヒトテネイシンCでコートしたウェル上にKOP2.16細胞からなる単層を形成した。

[0031] Jurkat細胞の懸濁液に、正常ウサギIgGまたは抗ヒトテネイシンC抗体を濃度が $20\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加した後、KOP2.16細胞からなる単層上に $1.0 \times 10^4\text{ cells}/\text{well}$ の密度になるように静かに播種し、 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で3時間培養した。

[0032] ホルマリンを添加してさらに1時間常温で放置して固定した後、PBS（-）で3回洗浄し、リリーマイヤー・ヘマトキシリン染色を行なった。光学顕微鏡（ $\times 200$ ）下で、予め定めた4つの領域内の浸潤数をそれぞれ3つのウェルについて計数し、その算術平均値を浸潤数とした。

ヒトテネイシンCを添加しなかった場合の浸潤数を同様にして計数し、こ

れをバックグラウンドとして差し引いた浸潤数を表 1 に示した。さらに、正常ウサギ I g G と抗ヒト T N I I I A 2 抗体とにおける浸潤数差の、正常ウサギ I g G における浸潤数に対する比を浸潤抑制率 (%) として算出した。

[0033] また、J u r k a t 細胞の代わりに、T H P - 1 (単球様細胞株) を用いた以外は上記と同様にして、抗ヒト T N I I I A 2 抗体による、T H P - 1 の血管内皮に対する浸潤抑制を評価した。結果を表 1 に示した。

[0034] [表1]

	Jurkat	THP-1
正常ウサギIgG	27	41
抗ヒトTNIIIA2抗体	7	1
浸潤抑制率(%)	74%	98%

[0035] 表 1 から、本発明の抗ヒト T N I I I A 2 抗体は、T リンパ球系細胞および単球様細胞のヒトテネイン C に誘導された血管内皮細胞層への浸潤を効果的に抑制できることがわかる。

[0036] [実施例 3]

<浸潤抑制性評価 2 >

実施例 1 で得られた抗ヒト T N I I I A 2 抗体の浸潤抑制効果を、ヒトテネイン C に対する他の抗体 4 F 1 0 T T 及び正常ウサギ I g G と以下のようにして比較した。

4 F 1 0 T T は、ヒトテネイン C の上皮増殖因子様ドメインのペプチド配列を認識するウサギ I g G 抗体であり、(株)免疫生物研究所より入手したものを使用した (Tsunoda T. et al., Am J Pathol 162: 1857-1867, 2003 ; Sato A. et al., J Am Coll Cardiol 47: 2319-2325, 2006)

上記の抗体をそれぞれ用いた以外は実施例 2 と同様にして、K O P 2 . 1 6 細胞の単層へ浸潤した J u r k a t 細胞の個数を測定した。

[0037] 如何なる抗体も添加しない場合の浸潤数を同様にして計数した。抗体を添加しないときの浸潤数に対する浸潤数の比率を、正常マウス I g G を添加し

た場合 (normal IgG)、4 F 1 0 T T を添加した場合、抗ヒト T N I I I A 2 抗体を添加した場合をそれぞれについて算出した。結果を表 2 に示した (「Coated TNC」)。

[0038] また、ヒトテネイン C で各ウェルをコートしたアッセイ用プレートの代わりに、未コートの 9 6 穴プレートを用意し、ヒトテネイン C を $2 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で各ウェル、総量 $100 \mu\text{L}$ となるように添加した以外は上記と同様にして、各抗体の細胞浸潤抑制効果を評価した。結果を表 2 に示した (「Soluble TNC」)。

[0039] [表2]

Antibody	coated TNC	soluble TNC
-	1	1
normal IgG	1.05	1.05
4F10TT	1.04	1.07
anti-TNIIIA2	0.74	0.84

[0040] 表 2 の結果から、ヒトテネイン C 由来のペプチドを認識する抗体であっても細胞浸潤抑制に対する効果が異なり、本発明にかかる抗 T N I I I A 2 抗体は、4 F 1 0 T T と比較して強い細胞浸潤抑制効果を示すことが分かる。

[0041] [実施例 3]

<長期生存抑制性評価>

ヒトテネイン C 存在下における、マクロファージの生細胞数の時間変化に対する抗ヒト T N I I I A 2 抗体の効果を以下のようにして評価した。

[0042] PMA を濃度 $10 \text{ ng}/\text{mL}$ で添加した完全培地中で、T H P - 1 細胞を 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ で 24 時間培養し、マクロファージに分化誘導した (以下、分化した T H P - 1 を「PMA-T H P - 1」という)。

[0043] 9 6 穴プレートの各ウェルにフィブロネクチン (FN) を $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で添加し、 37°C で 1 時間インキュベートした。BSA を $2.5 \text{ mg}/\text{mL}$ の濃度で加えて、 37°C で 1 時間インキュベートしてブロッキングした。PBS $\times 3$ で洗浄し、各ウェルが FN コートされたプレートを作製した。

[0044] FNコートしたウェルに、ヒトテネイシンCを最終濃度が $2\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加したRPMI 1640（無血清）培地を加え、さらに正常ウサギIgG、4F10TT抗体、または抗ヒトTNIIIA2抗体を最終濃度が $50\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように加えた。ここにPMA-THP-1細胞を $2\sim 2.5\times 10^4\text{cells}/\text{well}$ の密度になるように播種し、 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ で24時間培養した。

WST法に準じたCell Counting Kit（DOUJIN社製）を用いて細胞数を計数し、播種時の生細胞数（day 0）に対する培養後の生細胞数（day 2）の比率（生細胞数比）を算出した。結果を表3に示した。

[0045] [表3]

	Antibody	cell count ratio	
day 0		1	
day 2	-	1.52	1
	normal IgG	1.48	0.97
	4F10TT	1.57	1.03
	anti-TNIIIA2	0.93	0.61

[0046] 表3から、ヒトテネイシンCが存在するとマクロファージが増殖していることが分かる。これに対して抗ヒトTNIIIA2抗体を加えた場合には、マクロファージの増殖が抑制されること（抗体無添加の細胞数との比では0.61）、さらに生細胞数が減少していること（播種時の細胞数との比では0.93）が分かる。すなわち、抗ヒトTNIIIA2抗体は、ヒトテネイシンC存在下におけるマクロファージの長期生存を抑制できることが分かる。

また、抗ヒトTNIIIA2抗体による生細胞数の減少は、細胞死によるものであった。

[0047] 以上から、本発明の抗ヒトTNIIIA2抗体は、免疫系細胞の血管内皮下への浸潤を抑制することができ、さらにヒトテネイシンC存在下における炎症細胞の細胞死を誘導することができることが分かる。

[0048] 2009年2月6日に出願された日本国特許出願第2009-02570

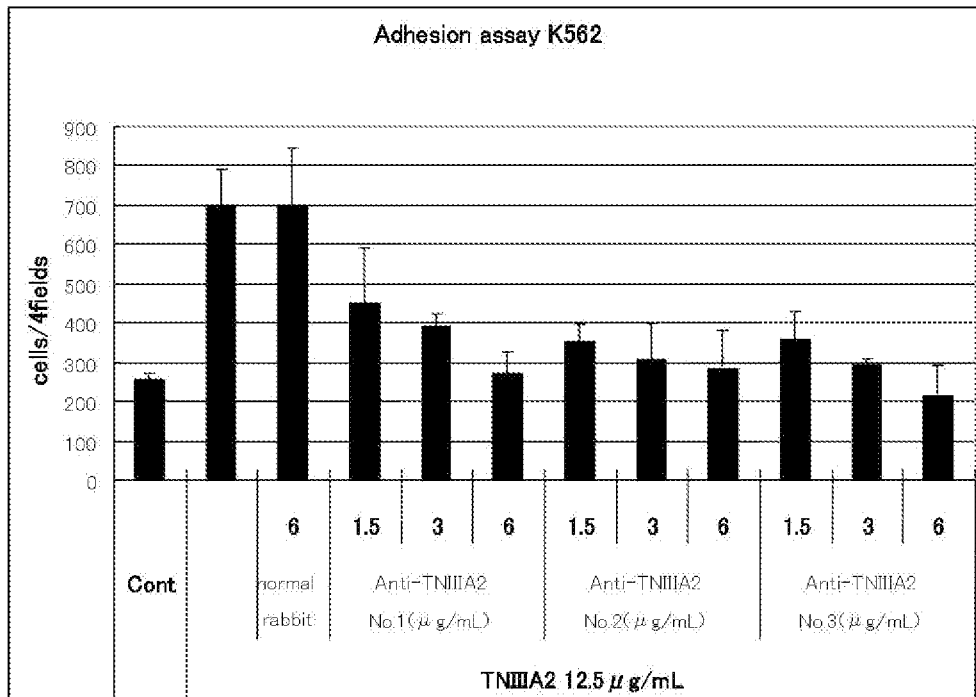
7号の開示はその全体が参照により本明細書に取り込まれる。

本明細書に記載された全ての文献、特許出願、および技術規格は、個々の文献、特許出願、および技術規格が参照により取り込まれることが具体的かつ個々に記された場合と同程度に、本明細書中に援用されて取り込まれる。

請求の範囲

- [請求項1] ヒトテネイシンCのフィブロネクチンIII様反復配列のA2配列部分に由来するペプチドを認識する抗体。
- [請求項2] 配列番号2のアミノ酸配列を含むペプチドを認識する請求項1に記載の抗体。
- [請求項3] 請求項1または請求項2に記載の抗体を含む免疫系細胞の浸潤抑制剤。
- [請求項4] 請求項1または請求項2に記載の抗体を含む炎症細胞の細胞死誘導剤。
- [請求項5] 請求項1または請求項2に記載の抗体を含む慢性炎症治療剤。

[1]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051639

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/18(2006.01) i, A61K39/395(2006.01) i, A61P29/00(2006.01) i, A61P43/00(2006.01) i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/18, A61K39/395, A61P29/00, A61P43/00 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2010 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2010 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2010 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yohei Saito et al. "A Peptide Derived from Tenascin-C Induces β 1 Integrin Activation through Syndecan-4" J. Biol. Chem., vol.282, p.34929-34937 (2007), page 34930, left column, lines 20 to 43	1,2
Y	Takatsugu Tsunoda et al. "Involvement of Large Tenascin-C Splice Variants in Breast Cancer Progression" Am. J. Pathol., vol.162, p.1857-1867 (2003), page 1857, Abstract	1,2
A	Masahiro Hasegawa et al. "Tenascin-C Concentration in Synovial Fluid Correlates with Radiographic Progression of Knee Osteoarthritis" J. Rheumatol., vol.31, p.2021-2026 (2004)	1-5
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 31 March, 2010 (31.03.10)		Date of mailing of the international search report 13 April, 2010 (13.04.10)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/051639

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Ruth Chiquet-Ehrismann and Matthias Chiquet "Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress" J. Pathol., vol.200, p.488-499 (2003)	1-5
A	Margret Dueck et al. "Detection of Tenascin-C Isoforms in Colorectal Mucosa, Ulcerative Colitis, Carcinomas and Liver Metastases" Int. J. Cancer, vol.82, p.477-483 (1999)	1-5
A	Donald Gullberg et al. "Tenascin-C expression correlates with macrophage invasion in Duchenne muscular dystrophy and in myositis" Neuromuscular Disorders, vol.7, p.39-54 (1997)	1-5
A	Yohei Saito et al. "Inhibition of Argiogenesis by a Tenascin-C Peptide which Is Capable of Activating Beta1-Integrins" Biol. Pharm. Bull., vol.31, p.1003-1007 (2008)	1-5

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P29/00(2006.01)i, A61P43/00(2006.01)i</p>												
<p>B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/18, A61K39/395, A61P29/00, A61P43/00</p>												
<p>最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの</p> <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2010年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2010年</td> </tr> </table>			日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2010年	日本国実用新案登録公報	1996-2010年	日本国登録実用新案公報	1994-2010年		
日本国実用新案公報	1922-1996年											
日本国公開実用新案公報	1971-2010年											
日本国実用新案登録公報	1996-2010年											
日本国登録実用新案公報	1994-2010年											
<p>国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, PubMed</p>												
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>Yohei Saito et al. "A Peptide Derived from Tenascin-C Induces β1 Integrin Activation through Syndecan-4" J. Biol. Chem., vol.282, p.34929-34937 (2007) 第 34930 頁左欄第 20 行~第 43 行</td> <td>1, 2</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>Takatsugu Tsunoda et al. "Involvement of Large Tenascin-C Splice Variants in Breast Cancer Progression" Am. J. Pathol., vol.162, p.1857-1867 (2003) 第 1857 頁 Abstract</td> <td>1, 2</td> </tr> </tbody> </table>			引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号	Y	Yohei Saito et al. "A Peptide Derived from Tenascin-C Induces β 1 Integrin Activation through Syndecan-4" J. Biol. Chem., vol.282, p.34929-34937 (2007) 第 34930 頁左欄第 20 行~第 43 行	1, 2	Y	Takatsugu Tsunoda et al. "Involvement of Large Tenascin-C Splice Variants in Breast Cancer Progression" Am. J. Pathol., vol.162, p.1857-1867 (2003) 第 1857 頁 Abstract	1, 2	
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号										
Y	Yohei Saito et al. "A Peptide Derived from Tenascin-C Induces β 1 Integrin Activation through Syndecan-4" J. Biol. Chem., vol.282, p.34929-34937 (2007) 第 34930 頁左欄第 20 行~第 43 行	1, 2										
Y	Takatsugu Tsunoda et al. "Involvement of Large Tenascin-C Splice Variants in Breast Cancer Progression" Am. J. Pathol., vol.162, p.1857-1867 (2003) 第 1857 頁 Abstract	1, 2										
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>												
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <table border="0"> <tr> <td>「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの</td> <td>「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの</td> </tr> <tr> <td>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</td> <td>「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)</td> <td>「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの</td> </tr> <tr> <td>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」 同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>			「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献	「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの											
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの											
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの											
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」 同一パテントファミリー文献											
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願												
<p>国際調査を完了した日 31.03.2010</p>	<p>国際調査報告の発送日 13.04.2010</p>											
<p>国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子 電話番号 03-3581-1101 内線 3488</p>	<table border="1"> <tr> <td>4N</td> <td>4671</td> </tr> </table>	4N	4671								
4N	4671											

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Masahiro Hasegawa et al. “Tenascin-C Concentration in Synovial Fluid Correlates with Radiographic Progression of Knee Osteoarthritis” J. Rheumatol., vol. 31, p. 2021-2026 (2004)	1-5
A	Ruth Chiquet-Ehrismann and Matthias Chiquet “Tenascins: regulation and putative functions during pathological stress” J. Pathol., vol. 200, p. 488-499 (2003)	1-5
A	Margret Dueck et al. “Detection of Tenascin-C Isoforms in Colorectal Mucosa, Ulcerative Colitis, Carcinomas and Liver Metastases” Int. J. Cancer, vol. 82, p. 477-483 (1999)	1-5
A	Donald Gullberg et al. “Tenascin-C expression correlates with macrophage invasion in Duchenne muscular dystrophy and in myositis” Neuromuscular Disorders, vol. 7, p. 39-54 (1997)	1-5
A	Yohei Saito et al. “Inhibition of Angiogenesis by a Tenascin-C Peptide which Is Capable of Activating Beta1-Integrins” Biol. Pharm. Bull., vol. 31, p. 1003-1007 (2008)	1-5