

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3825255号
(P3825255)

(45) 発行日 平成18年9月27日(2006.9.27)

(24) 登録日 平成18年7月7日(2006.7.7)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
	A 6 1 P 29/00	1 0 1
請求項の数 8 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2000-537570 (P2000-537570)
(86) (22) 出願日 平成11年3月25日 (1999.3.25)
(65) 公表番号 特表2002-507580 (P2002-507580A)
(43) 公表日 平成14年3月12日 (2002.3.12)
(86) 国際出願番号 PCT/GB1999/000943
(87) 国際公開番号 W01999/048523
(87) 国際公開日 平成11年9月30日 (1999.9.30)
審査請求日 平成14年2月28日 (2002.2.28)
(31) 優先権主張番号 9806530.3
(32) 優先日 平成10年3月26日 (1998.3.26)
(33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 397009934
グラクソ グループ リミテッド
GLAXO GROUP LIMITED
イギリス ミドルセックス ユービー6
Oエヌエヌ グリーンフォード パークレ
ー アベニュー グラクソ ウェルカム
ハウス (番地なし)
Glaxo Wellcome Hous
e, Berkeley Avenue G
reenford, Middlesex
UB6 ONN, Great Brita
in
(74) 代理人 100058479
弁理士 鈴江 武彦

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 炎症媒介物質のアンタゴニスト

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

炎症性関節症を治療又は予防するための医薬を製造するための、ヒトOSMに対する抗体の使用。

【請求項2】

前記炎症性関節症が慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎、反応性関節炎からなる群から選択される、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

前記抗体がF(ab')₂、Fab、Fv、ScFvから選択される抗体断片である、請求項1または2に記載の使用。

【請求項4】

前記抗体がヒト化又はキメラ化されている請求項1または2に記載の使用。

【請求項5】

慢性関節リウマチの治療のための、請求項2に記載の使用。

【請求項6】

前記抗体が免疫抑制剤、耐性誘導剤、又は抗炎症剤と併用される、請求項1～5の何れか1項に記載の使用。

【請求項7】

前記抗体がCD+4 T細胞阻害剤、抗CD23抗体、又はTNFアンタゴニストと併用される、請求項6に記載の使用。

10

20

【請求項8】

前記医薬が軟骨からのコラーゲンの放出を阻害又は抑制するために使用される、請求項1に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、炎症性関節症又は炎症性疾患の治療又は予防のための医薬の製造におけるOSMのアンタゴニストの使用、及びこのようなアンタゴニストのスクリーニング法に関する。

【0002】

【従来の技術】

慢性関節リウマチ(RA)は、滑膜の過形成及び単核細胞と多形核白血球(PMN)による著しい細胞の浸潤を特徴とする関節性連結(articular joints)に影響を及ぼす慢性炎症性疾患である。固有の細胞種と浸潤した細胞種との複雑で、よく分かっていない相互作用が、マトロプロテアーゼ(MMP)の慢性的な分泌を引き起こし、関節の軟骨、靭帯、及び肋軟骨下骨の破壊をもたらす(Firestein GS Current Opinion in Rheumatology. 4:348-54, 1992)。RA関節の病理学を引き起こすと推測されている数多くの炎症促進性サイトカイン(pro-inflammatory cytokine)の中で、TNFが中心的な役割を果たしていることが示され、抗TNF療法が明確な有益性を示している(El
liott MJ. et al. Lancet. 344(8930):1105-10, 1994)。TNFは、MMPsの誘導(Dayer JM. et al Journal of Experimental Medicine. 162(6):2163-8, 1985)、他の炎症促進性サイトカインのアップレギュレーション(Ha
worth C. et al. European Journal of Immunology. 21(10):2575-9, 1991 and Dinarello
CA. et al. Journal of Experimental Medicine. 163(6):1433-50, 1986)、及びPMNの接着の増加及び内皮
細胞透過性細胞移動の増加(Smart SJ. Casale TB American Journal of Physiology. 266:L238-45, 1994
)を含む幾つかの病理的効果を媒介する。現在、TNFは、炎症促進性サイトカインカ
スケードの初発因子と考えられているが、その正の制御に関しては、相対的に殆ど知られて
いない(Feldmann M. et al. Annual Review of Immunology. 14:397-440, 1996)。

【0003】

オンコスタチンM(OSM)(Rose TM. Bruce AG. PNAS USA 88(19):8641-5, 1991)は、IL-6、IL-11、白血病増殖阻
止因子(LIF)、毛様体神経栄養因子(CNTF)、及びカルジオトロフィン1(CT
-1)(Taga T. Kishimoto T. Annual Review of Immunology. 15:797-819, 1997)を含むサイトカインファ
ミリーに属する28kDaの糖タンパク質である。全てのメンバーは、ヘテロおよびホモ
ダイマー受容体の複合ファミリーの一員として、共通のシグナリング鎖gp130を有す
る(Grotzinger J. et al. [Article] Proteins. 27(1):96-109, 1997)。OSMは、LIFと共通のヘテロダイマ
ー受容体(LIFr:gp130、タイプI)を共有し、OSMr鎖及びgp130(タイプII)を含むそれ自身の固有の受容体も有する(Mosley B. et al
.[Article] Journal of Biological Chemistry. 271(51):32635-32643, 1996)。OSMは、細胞の増殖と
分化に対する効果が以前から知られていた(Horn D. et al [Journal
al Article] Growth Factors. 2(2-3):157-65, 50

10

20

30

40

50

1990)。最近、OSMは、インビボでマウスに対して強力な炎症促進特性を有することも示され (Modur V. et al. J. Clin Invest. 100:158-168, 1997)、IL-1との強力な協働作用によってエクソビボのモデル系において関節の軟骨の分解を促進することが実証されている (Cawston T. Biochemical & Biophysical Research Communications. 215(1):377-85, 1995)。

【0004】

OSMは、内皮細胞に延長したP-セレクチン(及びE-セレクチン)の増加を誘導し (Yao L. et al. Journal of Experimental Medicine. 184(1):81-92, 1996)、ヒト滑液繊維芽細胞中のウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子の活性を刺激し (Hamilton J. et al. Biochemical & Biophysical Research Communications. 180(2):652-9, 1991)、内皮細胞からのIL-6の強力な誘導物質である (Brown Tj. et al. Journal of Immunology. 147(7):2175-80, 1991 Oct 1)。OSMは、最近、RAの滑液及び滑膜中で計測されたが、OAの滑液及び滑膜では計測されず (Hui W. et al. Annals Of The Rheumatic Diseases. 56(3):184-187, 1997)、その産生は、マクロファージに局限していた (1997, Okamoto H et al. Arthritis and Rheumatism 40(6):1096-1105) 及び Cawstonら (1998, Arthritis and Rheumatism 41(10):1760-1771)。現在まで、この分野におけるさらなる実験は、IL-6サブファミリーのメンバーの類似性に基づく推論的なものである (Carroll G. et al. Inflamm. Res. 47(1998)1-7)。

【0005】

【発明の実施の形態】

本発明者らは、OSMがマクロファージでTNF 分泌を誘導し得ることを発見した。OSMは、MMP-1と複合体を形成してこれを不活化し、それ故、コラーゲンの放出を減少させると予想される組織メタロプロテアーゼ阻害剤-1 (TIMP-1)の産生をアップレギュレートすることを示唆する最近のデータ (Nemoto et al 1996, A&R 39(4), 560-566)に反して、OSMがTNF 分泌を誘導するという本発明者らの発見は、OSMが実際に軟骨の破壊を媒介する役割を果たしているかもしれないということを示唆していた。この発見に基づいて、本発明者らは、他のIL-6ファミリーのメンバーを阻害することなく中和抗OSM抗体の治療的投与だけで、マウスモデルのコラーゲン誘発性関節炎を改善することができることを実証した。その後、TNF とOSMの協働作用により、軟骨からのコラーゲンの放出が促進されることが、T. Cawstonらによって示された (1998, Arthritis and Rheumatism, 41(10)1760-1771)。

【0006】

それ故、本発明によれば、炎症性関節症又は炎症性疾患の治療又は予防のための医薬の製造におけるOSMのアンタゴニストの使用が提供される。とりわけOSMのアンタゴニストの使用は、軟骨からのコラーゲンの放出を阻害又は抑制するための医薬の製造においてなされる。本発明は、さらに、有効量のOSMアンタゴニストをこのような疾患に罹患した患者に投与することを備えた炎症性関節症又は炎症性疾患の治療又は予防法を提供する。

【0007】

アンタゴニストは、OSMとOSM受容体gp130又は他のOSM受容体、OSMr鎖若しくはLIFrとの相互作用を阻害し、あるいはこれらのタンパク質のヘテロダイマーの形成を阻害し、このようにOSMの結合とシグナリングを阻害することにより、炎症促進性サイトカイン及び/又はMMPの合成を減少させることによって機能し得る。本発

10

20

30

40

50

明のアンタゴニストは、それ故、OSM若しくは一以上のOSM受容体の何れかに対するリガンド(gp130、OSMr、又はLIFr)、又はOSMの生物学的活性に影響を与えるようにこれらの相互作用を妨害することができる物質であり得る。以下、本明細書において、OSMに対するアンタゴニストという語は、OSM自身に対するアンタゴニスト又はその受容体の一つに対する受容体の何れかを意味するものと理解し得る。

【0008】

本発明者らは、慢性関節リウマチの滑膜血管の内皮には、P-、及びE-セレクトインがgp130、I型及びII型OSM受容体のシグナリング要素と共存することも実証した。理論に拘泥するものではないが、このことは、滑膜マクロファージによって産生されたOSMは、RA血管内皮に、P及びE-セレクトインのアップレギュレーションを介した白血球の補充の促進を引き起こさせるかもしれないということを示している。特異的な抗体又はフコイダン(fucoïdan)(L-セレクトインのアゴニスト)の何れかによるL-セレクトインの連結反応がヒト単核細胞にOSMの分泌させるという知見は、TNFとP及びE-セレクトインを作動させるためのOSMのさらなる局部的供給源を与えることによって、炎症性応答を増幅するという点で極めて重要である。

10

【0009】

OSMとgp130との相互作用に重要なアミノ酸残基が同定されている。OSMの公表されたアミノ酸配列(Malik et al., 1989, Mol. Cell Biol., 9(7), 2847-53、EMBLデータベースのDNA配列エントリーM27288、Swissprotのタンパク質配列エントリーP13725)から、これらはG120、Q16及びQ20であり、N123及びN124も役割を果たしているかもしれない(配列番号12及び下記参照)。最初の25残基は、シグナルペプチドであり、成熟したタンパク質は、配列AAIGS(配列番号13)から始まる。配列は、記載のごとく、成熟したタンパク質の最初のアミノ酸から番号が付されている。

20

【0010】

配列認識番号12

	1	5	15	25	35
MGVLLTQRTL	LSLVLALLFP	SMASMAAIGS	CSKEYRVLLG	QLQKQTDLMQ	DTSRLLDPYI
45	55	65	75	85	95
RIQGLDVPKL	REHCRERPGA	FPSEETLRGL	GRRGFLQTLN	ATLGCVLHRL	ADLEQLPKA
105	145	115	125	135	155
QDLERSGLNI	EDLEKLQMAR	PNILGLRNNI	YCMAQLLDNS	DTAEPKAGR	GASQPPTPTP
165	205	175	185	195	215
ASDAFQRKLE	GCRFLHGYHR	FMHSVGRVFS	KWGESPNRSR	RHSPHQALRK	GVRRTSPSRK
225	227				
GKRLMTRGQL	PR				

30

それ故、本発明は、さらに、これらの特異的な残基の一以上、及び/又はOSM上で規定するのに役立ってOSMの生物活性を変化させる結合部位と相互作用することができるアンタゴニスト又は物質を提供する。

【0011】

本発明によって治療し得る炎症性関節症には、慢性関節リウマチ、乾癬性関節炎、若年性関節炎、炎症性変形性関節症、及び/又は反応性関節炎が含まれる。治療し得る炎症性疾患には、とりわけ、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃炎、例えば、H.ピロリ感染から生じる胃炎、喘息、慢性閉塞性肺疾患、アルツハイマー病、多発性硬化症、及び乾癬が含まれる。

40

【0012】

OSMのアンタゴニスト候補には、OSMと特異的に相互作用する小有機分子、イオン、例えば、基質、できれば天然の基質、細胞膜の成分、受容体又は天然のリガンド、その断片、又はペプチド若しくは他のタンパク質性分子が含まれ、特に好ましいのは、OSMのOSM受容体への結合のみならず、修飾されたOSM分子の結合も阻害するであろう非シ

50

グナリング型 O S M 変異体である。このようなアンタゴニストは、タンパク質又はペプチドをコードする DNA の形態であり得、前記アンタゴニストをインビボで発現するために供給され得る。アンタゴニストは、インビボでネイティブの O S M に対して標的化された抗体応答の誘導を介して O S M に対するアンタゴニスト効果をもたらすようにデザインされた、このようなタンパク質又はペプチド分子又は DNA を含むワクチンであり得る。このようなアンタゴニストには、抗体、抗体由来の試薬、又はキメラ分子も含まれ得る。アンタゴニストの定義には、このような上記分子のうちの任意の分子の構造的又は機能的模倣体 (m i m e t i c) が含まれる。DNA 又は RNA アプタマーのような核酸分子も想定される。

【 0 0 1 3 】

好ましいアンタゴニストには、小有機分子が含まれる。このような化合物は、任意のクラスの化合物に由来し得るが、上述した機序のうちの一つを介して、O S M の生物活性に影響を与える能力を基礎として選択され、生理的に許容される、すなわち、無毒性であるか、又は許容可能なレベルの毒性若しくはその他の副作用を示すであろう。有用なアンタゴニストを与え得る一つのクラスの化合物は、N - (1 H - ピラゾロ [3 , 4 - d] ピリミジン - 4 イル) ベンズアミド) のようなリボヌクレオシドである ; (D a v o l l a n d K e r r i d g e , J . C h e m S o c . , 2 5 8 9 , 1 9 6 1) 。

【 0 0 1 4 】

他の好ましいアンタゴニストには、抗体若しくはその断片、又は抗体若しくはその断片の結合を模倣するようにデザインされた人工構築物を含む抗体、それらの断片、又は人工的構築物が含まれる。このような構築物は、T i b t e c h 1 2 , 3 7 2 - 3 7 9 (1 9 9 4) の中で D o u g a l l らによって論述されている。

【 0 0 1 5 】

抗体の定義には、組換えヒト抗体のような組換え抗体も含まれ、これらも使用し得る。これらの抗体は改変され得る。すなわち、それらは、(W O 8 6 / 0 1 5 3 3 に記載されているような) ドナー抗体の可変ドメインとヒト抗体の定常ドメインを含む「キメラ」抗体であり得、又は (E P - A - 0 2 3 9 4 0 0 に開示されているような) 抗体の可変ドメインのフレームワークでなく C D R のみが異なる種に由来する「ヒト化」抗体であり得る。相補性決定領域 (C D R) は、哺乳類又は霊長類のモノクローナル抗体に由来し得る。改変された抗体の可変ドメインのフレームワーク、及び定常ドメインは、通常ヒトの抗体に由来する。このようなヒト化抗体は、ヒトに投与したときに、齧歯類に由来する抗体のような完全な外来抗体に対してヒトが引き起こす免疫応答に比べて、大きな免疫応答を引き起こさないはずである。

【 0 0 1 6 】

好ましいアンタゴニストには、完全な抗体、F (a b ') ₂ 断片、F a b 断片、F v 断片、S c F v 断片、他の断片、C D R ペプチド及び模倣体が含まれる。これらは、当業者によって取得 / 調製され得る。例えば、F (a b ') ₂ 及び F a b 断片を取得するためには、(I g G 分子をそれぞれペプシン又はパイン切断に供することによる) 酵素消化を使用することができる。以下の記載では、「抗体」という語は、上記の可能性を全て含むものと理解しなければならない。

【 0 0 1 7 】

当業者であれば理解できるであろうが、具体的なタンパク質又はペプチドのアンタゴニストが本明細書に記載される場合には、このようなアンタゴニストの誘導体も使用し得る。「誘導体」という語には、前記アンタゴニストに対して一以上のアミノ酸が置換、欠失、又は挿入されているが、記載された結合活性をまだ保有している記載されたアンタゴニストの変形物 (v a r i a n t) も含まれる。好ましくは、これらの誘導体は、明記したアンタゴニストと実質的に同一のアミノ酸配列を有する。

【 0 0 1 8 】

アミノ酸配列の同一性の程度は、任意の二つの配列間の類似性が最良のセグメントを見出すために、「 b e s t f i t 」 (S m i t h a n d W a t e r m a n , A d v a n c

10

20

30

40

50

es in Applied Mathematics, 482 - 489 (1981))
 のようなプログラムを用いて計算することができる。アラインメントは、Schwarz
 and Dayhof (1979) Atlas of Protein Sequence
 and Structure, Dayhof, M. O., Ed pp 353 -
 358に記載されているように、アミノ酸類似性のマトリックスを用いて達成されるスコ
 アを最大にすることに基づく。

【0019】

好ましくは、配列の同一性の程度は、少なくとも50%、より好ましくは少なくとも75
 %である。少なくとも90%又は少なくとも95%の配列同一性が最も好ましい。しかし
 ながら、様々なアミノ酸は、多くの場合、タンパク質のある特性を実質的に変化させずに
 、又はこれに悪影響を与えずに、類似の特性を有する他のアミノ酸に置換され得るので、
 必ずしも高度の配列同一性は必要でないことが、当業者であれば理解できるであろう。こ
 れらは、時々、「保存された」アミノ酸変化と称される。このため、アミノ酸グリシン、
 バリン、ロイシン、又はイソロイシンは、多くの場合、相互に置換することができ、フェ
 ニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン（芳香属側鎖を有するアミノ酸）；リシン
 、アルギニン、及びヒスチジン（塩基性側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギン酸及びグル
 ルタミン酸（酸性側鎖を有するアミノ酸）；アスパラギン及びグルタミン（アミド側鎖を
 有するアミノ酸）、並びにシステイン及びメチオニン（硫黄含有側鎖を有するアミノ酸）
 を含む。このように、「誘導体」という語には、配列に対して一以上のこのような「保存
 的」変化を含むアミノ酸配列の変形物も含まれ得る。

【0020】

本発明には、記載された結合活性をなお保有した本発明のアンタゴニストの断片又はそれ
 らの誘導体も含まれる。好ましい断片は、少なくとも10アミノ酸長であるが、それより
 も長いものであり得る（例えば、50アミノ酸長まで、又は100アミノ酸長まで）。

【0021】

本発明に使用するのに好ましいOSMのさらなるアンタゴニストは、オリゴヌクレオチド
 リガンドである。指数的濃縮による系統的リガンド開発（SELEX; systematic evolution of ligands by exponential enrichment）は、標的タンパク質又は他の分子に対する所望の活性について一本鎖オリゴヌクレオチドの莫大なライブラリーをスクリーニングするプロトコールである（
 Tuerk & Gold 1990 Science 249, 505 - 510, Green et al. 1991 Meths. Enzymol. 275 - 86; Gold et al. 1995 Annu. Rev Biochem 64, 763 - 797; Uphof et al., 1996 Curr. Opin. Struct. Biol. 6, 281 - 288）。このスクリーニングの産物は、標的タンパク質に対して所望の活性、通常は高いアフィニティー結合を有するアプタマーと呼ばれる単一のオリゴヌクレオチド配列である。SELEX操作は、通常、約 10^{14} ~ 10^{15} 個のランダムオリゴヌクレオチド配列からなるRNA又はDNAライブラリーを用いて開始される。完全にランダム化されたオリゴヌクレオチドライブラリーでは、各分子は、その分子のヌクレオチド配列に完全に依存するであろう固有の四次構造を示すであろう。このため、
 標的タンパク質に対してスクリーニングすれば、そのタンパク質に対するオリゴヌクレオチドの結合親和性は、オリゴヌクレオチドの形状と前記標的タンパク質上のエピトープとの間の適合性によって決定されるであろう。莫大な多様性を有するライブラリーから開始する結果、通常、全体的な構造の相同性を有する他のタンパク質に比して標的タンパク質に対する選択性を有し、標的タンパク質に対するサブnM親和性を持ったアプタマーを同定することができるであろう（Tuerk & Gold 1990上記、Green et al, 1991上記; Goldら、1995上記; Uphofら、1996上記）。SELEX法を用いて、100を超えるタンパク質及びドーパミン（Mannironi et al, 1997 Biochemistry 36, 9726 - 9734）、サブスタンスP（Nieuwlandt et al, 1995 biochemist

ry 34, 5651-5659)、ヒト好中球エラストーゼ(Bless et al., 1997 Current Biol. 7, 877-880)、血小板由来増殖因子(PDGF)(Green et al., 1996 Biochemistry 35, 14413-14424)、血管内皮増殖因子(VEGF)(Green et al., 1995 Chem Biol. 2, 683-695)、トロンピン(Bock et al., 1992 Nature 355, 564-66)、及びL-セレクチン(O'Connell et al., 1996 PNAS USA 93, 5883-5887)を含む小分子に対してRNA又はDNAアプタマーが作成されてきた。

【0022】

多数のアプタマーが、生物活性、多くの場合、インビトロとインビボの両者での受容体拮抗作用又は酵素阻害を有することが実証されている。例えば、ヒト好中球エラストーゼ(hNE)に対して高い親和性と阻害活性を有するRNAアプタマーは、混合SELEX(Bless et al., 1997上記)によって作成された。インビボでの安定性を増加させるためのSELEX後修飾の後に、肺炎症のラットモデルでアプタマーをテストした(Bless et al., 1997上記)。第二の例では、ヒトL-セレクチンに対し、該タンパク質に対してnMの親和性を有する49ヌクレオチド長のDNAアプタマーが作成された(O'Connell et al., 1996上記)。該アプタマーは、E-セレクチンに比べて600倍、P-セレクチンと比べて10,000倍のL-セレクチンに対する選択性を示す。該アプタマーのPEG調合物を静脈内投与することによって、放射能ラベルされたヒトPBMCのリンパ節への輸送が用量依存的に阻害されたが、他の臓器への輸送は阻害されなかった(Hicke et al., 1996 J. Clin. Invest. 98, 2688-2692)。第三の例では、脈管形成におけるVEGFの役割を調べるために、高親和性のRNAアプタマーが、ヒトVEGFに対して作成された(Jellinek et al., 1994 Biochemistry 33, 10450-10456; Green et al., 1995; Ruckman et al., 1998 J. Biol. Chem. 273, 20556-20567; Willis et al., 1998 Bioconj. Chem. 9, 573-582)。VEGFアプタマーのリポソーム調合物は、VEGEによって誘導されるインビトロでの内皮細胞の増殖とインビボでの血管透過性の増加及び脈管形成を阻害した(Willis et al., 1998上記)。それ故、本発明に使用するためのOSMのオリゴヌクレオチドリガンド又はOSM受容体(OSMR、LIFR、gp130)が提供される。

【0023】

本発明に使用する上記アプタマーを作成するためには、OSM又は受容体をまず、スクリーニング用のプレートに結合させなければならない。続いて、FitzwaterとPoliskyに従って(Meths in Enzymol. 267, 275-301)、ヒトOSMに対するRNA又はDNAアプタマーを作成するために、選別と増幅のラウンド(すなわち、SELEX操作)の繰り返しを行うことができる。RNAが最も大きな構造的多様性を与え、それ故、高親和性分子を作成する可能性を与えるので、これらのアプタマーは、典型的には修飾されたRNAアプタマーである。高親和性アプタマーの作成に続いて、アプタマーの安定性を増加させるために、アプタマー(典型的には、アプタマーは、100マー以下である)を固相合成により適したコア配列に末端切断することにより、合成コストを下げるために、及びインビボで使用するための調合物を開発するために多数のポストSELEX至適化プロトコールを実施し得る。

【0024】

これらの操作の初めに、アプタマーは、活性に必要なコア配列まで分子の長さを減らすために末端切断され得る。多くの場合20~40ヌクレオチド長の間短いコア配列は、合成するのが安価且つ早く、増加した生体利用性を有し得る。コア配列の組成物に関する情報は、配列の相同性の比較から取得し得る。

【0025】

10

20

30

40

50

しかしながら、末端切断実験では、活性が生じるのに必要とされる最少の配列まで、連続的に短いアプタマーを合成するのが普通である。これには、通常、固定された配列を除去することが含まれるが、固定された配列中のヌクレオチドがアプタマーの親和性に寄与する例が多数存在する (Fitzwater and Polisky, 1996 上記; Ruckman J, et al (1998) J. Biol. Chem. 273, 20556-20567. Green et al., 1995 上記)。それ故、本発明は、選択されたアプタマーの末端切断されたバージョン又は伸長されたバージョンであるアプタマー又は選択されたアプタマーの配列と70%を超える相同性を示すアプタマーを提供し得る。

【0026】

末端切断に続いて、リボヌクレアーゼ切断に対する保護によって、アプタマーの安定性を向上させるために、多数の塩基の修飾実験を行い得る。インビトロ転写に使用されるT7ポリメラーゼはこの修飾を耐えられないと思われるので、SELEXの間には、2'修飾されたプリン塩基を含有させることはできない。このため、SELEX後にアプタマーの安定性を増加させるためには、アプタマー中のプリン塩基と2'修飾されたプリンとを置換するのが普通である。この修飾は、通常、2'-O-メチルプリンの使用によって行われるが、2'-アミノプリン、又は2'-フルオロプリンを含む他の修飾されたプリンを使用してもよい (Ruckman et al., 1998 上記; Green et al., 1995 上記)。SELEX後の該修飾は、親和性の喪失ももたらし得るので、連続的な態様でこれを行わなければならない (Green et al., 1995 上記)

【0027】

末端切断と安定化に続いて、化学的固体規模 (solid scale) の合成によって合成され得る短い完全に修飾されたアプタマーを極めて大量に作成することができる。アプタマーの5'末端には、アプタマーの使用を容易にするために、又はインビボ供給用にアプタマーを調合するために、多くの分子を付加することができる。これには、イメージングを助けるための被封印部分 (caged moiety) (Hnatowich D. J. (1996) Q. J. Nucl. Med. 40, 202-8)、分子の検出を助けるためのフルオレセイン (German et al., 1998 Anal. Chem. 70, 4540-5)、リボソームへの挿入を助けるための脂肪基 (Willis et al., 1998 上記)、又は小分子薬物又はペプチドへの抱合 (Charlton J, et al (1997b) Biochemistry 36, 3018-3026) が含まれる。一般的には、アプタマーの5'末端への分子の付加は、親和性又は特異性の喪失をもたらさない。

【0028】

インビボでの半減期を向上させるために、アプタマーは、ポリエチレングリコール (PEG) 分子の付加、又はリボソームへの取りこみによって修飾されてきた。何れの場合でも、このような修飾は、インビボでの半減期の顕著な増加を引き起こし得る (Willis et al, 1998 上記)。

【0029】

リボソームとの調合に加えて、インビボでの血清安定性を増加させるために、アプタマーは、20KのPEGと40KのPEGの両者と調合されてきた。ヒトL-セレクチンに対してDNAアプタマーが作成されてきた。インビボ安定性を増加させるために、N末端のアミン部分を介して20KのPEGエステルがアプタマーに連結された。PEG抱合アプタマーは、インビボでSCIDマウス中のL-セレクチン依存性リンパ球の輸送を阻害することが実証された (Hicke et al., 1996 上記)。それ故、本発明に使用するための、アプタマーと担体分子、例えばPEGとのコンジュゲートが提供される。この態様では、アプタマーと担体は、例えば、N末端アミン部分を介して連結されるであろう。加えて、アプタマーと輸送分子、例えばリボソームを含む本発明に使用するための調合物又は組成物が提供される。この態様では、アプタマーと担体の間には結合はなくて

10

20

30

40

50

もよく、アプタマーは、単に、担体全体に封入され、分散され、又は分配され得る。

【0030】

本研究で単離されたアプタマーは、血清、組織、又は他のエクソピボ試料中のヒトOSMの存在を検出するための診断用分子として使用するために、又はインピボでの全身イメージング研究でのヒトOSMの検出のためにも修飾され得る (Charlton J, et al (1997) Chemistry and Biology 4, 809-816.; Hnatowich, 1996 上記)。FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) (Davis KA. Et al (1996) Nuc. Acids Res. 24, 702-6.; Charlton et al., 1997 上記)、ELONA (Enzyme Linked Oligonucleotide Assays) アッセイ (Drolet DW, et al (1996) Nature Biotech. 14, 1021-1025)、及び他の診断用途のような利用のための蛍光検出を補助するために、フルオレセイン又は他の蛍光性検出基を、アプタマー分子の5'末端に付加することができる。MAG3 (Fritzberg A.R., et al J Nucl Med 1986: 27, 111-6) のようなテクネチウム-99m (Tc99m) キレートペプチドケージの出現は、標的タンパク質の存在をインピボでイメージングするために、広範な分子 (Kubo A. et al, (1998) Kaku Igaku 35, 909-28) と巨大分子 (Taillefer R. et al, (1995) Eur. J. Nucl. Med. 22, 453-64) の使用を著しく促進した (巨大分子 (Pallela V.R., et al (1999) Nucl. Med. 40, 352-60))。イメージは、カメラの補助により可視化され、マウスからヒトまでの様々な種で達成されてきた。Tc99m キレートの最近の修飾によって、穏やかな条件下で、より効率的且つ安定な分子の標識化が可能となった (Hnatowich D.J. 1998 Nucl Med 39, 56-64)。一本鎖オリゴヌクレオチドを放射能ラベルする方法が既に開発されており、このような未修飾の被標識オリゴヌクレオチドのインピボでの挙動が、予備的に調べられている (Hnatowich, 1996 上記)。

10

20

【0031】

もちろん、本発明に使用するための全てのペプチド、タンパク質、又は核酸をベースとするアンタゴニストは、精製された形態、すなわち、その天然の状態で、またはその製造の結果の何れかにおいて、このような分子に付随する物質がないことが好ましく、とりわけ、純度は、70%を超えることが好ましく、80%又は90%の純度を超えることがより好ましいことが理解されるであろう。

30

【0032】

本発明のアンタゴニストは、単独で、又はステロイド (プレドニゾン等)、シクロホスファミド、シクロスポリンA、若しくはプリン類縁体 (例えば、メトトレキセート、6-メルカプトプリン等)、若しくは抗リンパ球抗体のような免疫抑制剤と、あるいは、より好ましくは、CD4+T細胞阻害物質、例えば抗CD4抗体 (好ましくは、遮断若しくは非除去 (non-depleting) 抗体)、抗CD8抗体、抗CD23抗体、TNFアンタゴニスト、例えば抗TNF抗体若しくはTNF阻害剤、例えば可溶性TNF受容体、若しくはNSAIDのような物質若しくは他のサイトカイン阻害剤のような耐性誘導、抗自己免疫、又は抗炎症性物質と組合せて使用し得る。

40

【0033】

本発明のアンタゴニストの適切な用量は、治療すべき疾病又は疾患、投与経路、治療すべき個体の年齢及び体重、及びアンタゴニストの性質のような要素に応じて変わるであろう。特定の用量に拘泥するものではないが、例えば、非経口投与の場合、一日当り0.01~20mg/kgの用量の本発明の抗体 (又は他の大分子) (通常、上記の薬学的組成物の一部として存在する) が、典型的な成体を治療するのに適切であり得ると思われる。より適切には、用量は、0.1~5mg/kg、例えば、0.1~2mg/kgであり得る。適切には、単位用量は1~400mgであるだろう。小有機分子の適切な用量は同様で

50

あり、オリゴヌクレオチドリガンドの適切な用量は、例えば0.1~10mg/kgであるだろう。

【0034】

本発明は、さらに、薬学的に許容される担体又は賦形剤、及び活性成分として、本発明のアンタゴニスト、及び必要に応じて上述した他の治療剤を含む薬学的組成物を提供する。本発明のアンタゴニスト、及びその薬学的組成物は、非経口投与、すなわち、皮下、筋肉内、又は静脈内投与に特に有用であるが、アンタゴニストの性質によっては、口腔、吸入、鼻内、局所又は関節内のような他のルートがより適切かもしれない。

【0035】

経口投与用の組成物は、一般に、許容される担体、好ましくは水性担体に溶解されたアンタゴニスト又はそのカクテルの溶液を含むであろう。様々な水性担体、例えば、水、緩衝化された水、0.4%生理食塩水、0.3%グリシンなどを使用することができる。これらの溶液は滅菌されており、一般的には、粒状物が存在しない。これらの組成物は、従来
10
の良く知られた滅菌手法によって滅菌し得る。前記組成物は、pH調整剤及び緩衝剤、毒性調整剤等、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等のような生理的条件に近似するのに必要とされる薬学的に許容される補助的物質を含有し得る。これらの調合物中の抗体又は他のアンタゴニストの濃度は、例えば、約0.5重量%未満から、通常約1重量%又は少なくとも1重量%、15又は20重量%まで、大きく変わることができ、選択した投与様式に従って、主として、液体の容積、粘度等に基づいて選択されるであろう。
20

【0036】

このように、筋肉内投与用の典型的な薬学的組成物は、1mLの滅菌した緩衝化された水、及び50mgのアンタゴニストを含有するように作成され得る。静脈内注入用の典型的な組成物は、250mLの滅菌リンゲル溶液、及び150mgの抗体、又は本発明の他のアンタゴニストを含有するように作成され得る。非経口的に投与可能な組成物を調製する実際の方法は、当業者に公知、又は明白であると思われ、例えば、Remington's Pharmaceutical Science, 15th ed., Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980)に、より詳細に記載されている。核酸アンタゴニスト用の適切な調合物は、上述
30

【0037】

抗体のような本発明のタンパク質アンタゴニストは、保存のために凍結乾燥することができ、使用前に、適切な担体中で再生される。この手法は、従来免疫グロブリンによって有効であることが示されている。任意の適切な凍結乾燥及び再生手法を利用することができる。当業者であれば、凍結乾燥及び再生が、様々な程度の抗体活性の喪失をもたらし得ること(例えば、従来免疫グロブリンを用いると、IgM抗体は、IgG抗体に比べて、より大きな活性の喪失を有する傾向がある)、及び使用レベルは補償のために調節しなければならないかもしれないことを理解できるであろう。

【0038】

単一の又は複数回の組成物の投与は、治療に当たる医師によって選択されている用量レベルとパターンで実施することができる。どのような場合でも、薬学的調合物は、患者を有効に治療するのに十分な量の本発明の抗体間又は他のアンタゴニストを与えなければならない。
40

【0039】

本発明の範囲には、OSMに結合するある物質が、炎症性疾患の治療に有用であり得るかどうかを決定するためのアッセイが含まれる。本発明には、それ故、試験物質とOSMを混合する工程、及び前記物質がOSMとOSM受容体との相互作用を妨害することができるかどうか、又はマーカー分子の識別的遺伝子発現を通じてOSMの生物活性に影響を与えるかどうかを決定する工程とを備えたOSMのアンタゴニストを同定するためのアッセイも含まれる。
50

【0040】

上記本発明に使用するアンタゴニストを選別するためには、まずOSM、担体上に存在する、若しくは結合部位が規定された(defined)態様の上記OSMの中心的結合残基('OSM結合部分')、又はOSM授与体を得なければならない。ヒトOSMをコードするcDNAは、EMBL配列に基づいて(受付番号M27288)合成的に作成され、適切な発現用ベクター中にクローニングし、大腸菌のような適切な宿主を形質転換するために使用され得る。続いて、培地からヒトOSMタンパク質を精製し、スクリーニングのためにプレートに結合される。

【0041】

OSM、OSM結合部分、及び/又はOSM受容体は、例えば、細胞、無細胞調製物、化学的ライブラリー、及び天然産物の混合物中で、小分子基質およびリガンドの結合を評価するために使用され得る。それ故、本発明はOSMのアンタゴニストを同定するためのアッセイであって、OSMと試験物質を接触させる工程と、結合を測定する工程とを備えたアッセイを提供する。これらの基質及びリガンドは天然の基質であり得、リガンドは構造的又は機能的模倣体であり得る。このような分子は、OSMのアンタゴニストの定義の中に含まれる。スクリーニング法は、高情報量(high-throughput)を含み得る。例えば、アンタゴニストをスクリーニングするには、OSM受容体を発現している細胞から、合成反応混合物、膜のような細胞コンパートメント、細胞のエンベロープ、又は細胞壁、又は任意のそれらの調製物を調製し得る。続いて、候補分子の非存在下又存在下で、該調製物を標識されたOSMとインキュベートする。候補分子がOSM受容体に結合する能力は、標識されたOSMの結合の減少に反映される。無償で、すなわちOSMの機能的効果を誘導せずに結合する分子が、よいアンタゴニストである可能性が最も高い。このアッセイでは、反対に、未標識のOSMと共に標識したOSM受容体を使用してもよい。OSMアンタゴニストを同定するために、ELISAフォーマットを用いたさらなるスクリーニングを使用してもよく、そこでは、候補分子が、gp130-Fc融合タンパク質のようなOSM受容体コンジュゲートのプレートに固定化されたOSMへの結合を阻害する能力が測定され、該アッセイにおいては、結合したgp130-Fcは、酵素標識した抗Fc抗体と比色法アッセイによって検出される。

【0042】

アンタゴニスト候補の機能的効果は、例えば、候補分子と細胞又は適切な細胞調製物を相互作用させた後にレポーター系の活性を決定すること、及びその効果をOSM又はOSMに対して同じ効果を示す分子の効果と比較することによって測定し得る。この点で有用であり得るレポーター系には、産物に転換された比色標識基質、OSM受容体の機能的活性の変化に応答するレポーター遺伝子、及び本分野で公知の結合アッセイが含まれるが、これらに限定されない。

【0043】

ここで、添付の図面のみを参照しながら例によって、本発明を記載する。

【0044】

例1：エクソピボでの滑膜組織培養中のOSMの検出

実験1：

滅菌した皮下針を用いて、慢性関節リウマチ、変形性関節症、又はバニオンを有すると診断された患者から得た切除したばかりの滑膜組織を機械的に切開し、約1mm³の断片を得た。10%の熱で不活化したAB⁺雄の血清(North London Blood Transfusion Centre)、10mM hepes、1%ピルビン酸ナトリウム、1%非必須アミノ酸(全てシグマから購入)、4mM L-グルタミン(Hyclone)、100U/mLのペニシリン+100µg/mLのストレプトマイシン(Hyclone)を補充したRPMI 1640(Sigma)(完全ヒト培地;CHM)を添加した96穴の組織培養プレート(Costar)上の扁平な底部の200µLウェルの中にこれらを置き、37°Cでインキュベートした。

【0045】

10

20

30

40

50

第0、2、5、及び9日目に、100 μ L / ウェルの培養上清試料を採集し、20 で凍結した後、ELISAによるOSMの試験を行った(Quantikine R&D Systems)。データが図1に示されている。分泌されたOSMは、RA由来の滑膜試料中に検出されたが、変形性関節症又は非関節症の対照患者由来の滑膜から得た試料中には検出されなかった。RA組織培養中のOSMレベルは、インキュベーションの5日目付近で最大であり、およそ1400 pg / mLの濃度に達し、9日目でも、なお800 pg / mLを超えていた。

【0046】

実験2：

滑膜組織をPBS中で洗浄し、脂肪組織を除去した。組織を小さな(1 - 4 mm)断片に切断するために滅菌した鋏を使用した。この組織は、使用前にPBS中で洗浄した。該組織を秤量し、24又は48穴プレート(Costar)中に、100 mg / mLで直接プレートした。37 及び5% CO₂ 下において、10%の加熱により不活化したAB+ヒト血清(シグマ)、2 mM L-グルタミン(Life Technologies)、200 U / mLのペニシリン及び200 μ g / mLのストレプトマイシン(Life Technologies)、480 U / mL ナイスタチン(シグマ)、50 μ g / mL ゲンタマイシン(Life Technologies)、及び10 mM Hepes(Sigma)が補充された、濾過滅菌したダルベッコの修正イーグル培地(シグマ)1.5 mL中で該組織を培養した。3日目に、上清を取り出し、対を成す抗体(R&D Systems)を用いて、ELISA中でOSMを試験した。

【0047】

RA又は炎症性OAを有する患者の膝の生検から得た滑膜組織培養物は、自発的にOSMを分泌する。3日間のインキュベーション期間後に、RA培養物からの培養上清中のOSMの平均レベルは246 pg / mLであり(レンジ30 ~ 982、n = 12)、OA培養物からのOSMの平均レベルは473 pg / mL(レンジ44 ~ 2001、n = 14)であった。OSMは、炎症によって分泌されたが、静止状態の滑膜組織によっては分泌されなかった(図2)。

【0048】

例2a：THP-1細胞の分化

ヒトの前単球系THP-1細胞(ECACC)を一週間に二回、10%の加熱により不活化したFCS、10 mM hepes、1% 非必須アミノ酸(全てSigmaから購入)、4 mM L-グルタミン(Hyclone)、100 U / mLのペニシリン + 100 μ g / mLのストレプトマイシン(Hyclone)(完全培地；CM)を補充したRPMI中で経代した後、洗浄した細胞に1 μ g / mLのPMA(Sigma)を添加し、37 で30分間インキュベートした。予め加温したPBS中で細胞を3回洗浄し、CM中に再懸濁し、96穴の扁平な底部のプレート(Costar)中に、 1.5×10^5 細胞 / mLで播種した。プレートを37、5% CO₂ で48時間インキュベートした後、PBSで洗浄し、培地を交換し、さらに24時間インキュベートした。使用前に、細胞を1回PBS中で洗浄した。

【0049】

例2b：IFN 刺激された血液単球の調製

PBSでヒトのパフィコート(North London Blood Transfusion Centre)を1 : 3に希釈し、Lymphoprep(Nycomed UK)上に重層し、室温で30分間600 x gで遠心した。採集したPBMCをPBS中で3回洗浄し、計数し、 5×10^6 細胞 / mLになるように、80 mLのRPMI 1640 / 10% FCS中に再懸濁した。20 mLを4つの175 cm² の各プラスチック中に置き、37 で一晩インキュベートし、単球を接着せしめた。非接着性細胞を捨てて、4で15分間、氷冷したベルセン(versene)と共にインキュベートした後、接着性細胞を掻き取った。PBS中で細胞を二度洗浄し、 6.9×10^5 / mLになるように、RPMI 1640 + 10%の熱で不活化したヒト血清(Sigma)中に再懸濁し、9

10

20

30

40

50

6穴の扁平な底部のプレート(Costar)の各ウェル中に250 μ Lの細胞懸濁物を置いた。プレートの半分は、100IU/mLのIFN γ を添加し(Genzyme)、残りの半分は対照として残しておいた。プレートは、アッセイ前に37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で一晩インキュベートした。

【0050】

例2c: TNF α 放出の刺激:

凍結乾燥した、組換えヒトオンコスタチンM(rhOSM)をR&D Systemsから購入し、滅菌したPBS+0.1%BSA(Sigma)の中で10 μ g/mLに希釈し、使用するまで-20 $^{\circ}$ Cで分取試料を保存した。上述のように調製した、マクロファージ、単球、又はThp-1細胞のそれぞれにつき3つずつのウェルに、rhOSM、大腸菌由来のLPS、又はCMを添加し、上述のように調製し、37 $^{\circ}$ C、5%CO $_2$ で7時間インキュベートした。上清を採取して、ELISAによるTNF α タンパク質をテストするまで-20 $^{\circ}$ Cで凍結した。TNF α mRNAを同時アッセイするようにデザインされたアッセイでは、細胞を上記のように4時間インキュベートし、PBS中で一度洗浄し、RNA抽出緩衝液中で細胞溶解させた(RNAzol)。 10

【0051】

RNAは、以下のように検出した。製造者の指示にしたがって、全RNAを調製し、DEPC処理した水の中において、-80 $^{\circ}$ Cで保存した。RT-PCRの場合、オリゴdTプライミング(first strand cDNA synthesis kit, Pharmacia Biotech)を用いて、約1 μ gのRNAを逆転写し、以下のTNF α 用プライマー(Clontech ampimers): フォワード-GAGTGACAAGCCTGTAGCCCATGTTGTAGCA(配列番号1)リバーズ-GCAATGATCCCAAAGTAGACCTGCCCAGAC(配列番号2)を用いて、得られたcDNAを30サイクルのPCRに供した。増幅産物(444bp)は、アガロースゲル(2%)電気泳動によって分離され、エチジウムブロマイド染色によって可視化した。 20

【0052】

例2d: OSMは単球系のヒト細胞にTNF α の産生を誘導する

PMAを用いてヒト前単球系Thp-1を分化するように誘導し、完全に洗浄し、上述のように組換えヒトOSMと共にインキュベートした。8時間の時点で、培養の上清を除去し、製造者の指示に従って、特異的なELISA(TNF α Quantikine, R&D Systems)によってTNF α の産生をアッセイした。OSMは、用量に依存したTNF α の放出を誘導し、1ng/mL以上のOSMで測定可能、200-500ng/mLで最大であり、多くの場合、2500pg/mLのTNF α を超える分泌レベルに達した。代表的な実験が、図2に示されている。上記のRT-PCRによって測定されたTNF α のメッセンジャーの発現は、刺激されない対照細胞に比して、100ng/mLのOSMと4時間インキュベートしたTHP-1細胞の中で非常に増加した(図3)。 30

【0053】

重要なことは、OSMを予め煮沸するとTNF α の分泌が完全に消失したので、TNF α の誘導は、混在するエンドトキシンに由来するものではなかったということである(データは示していない)。また、特異工程を用いた免疫沈降によるOSMの除去は、活性を消失せしめた(データは示されていない)。これらの知見は、インターフェロン γ で予め活性化したヒト血中単球、7日間の培養で分化したヒト血中マクロファージを含むように拡張された。両細胞種ともに、OSMと共に8時間にわたって同時インキュベートすると、ELISAによる測定によれば、TNF α を分泌した。単球による平均TNF α 分泌は、1447pg/mLであり(レンジ137-4709pg/mL; n=4ドナー)、及びマクロファージでは542pg/mLであった(レンジ62-1428pg/mL; n=3ドナー) 40

例3a: 軟骨分解アッセイ

屠殺後にウシの尾中隔軟骨を一晩4 $^{\circ}$ Cに保った。2mmのスライスから直径2mmの円板 50

を切除し、HBSSで2回洗浄した。2 mM グルタミン、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のストレプトマイシン、100 U/mL のペニシリン、及び2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のアムホテリシンB (軟骨分解溶媒、CDM) を補充した25 mM HEPESを含有する600 μL の容量のDMEM (Sigma) の中で、24穴のプレート (Costar) のウェル当たり3つの円板を37、5% CO_2 で24時間インキュベートした。600 μL のCDMのみ、2、10、又は50 ng/mL のヒト組換えTNFのみ、10 ng/mL のrhOSMのみ (R&D systems)、又はTNF + OSMの何れかの中で、4つずつのウェルの中において軟骨を培養し、37、5% CO_2 で7日間インキュベートした。上清を採取し、第1日と同一の試験試薬を含有する新鮮な培地と置換した。該実験は、さらに7日間継続され、14日目に全ての培地が除去され、5 mM EDTA、及び5 mM システイン塩酸塩を含有する0.1 Mのリン酸緩衝液pH 6.5の中で、4.5 mg/mLのパパイン (Sigma) を用いて残りの軟骨を消化し、65で16時間インキュベートして、軟骨断片の残存するヒドロキシプロリン含量を決定した。14日目までに培地中に放出されたOH-プロリンの累積的レベルを測定し、以下に示されているように、総放出の百分率として表した。

【0054】

例3b: ヒドロキシプロリンアッセイ

Bergmann I and Ioxley R. (1963) Anal. Biochem. 35 1961-1965の方法のマイクロタイタープレート修飾法を用いて、ヒドロキシプロリンの放出を(コラーゲンの分解の測定として)アッセイした。酢酸クエン酸緩衝液(水1L当たり57g酢酸ナトリウム、37.5gのtri-クエン酸ナトリウム、5.5gのクエン酸、385mLのプロパン-2-オール)で、クロラミンT(7% w/v)を1:4に希釈した。p-ジメチルアミノベンズアルデヒド(DAB; 30mLの60%過塩素酸)中20g)をプロパン-2-オールで1:3に希釈した。試料を6M HCLの中で105で20時間加水分解し、Savant Speed Vac.を用いて、真空下で、NaOHを用いて乾燥させることによって、加水分解物を中和した。残留物を水に溶かし、クロラミン-T試薬と共に、40 μL の試料又は標準(ヒドロキシプロリン; 5-30 $\mu\text{g}/\text{mL}$)をマイクロタイタープレートに添加した後、DAB試薬(150 μL)を4分後に添加した。該プレートを65まで35分間加熱し、冷却し、560nmの吸光度を決定した。

【0055】

例3c: OSMはTNFと協働してエクスピボで軟骨外植片からのMMP1とコラーゲンの放出を増加させる

上述のように、OSM若しくはTNFのみ(ともにR&D Systemsから入手)、又はこれらの組合せの存在下又は不存在下において、ウシの鼻軟骨を4つずつのウェルの中で14日間培養した。

【0056】

第7日目に培養上清の総コラーゲナーゼ活性を、第14日目に放出されたコラーゲンをアッセイした。図5のデータは、それぞれ10 ng/mL又は50 ng/mLで使用されたOSM又はTNF単独では、何れも顕著なMMP1の分泌を誘導しなかったことを実証している。しかしながら、これらの濃度で使用されたOSMとTNFの組合せは、測定可能なMMP1の放出を誘導した。これらの知見は、OSMとTNFとの顕著な協働作用を伴って、軟骨からのコラーゲンの放出を増加させた。図4は、10 ng/mLのOSM単独では、コラーゲンの放出を誘導しなかったのに対して、使用した最高濃度のTNF(50 ng/mL)だけは、小さいが、実証可能な効果(10%未満)を有していたことを示している。しかしながら、50又は10 ng/mLの何れかのTNFと10 ng/mLの組合せは、それぞれ、80%及び30%を超えるコラーゲンの放出をもたらした。

【0057】

例4a: L-セレクチンを介したPBMCの刺激

上述のようにヒトのパフィコートから単核細胞を単離した。5 $\times 10^5$ 細胞を0.5 mL

10

20

30

40

50

の容量で播種し、37℃、5%CO₂で、60~80kDの分子量のフコイダン(Sigma)、抗L-セレクチンモノクローナル抗体、LAM1-3、及びTQ1、又はアイソタイプが合致した対照IgG抗体(全てCoulterから入手)と共に24時間インキュベートした。製造者の指示に従って、特異的なELISAアッセイ(Quantikine、R&D Systems)を用いて上清のOSMをアッセイした。

【0058】

例4b: L-セレクチンの連結はOSMの分泌を誘導する

抗ヒトL-セレクチン抗体、(TQ1又はLAM-1の何れか)、又はアイソタイプを合致させた対照抗体、及びELISAによってOSMをアッセイした培養上清と共に健康なドナーからの単核細胞を24時間インキュベートした。図6のデータは、両抗L-セレクチン抗体を用いた用量依存的なOSMの誘導を示している。対照抗体は、最少の効果を有していた。続いて、L-セレクチンアゴニストであるフコイダンが単核細胞培養からOSMを誘導する能力を調べた。図7は、フコイダンがOSM分泌の強力な刺激物質であり、RA及びOAの滑膜生検培養物で見られたのと同様のレベルを誘導することを示している(例1、実験2、図2)。

10

【0059】

例5a: 免疫組織化学

CO₂で冷却して液体ヘキサン中で新鮮なヒト組織試料を凍結して、使用まで液体N₂の蒸気相中に保存した。3-アミノプロピルトリエトキシシラン(APEs)(Maddox P. et al J. Clin. Path. 40; 1256-1260, 1987)をコートしたガラススライド上に、7mmのクリオスタット切片を切断し、2%パラホルムアルデヒド中、4℃で10分間固定した。0.05%H₂O₂中で、内在性のペルオキシダーゼ活性を20分間ブロックした。未抱合の一次モノクローナル抗体は、以下の入手源: CD62P、CLB、オランダ; CD62E及びgp130 R&D Systems UKから得た。一次抗体は、45分間、室温で、至適希釈で適用した。試験抗体と等しいタンパク質濃度で使用したネガティブコントロールの切片を抗BrdUモノクローナル抗体(SIGMA)と共にインキュベートした。一次抗体を標識するために、ビオチン化された二次抗体に続いて、ペルオキシダーゼラベルされたABC(Vector Elite)を用いた。DAB(3,3'-ジアミノベンジジン)基質(SIGMA)を用いてペルオキシダーゼを展開した。

20

30

【0060】

例5b: RAの滑膜におけるセレクチンとOSM受容体の共分布

炎症性RAの滑膜組織の凍結切片は、上記gp130、並びにP及びEセレクチンに対する特異抗体を用いて染色した。図8の顕微鏡写真は、RAの血管内皮がgp130に対して強い陽性で染まることを実証している。

【0061】

P-及びE-セレクチンの発現についてRAの滑膜を染色することによって、血管内皮細胞に限局したgp130と同一の染色パターンが明らかとなった(それぞれ、図8及び図9)。図9では、血管周囲の単核細胞がE-セレクチンの染色に付随して浸潤していることに注目されたい。対照一次抗体を用いた連続切片の染色は、血管内皮細胞上では、ネガティブであった(図9)

40

例6a: コラーゲン誘導性関節炎の抗OSM抗体処置

コラーゲン誘導性関節炎は、以前記載したように(Plater-Zyberk C. Clin. Exp. Immunol 98: 442-7 1994 and Plater-Zyberk C. Nature Medicine 1: 781-5, 1995)ネイティブのウシII型コラーゲン(CII)を用いた免疫化によって、雄のDBA/1マウス(8-12週齢)で誘導した。CII免疫化の16日後から、関節の赤さと膨張の徴候について、マウスを毎日モニターした。臨床徴候が最初に現れてから、1週間に3回マウスを調べ、各肢毎に、以下の視覚的スコア: 0 = 正常、0.5 = 2以上の指に関節炎、1 = 指を含まない肢の僅かな膨張と紅斑、1.5 = 1と同じだが指を含む、2 =

50

指を含まないより顕著な肢の紅斑を伴う膨張、2・5 = 2と同じだが指を含む、3 = 動作障害を伴う著しい膨張、3・5 = 3と同じだが指を含む、を用いて疾病の重症度に段階を付けた。肢の厚さは、コンパスを用いて測定した (Proctest 2 T, Kroepelin Langenmesstechnik)。

【0062】

臨床的に疾病が発症してから、100 mgのヤギ抗マウスOSM抗体を腹腔内投与することによって、CII免疫されたDBA/1マウスを処置した (Rand Systems, cat. no. AF-495-NA)。上記のように、疾病の進行を評価した。発症から14日後に、頸椎脱臼によってマウスを屠殺し、組織学的な検査のために肢を採集した。

10

【0063】

例6b：関節炎マウスの関節の組織学的な評価

脚の皮を剥ぎ、膝と肢を切除した。4日間(膝)又は1日間(肢)、10%の緩衝化されたホルマリンの中で関節を固定し、25%の蟻酸の中で3日間脱灰し、脱水し、パラフィン蠟の中に埋め込んだ。関節の矢状切片(5-7 mm)から蠟を除去し、(上記Plater-zyberk Nature Medicineに記載されているように)サフラニンO、ファーストグリーン/鉄ヘモキシリン対比染色で染色した。0(浸潤なし)から3(著しい浸潤と滑膜の過形成)まで、滑膜炎をブラインドで段階付けした。軟骨のプロテオグリカンの枯渇の指標となるサフラニンO染色強度の消失程度は、0(完全に染色された軟骨)から3(軟骨の完全な枯渇及び消失)までのスケールでスコアを付けた。

20

【0064】

例6c：コラーゲン関節炎マウスの関節組織中のOSM mRNAの検出

関節炎マウスと未処置対照動物を屠殺し、両肢と両足を切除し、液体窒素で瞬間凍結した後、-80℃で保存した。ウルトラツラックス(ultraturrax)メカニカルホモゲナイザーを用いて、RNAzol E中で各脚を砕くことによって、RNAを調製した。粒状物は沈降させ、続いて、上清を1/10容量のクロロホルムと混合し、RNAを含有する水相を分離するために回転させた。RNAmate (BioChain Institute Inc, San Leandro, California)を用いて、RNAを沈降させて混在しているプロテオグリカンを除去した。75%エタノール中で洗浄した後、DEPC-水の中に全RNAを溶かし、Pharmaciaのfirst strand cDNAキット及びオリゴdTプライミングを用いて、逆転写した。マウスOSM配列(Yoshimura A. et al EMBO Journal 15 1055-1063, 1996): GGGTGTCTACCAAGGAACA(配列番号3)、CTGAGACCTTCAAGAGGAC(配列番号4)に由来する以下のプライマー(Life Technologies custom primers)を用いて、PCR反応を行った。30サイクルのPCRの後、アガロースゲル電気泳動を用いて反応産物(379 bp)を検出した。上述のように、関節炎マウスの肢のOSM mRNAを検出するためにRT-PCRを用いた。図10は、段階的に増加する臨床的疾患スコアを有する動物から得た関節では、OSM特異的PCR産物のレベルは増加していたことを示している。これに対して、対照動物では、OSMメッセージは、殆ど又は全く検出されなかった。

30

40

【0065】

例6d：OSMの中和はコラーゲン誘導性関節炎を改善する

中和が関節炎の臨床徴候を改善し得るとする仮説を直接試験するために、6匹のマウスからなる群に最初に臨床的な関節炎が現れてから1日及び3日後に、OSMに対する中和ポリクローナル抗体100 µgを2回腹腔内投与した。平行して、抗OSMの代わりに非免疫ヤギIgGを用いて、6匹の関節炎マウスからなる第二の群を同様に処置した。関節炎の臨床的重症度にスコアを付け、第二の抗体を投与した後11日のフォローアップ期間にわたって各肢の膨張を測定した。対照ヤギIgGで処置したマウスでは、肢の膨張の増加を伴って、進行性の関節炎が発生した。

50

【0066】

全く対照的に、抗OSM抗体で処置したマウスは、臨床スコアと肢の膨張からみて有意に重症でない関節炎を生じた(図11)。また、関節炎の肢の数は、対照IgG処置動物に比べて、抗OSM処置動物で有意に減少しており、この治療用プロトコルが、既に確立した疾病を有する動物をさらなる疾病の進行から保護するのに有効であったことを実証している。(データは示していない)。グループ当たり7匹のマウスを用いて、同様に、この実験を繰り返し、ほぼ合致するデータを得た(データは示していない)。

【0067】

抗OSM抗体による処置から生じた臨床的重症度の減少は、疾病の発症から14日後に、関節炎の肢を死後組織学的に調べることによって確認された。14日目における対照IgG又は抗OSM抗体で処置したコラーゲン関節炎マウスの関節の浸潤と軟骨の損傷を比較した組織学的データが、図12~15に示されている。対照IgG処置マウスは、PMNと単核細胞による著しい関節の浸潤を示した(図12)。これは、広範な好中球の浸潤を特徴とする関節の軟骨の表面破壊を伴っていた(図13)。対照的に、図14と15は、最小限の関節炎を有する抗OSM処置した動物の代表的な関節を示しており、細胞の浸潤レベルが顕著に減少し、損傷されていない関節の軟骨が存在することを実証している。さらに、軟骨と滑膜の組織病理学的な外見について、ブラインドで関節にスコアを付け、正常、中程度、又は重度として報告した。処置群当たり合計73の各関節を評価した；データは表1に要約されている。対照IgG処置群では僅か6%であったのに比して、抗OSMで処置した動物では、検査した47%の関節が正常であるか、又は穏やかな滑膜炎を示していた。同様に、抗OSM処置マウスでは、対照IgG処置群の21%に比べて、検査した関節の58%が殆ど又は全く関節の損傷を示さなかった。処置の1日目に関節の赤さと膨張の明瞭な徴候を有する2匹の抗OSM処置マウスの関節は、続いて、関節炎の完全な改善を示し、軟骨又は滑膜の何れにも細胞の浸潤と目に見える異常を示さなかった(データは示していない)。

【0068】

【表1】

表1: 抗OSMまたは処理IgGのいずれかを処置したマウスの関節の組織学的スコア

処置	正常/軽度		中程度		重度	
	軟骨	滑膜	軟骨	滑膜	軟骨	滑膜
抗-OSM	58%	47%	21%	23%	22%	31%
IgG	21%	6%	26%	37%	53%	57%

調べた関節の総数: 73関節処置

例7: 小有機分子アンタゴニストの同定

明確な細胞毒性を引き起こさずにレポーター細胞株からのOSM誘導性生物学的応答を阻害することによって、OSMの小有機分子アンタゴニストを同定した。対照として、TNF 応答性細胞株に対する前記化合物の影響も試験した。

【0069】

例7a: ヒトOSMの発現及び精製

EMBLのhOSM(受付番号M27288)配列からデザインした合成オリゴヌクレオチドプライマー5'-GCATAGGATCCGCGGCTATAGGCAGCTGCTCG-3'(配列認識番号5)および5'-ATCGCGAATTCTACCGGGG

CAGCTGTCCCT-3' (配列認識番号6)を用い、活性化された白血球のcDNAライブラリーからのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を使用して、25アミノ酸のリーダー配列を除去したヒトOSM(hOSM)をコードするDNA断片を増幅した。このPCR産物をpCR2.1(Invitrogen)中にサブクローニングしてpCR2.1hOSMを得た。

【0070】

「Quickchange」位置指定突然変異誘発キット(Stratagene)を用いてTGの代わりにACを挿入し、以下に図示された配列(配列番号7)：

BamHI ECOR1

AAA TCG GAT CTG ATC GAA GGT CGA CGG ATC CCC GGG AAT TCA TCG

K S D L I E G R R I P G N S S (配列番号14

)

Factor Xa

を作り出すことによって、細菌発現ベクターpGEX-3X(Pharmacia)中のXa因子内部に、SalI制限エンドヌクレアーゼ切断部位を作った。

【0071】

pCR2.1hOSM中のOSMインサートの配列を確認した後、BsmBI制限エンドヌクレアーゼ部位(下線部)を含有するフォワードプライマー5'-GATACGATC

G T C T C A T C G A G C G G C T A T A G G C A G C T G C - 3' (配列番号8)、及び

EcoRI部位(下線部)を含有するリバースプライマー5'-ATTACATGGA

A T T C C T A T C T C C G G C T C C G G T T C G G - 3' (配列番号9)を用いて、

該ベクターから成熟型のヒトOSMをコードするDNAをPCR増幅した。該PCR産物は、リーダー配列がなく、且つタンパク質の成熟化の時点で除去されるC末端の31アミノ酸がない成熟型のヒトOSMを含有する。PCR後に、増幅されたDNA断片を精製し、制限酵素BsmBIとEcoRIで消化し、SalIとEcoRIで制限消化された修飾pGEX-3Xベクター(Pharmacia:GSTをコードするDNAを含有する)中にサブクローニングして、pGEX196と表記されるプラスミドを作成した。配列を確認した後、大腸菌BLR-DE3(Novagen)の中にプラスミドpGEX196を形質転換した。形質転換した細胞は、100µg/mLのアンプシリンを補充した2xYT+G培養液(トリプトン16g/L;酵母抽出物10g/L;NaCl5g/L;NaOHによりpH7.0;2%グルコース)中で培養した。

20

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

30

10

20

30

40

50

ル電気泳動 (SDS PAGE) によって、画分を分析した後、クマシーブリリアントブルー色素で染色して、精製したタンパク質の完全性を確認した。

【0074】

Xa因子とクマシーブリリアントブルー染色されたSDS-PAGE分析によって示される最適な量のhOSMを産するトロニンとを用いて、タンパク質分解最適化実験をセットアップした。イオン交換クロマトグラフィーによってGSTとOSM産物の分離を達成し、N末端の配列決定と質量分析計によって精製したOSM産物を確認した。

【0075】

例7b: HepG2 B6: OSM誘導sPAPアッセイ

以下に記載されているsPAP(分泌胎盤アルカリホスファターゼ)cDNAの上流にある6つの機能的STAT3応答要素(RE)を安定的にHepG2細胞株(EGACC)にトランスフェクトしてHepG2B6を形成させた。STAT3(転写のシグナルトランスデューサー及びアクチベーター)は、IL-6サイトカインファミリー細胞間シグナリングカスケードの中間体である。細胞表面受容体STAT3の二量体化に続いて、リン酸化が行われた後、核の中のDNA REに結合し、下流のDNA(この構築物ではDNAはsPAPである)を活性化する。このように、この株は、オンコスタチンMの中で一晩インキュベートすることによってsPAPの産生を引き起こすことができる。

【0076】

STAT3応答性分泌胎盤アルカリホスファターゼ(sPAP)レポーター遺伝子を以下のごとく構築した。まず、3コピーのパリンドロームのSTAT3応答要素(Wegenka U. M. et al. Mol. Cell. Biol., 1993 Vol. 13 p. 276-288 p. 277の表1)と5'XhoI部位を含有するオリゴヌクレオチド対を、プラスミドpBluescript tkSPAPのユニークなSalI部位にクローニングしてp11P3-tk-SPAPを作った。フィブリノーゲンプロモーター中に見出されるSTAT3応答要素をコードする合成オリゴヌクレオチド6コピー(Dalmon et al. Mol. Cell. Biol.; 1993; 13: 1183-1193 図16、IL6REコンセンサスモチーフとGATテールのないTTGリーダーを含むhGF配列)を、さらに、p11P3-tk-SPAPのXhoI中にクローニングして、p11x6/11P3-tk-SPAPを作成した。応答要素p11x6/11P3-tk-SPAPの数を確認するために配列を決定した後、Nru1とXba1で消化して、9つのSTAT3応答要素とtk-SPAPをコードする配列とを含有するDNAの断片を単離した。続いて、プラスミドのpCDNA4(Invitrogen)のNru1とXba1部位の間にこれをして(CMVプロモーターと置き換えている)、9つのSTAT3応答要素、及びHepG2細胞株を確立するためのNeoR選択可能マーカートを含有するSPAP遺伝子レポーターを作出した。

【0077】

2mM L-グルタミン、1% NEAA、及び10%HIウシ胎児血清を補充したDMEM培地中にて、37℃、5%CO₂雰囲気、湿度92%でHepG2細胞(EGACC)を増殖させた。STAT-sPAPレポーターを用いたトランスフェクションのために、10cmの組織培養皿の中に、1%の密集度で細胞を播種し、リン酸カルシウムトランスフェクションキット(Invitrogen)を用いて、STAT-sPAPレポーターベクター10µgをトランスフェクトした。1mg/mLのG418個体細胞株の存在下で、クローン選択を行った後、IL-6がSTAT-sPAPレポーター遺伝子からsPAP発現の増加を引き起こす能力をスクリーニングした。

【0078】

100µLの培地(DMEM(Sigma)、10%HI FCS、1%の非必須アミノ酸、mMグルタミン、500µg/mLのG418、(全てLife Technologiesから))中ウェル当たり3×10⁴細胞の最終濃度になるように、96ウェルのプレート中にHepG2B6細胞を播種した。48時間、細胞を平衡化させた。推定抗OSM固体化合物をDMSO中の20mMのストック希釈物に調製し、DMSOで1:3の

10

20

30

40

50

連続希釈を行った。続いて、HepG26Bアッセイ培地（これは、10% HIFCSに置き換えた、1%の熱で不活化されたFCS、低アルカリホスファターゼ活性(Life Technologies)を有することを除いて上記培地と同じである)でさらにこれを希釈した。化合物は、最終濃度1%のDMSOで、最高濃度200 μ Mから最終濃度0.09 μ Mまで1:3で希釈した(すなわち、200、66.67、22.22、7.41、2.47、0.82、0.27、0.09、及び0 μ M)。古い培地をウェルから取り除き、2ng/mLのOSM(R&D Systems)も含有する希釈された化合物で置換し、さらに20時間細胞をインキュベートした。各希釈は3個ずつ行った。各ウェルから20 μ Lの培地を除去し、基質としてpNPP(p-ニトロフェニルリン酸; Sigma)を用いてsPAP活性をアッセイした。内在性アルカリホスファターゼはL-ホモアルギニンでブロックする。基質の光学密度は、405-650nmで読む。化合物の濃度は、産生したsPAPの測定値としてODに対してプロットし、IC50値を決定するために分析することができる。

10

【0079】

例7c: A549細胞: TNF 誘導sPAPアッセイ

本アッセイでは、アルカリホスファターゼに連結されたE-セレクチン遺伝子のサイトカイン応答領域を含むレポーター遺伝子で安定的にトランスフェクトされたA549細胞を用いた(Ray et al., Biochem J. 328: 707-715, 1997)。このトランスフェクトされた細胞株は、TNF との一晩のインキュベーションによってsPAPを産生するように誘導され得る。

20

【0080】

100 μ Lの培地中ウェル当たり 5×10^4 細胞の最終濃度になるように、96ウェルのプレート中に549細胞を播種した。24時間、細胞を平衡化させた。推定抗OSM固体化合物をDMSO中の20mMのストック希釈物に調製し、DMSOで1:3の連続希釈を行った。続いて、これを培地(DMEM、1、1%の熱で不活化されたFCS、低アルカリホスファターゼ活性、1%非必須アミノ酸、2mMグルタミン、500 μ g/mL G418(全てLife Technologiesから入手)でさらにこれを希釈して1%の最終濃度のDMSO中0.09-200 μ Mの濃度応答を得た。ウェルから古い培地を取り除き、3ng/mLのTNF(R&D Systems)も含有する希釈された化合物で置換し、さらに20時間細胞をインキュベートした。各希釈は3個ずつ行った。各ウェルから20 μ Lの培地を除去し、基質としてp-ニトロフェニルリン酸(Sigma)を用いてsPAP活性をアッセイした。内在性アルカリホスファターゼはL-ホモアルギニン(Sigma)でブロックする。基質の光学密度は、405-650nmで読む。化合物の濃度は、産生したsPAPの測定値としてODに対してプロットし、IC50値を決定するために分析することができる。

30

【0081】

例7d: 細胞生存アッセイ

細胞の生存は、テトラゾリウム化合物(3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2H-テトラゾリウム、内部塩; 490nmで直接測定できる可溶性ホルマザン産物へのMTS)を還元する代謝的に活性な細胞中のデヒドロゲナーゼ酵素の能力として測定した。

40

【0082】

0.046 μ g/mLのフェナジンメトサルフェート(PMS; Sigma)を含有する2mg/mLのMTS(Promega)の溶液をダルベッコPBS中で調製した。sPAP活性アッセイ用培地を除去した後、20 μ L/ウェルのMTS/PMSを添加した。続いて、さらに45分間、細胞をインキュベートした。続いて、630nmの参照を用いて490nmでの吸光度を測定した。

【0083】

例7e: アンタゴニスト

N-(1H-ピラゾロ[3,4-d]ピリミジン-4-イル)ベンズアミド(Davol 50

50

and Kerridge, J. Chem. Soc. 2589, 1961) (GW 340442X) は、 $0.3 \mu\text{M}$ の IC_{50} で濃度依存的な OSM 誘導 sPAP 放出の阻害をもたらしたが (図 16)、TNF 誘導 sPAP を阻害するにはずっと強度が低かった (約 $92 \mu\text{M}$ の IC_{50} 値) (図 17)。それ故、該化合物は、TNF に比べて、OSM に対する選択性が 100 倍を超える。

【0084】

例 8a: 抗ヒト OSM 抗体の作成と試験

以下のように、マウスの中でヒト OSM (R + D Systems) に対してモノクローナル抗体を生じせしめた: 第 0、3、5、及び 24 日目に、RIBI アジュバント (RIBI、ハミルトン、MT) 中に乳化した $1 \mu\text{g}$ の組換えヒト OSM 抗原 (皮下) とフロイントの完全アジュバント中 $1 \mu\text{g}$ の抗原 (腹腔内) (27 日目に、マウスには、生理的食塩水中 $1 \mu\text{g}$ の抗原の腹腔内投与を与えた) との組合せ、又は第 0、3、5、24、及び 53 日目に、腹腔内に RIBI アジュバントに乳化した $1 \mu\text{g}$ の抗原の何れかで、組換えヒト OSM を用いて SJL 雌マウス (Jackson Inc. Bar Harbor, MA) を免疫した (第 54 日に、マウスの腹腔内に生理的食塩水中の $1.5 \mu\text{g}$ の抗原を投与した)。

【0085】

歳後の免疫化から 24 時間後に、マウスを屠殺し、脾臓細胞を採取し、融合のための準備をした。融合操作は、Su J - Lら: Hybridoma 1998; 17(1): 47 - 53 に記載されているとおりであった。簡潔に述べれば、ポリエチレングリコール 1500 (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて、脾臓細胞とミエローマ細胞 P3X63Bcl-2-13 (Kilpatrick KE, et al Hybridoma 1997; 16(4): 387 - 395) とを 5:1 又は 1:1 の比率で融合した。等しい容量の 10% ウシ胎児血清 (Hyclone, Logan, UT)、 $1 \times \text{Origen Hybridoma Cloning Factor}$ (Igen, Gaithersburg, MD)、 2mM L-グルタミン、及びペニシリン/ストレプトマイシンを補充した RPMI 1640 (Life Technologies, Inc., Gaithersburg, MD) と EXCELL-610 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) から構成されるハイブリドーマ増殖用培地中に、 1×10^6 細胞/mL で融合細胞を再懸濁した。続いて、 1mL /ウェルで、24 ウェルのマイクロタイタープレート (Costar, Cambridge, MA) 中に細胞を播種した。24 時間後に、ハイブリドーマ増殖中の 1mL の $2 \times \text{HAT}$ 選別培地; $100 \mu\text{M}$ のヒポキサンチン、 $0.4 \mu\text{M}$ アミノプテリン、 $16 \mu\text{M}$ チミン (Life Technologies, Inc.) を各ウェルに添加した。37、5% CO_2 の培養から 2 週間後に、ELISA によって、抗 OSM 抗体の分泌について、ハイブリドーマ上清をスクリーニングした。選択したハイブリドーマに対して、制限希釈クローニング (limiting dilution cloning) を行った。

【0086】

結合したヒト OSM を含有する 96 ウェルのプレート中でハイブリドーマの上清と希釈した血清をインキュベートした。アルカリホスファターゼ抗マウス抗体によって、抗 hOSM 抗体を検出した。陽性の結果を与えた抗体についての 2 回反復測定した OD 値が表 2 に示されている。

【0087】

【表 2】

10

20

30

40

表 2

ハイブリドーマ	OD 1:10	OD 1:100	OD 1:1000
OM5-6.1	1.346	0.901	0.302
	1.329	0.929	0.249
OM5-6.10	1.347	1.017	0.296
	1.434	1.122	0.352
OM6-10.111	1.77	1.073	0.36
	1.615	1.557	.0524
マウス血清	OD 1:500	OD 1:2500	OD 1:5000
M1	0.006	0	0.005
	0.006	0.001	0.003
M2	1.843	1.086	0.73
	1.86	1.052	0.794
M3	1.405	0.445	0.198
	1.338	0.324	0.127
M4	1.48	0.537	0.18
	1.631	0.484	0.18

10

20

3つの上清と1つを除く全てのマウス血清がELISAで陽性の結果を与えた。ELISAデータを用いて、抗体濃度のおよその測定値を決定し、続いて、例7bに記載されたHepG2 B6 sPAPアッセイで、2 ng/mLのOSMに対して陽性抗体を滴定した。要約すれば、HepG2 B6細胞とインキュベートする前に、4で、抗体をサイトカインと共に一晩インキュベートした。例7bに記載されているようにsPAP産生をアッセイした。ハイブリドーマ上清及びマウスの血清によるsPAP産生の障害が図18に示されている。

【0088】

例9a：OSM上に存在する受容体に対する中心的結合残基の同定

まず、サイトカインのIL-6ファミリーの関連メンバーと参照することによって、hOSM上の受容体結合部位を同定した。部位1と3は、受容体のサイトカイン特異的な鎖への結合に関与していると考えられているのに対して、部位2は、共通の受容体成分gp130への結合に関与していると考えられている。IL-6ファミリーサイトカインの白血病増殖阻止因子(LIF)中の部位2の突然変異研究(Hudson et al (1996) J. Biol. Chem. 271, 11971-11978)、インターロイキン-6(IL-6)(Paonessa et al (1995) EMBO J. 14, 1942-1951、及びSavino et al (1994) EMBO J. 13, 1357-1367)は、部位2の中の残基への変化は、gp130への結合の変化をもたらすことができるということを示唆している。そのgp130との相互作用に重要であるOSMの残基を調査するために、部位2の領域中のOSMの表面に露出しているであろう残基を同定することが必要であった。nmr実験(Hoffman et al (1996) J. Biomol. NMR 7273-282)及びLIFの公表された構造(Robinson et al (1994) Cell 77 1101-16)からの情報を用いて、OSMの相同性モデルを構築した。このモデルで部位2領域中の表面位置を占める残基を突然変異誘発のために選択した。成長ホルモン(OSMの相同体)とその受容体との間に形成された複合体の構造を決定した(Devosら(1992) Science 255 306)。OSMのモデルを成長ホルモンと重ね合わせることによって、OSMとgp130との間で相互作用している可能性がある部位がさらに同定された。これらのモデル研究に基づいて、gp130とのその相互作用を調べるために、OSM中

30

40

50

の27部位を突然変異のために選択した。表3を参照されたい。これらの各部位では、アラニン残基が野生型残基と置きかえられた。

【0089】

【表3】

表 3

部位	部位	コメント
Ser 7	N 末端領域	
Lys 8	N 末端領域	
Glu 9	N 末端領域	
Tyr 10	ヘリックス A	
Arg 11	ヘリックス A	
Leu 13	ヘリックス A	現モデルではこれらのロイシンの露出が境界線である。第 17 残基以下のヘリックス中にひずみがあればヘリックス1の上部は回転し、これらの残基は埋まり得る。
Leu 14	ヘリックス A	
Leu 17	ヘリックス A	
Gly 15	ヘリックス A	
Gln 16	ヘリックス A	もしその下に存在する構造がらせんであれば残基 16-22 はほぼ連続した親水性残基の連なりであり、続いてこれらの幾つかはタンパク質のコアに埋められ、おそらく水素結合している対残基を有する。あるいは、ヘリックスはこの領域でゆがんであり、これらの残基の多くは露出されている。
Gln 18	ヘリックス A	
Lys 19	ヘリックス A	
Gln 20	ヘリックス A	
Thr 21	ヘリックス A	
Asp 22	ヘリックス A	
Gln 25	ヘリックス A	
Asp 26	ヘリックス A	
Met 113	ヘリックス C	
Pro 116	ヘリックス C	
Asn 117	ヘリックス C	
Leu 119	ヘリックス C	
Gly 120	ヘリックス C	側鎖に官能性はないが、gp130 の結合に影響を与えるヒト LIF の四重変異体の一つである。
Arg 122	ヘリックス C	
Asn 123	ヘリックス C	
Asn 124	ヘリックス C	
Tyr 126	ヘリックス C	
Gln 130	ヘリックス C	

例 9 b : 変異体 O S M - G S T 融合分子の合成

27の各突然変異について、一対の突然変異オリゴヌクレオチドがデザインされた。これ

10

20

30

40

50

らは、長さが約33塩基であり、好ましくは、何れかの末端にG又はC残基を有していた。lac(/ IPTG誘導性)プロモーター(Pharmacia)の制御下で、「野生型」OSM DNA(配列番号12参照)を含有するpGEX(Pharmacia)由来の発現にこれらをアニーリングさせ、ネイティブPfuポリメラーゼ(Stratagene)を用いて伸長させた。Dpn1(New England Biolabs)を用いて最初のテンプレートDNAを消化し、新たに合成したプラスミド(これはDpn1の基質ではなかった)を大腸菌株DH5(GibcoBBL/Life Technologies)中に形質転換した。少ないコロニーのセット(典型的には4つ)を取り出し、プラスミドDNAを単離し、DNA配列を決定した。各変異に対する代表的な変異体クローンを、組換えタンパク質を発現させるために、同様に構築した野生型と平行して、大腸菌株BLR(非DE3:Novagen)中に形質転換した。0.5Lの培養液を確立し、約0.5のOD550に誘導した。3時間誘導した後、細胞を遠心によって沈降させ、ライソザイムと音波処理を組合せた方法を用いて溶解させた。組換え変異タンパク質は、GSTとの融合として発現されたので、融合物を結合するために、グルタチオンセファロースカラムを用いた。続いて、フリーのグルタチオンを用いて、カラムから融合タンパク質を溶出した後、室温で4時間10mMのDTTの中でインキュベートして、グルタチオン付加物を除去し、-80で保存した。

【0090】

例9c: OSM-GSTがELISAにおいて野生型OSMのgp130-Fcへの結合と拮抗する能力に対する点変異の影響

野生型OSM(例7aに従って作成); 50 μ L/ウェル、1 μ g/mL炭酸/重炭酸緩衝液pH9.4中)によって、一晚(4)Nunc Immunoplates(F6 Maxisorp, Life Technologies)をコートした。プレートを洗浄し(PBS 0.05% Tween 20で \times 6、Skatron Plate洗浄機を使用)、叩いて乾燥させ、非特異的結合を減少させるためにブロックした(200 μ L/ウェル、1%BSA/PBS)。1時間インキュベートした後に(室温、揺動する台の上)、プレートを叩いて乾燥させ、例9bで得た野生型(wt)又は変異体OSM-GSTを添加した(50 μ L/ウェル、20-0.002 μ g/mL、1%BSA/PBS中で滴定)。ポジティブコントロールとして、ポリクローナル抗ヒトOSM抗体(R&D Systems)もテストした(20-0.02 μ g/mL)。gp130-Fc(300ng/mL以下になるように作成)と1%のBSA/PBS(50 μ L/ウェル)中の抗ヒトIgGアルカリホスファターゼコンジュゲート(1:500、Sigma)との複合体は、テストされる物質の直後に添加した。5時間インキュベートした後に(室温、揺動する台の上)、プレートを洗浄し(\times 6)、製造者の指示どおりにELISA Amplification System(Life Technologies)を用いて展開し、490nmでODを測定した。各プレート上で、1%BSA/PBSの存在下gp130-Fc/コンジュゲートとOSMにより総結合を決定し、OSMの不存在下gp130-Fc/コンジュゲートにより非特異的結合、又はgp130-Fcの不存在下でのコンジュゲートのOSMへの結合を決定した。

【0091】

ヒトgp130の細胞外ドメインをコードするDNAは、ヒトgp130のGenBank得データベース配列(受付番号M57230)からデザインした合成オリゴヌクレオチドプライマー、

フォワードプライマー：

5' CATCGGATCCAAGCTTTACAGTTACTGAGCACAGGACCTCACC 配列番号10

BamHI HindIII 5' UTR配列

ATGTTGACGTTGCAGACTTG

M L T L Q T (配列番号15)

および

リバープライマー：

5' CATCCTCGAGTTTCTCCTTGAGCAAACCTTTGG 配列番号11

XhoI

を用いたポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅した。

10

【0092】

前記フォワードプライマーは BamHI と HindIII 制限エンドヌクレアーゼ部位、及びその後 g p 130 コード配列の開始と相補的な DNA 配列が続いているコンセンサス 5' 未翻訳配列を含有していた。前記リバープライマーは、その後、g p 130 コード配列の細胞外ドメインの 3' 末端と相補的な DNA 配列が続いている XhoI 制限エンドヌクレアーゼ部位を含有していた。該 PCR 断片を精製し、pCR2.1 g p 130 を与えるために pCR2.1 (Invitrogen) 中にサブクローニングした。

【0093】

プラスミド pCR2.1 g p 130 を制限酵素 BamHI と XhoI で消化し、g p 130 断片を精製し、ヒト IgG1 の Fc 断片をコードする DNA 配列を含有するプラスミド中の BamHI と XhoI エンドヌクレアーゼ部位の中にサブクローニングした。続いて、制限酵素 HindIII でプラスミドを消化し、得られた g p 130 Fc 断片を精製し、バキュロウイルス発現ベクター、pFastBac1 (Life Technologies) の HindIII 部位中にサブクローニングして、pBAC g p Fc と表記されるプラスミドを作成した。

20

【0094】

Bac-to-Bac バキュロウイルス発現システム (Life Technologies) を用いて、昆虫細胞の中で融合タンパク質 g p 130 Fc を発現した後、プロテイン A アフィニティーカラムクロマトグラフィーによって細胞培養上清から精製し、クマシーブリリアントブルー染色した SDS-PAGE 及び市販の抗 g p 130 と抗 h IgG 抗体を用いたウェスタンブロット分析によって確認した。IC₅₀ を得るために、3-6 実験で変異及び野生型 OSM-GST をテストした。OSM と g p 130-Fc の存在下、拮抗するリガンドの不存在下での平均 OD (すなわち、総結合) は 1.157 (レンジ 0.825 - 1.807) であり、非特異的結合は、0.08 未満であった。抗 OSM 抗体は、全てのアッセイで濃度依存的な阻害をもたらした (1 μg/mL で 74 ± 1% 阻害)。野生型 OSM-GST は、プレートに結合した OSM と競合して、6 つの独立した実験で決定された 0.139 ± 0.0258 μg/mL の IC₅₀ で、濃度依存的な阻害を与えた (図 19)。変異 OSM-GST がプレートに結合した wt OSM と競合する効力は、表 4 にまとめられている。wt OSM と g p 130 の結合を競合する能力が実質的に減少した変異は、L13A、Q16A、Q20A、G120A、N123A、及び N124A であった。これらのうち、Q20A と Q16A は最も弱かった：テストした最大濃度 (10 μg/mL) で、Q20A は 66 ± 2.3% の阻害を引き起こし、Q16A は 15 ± 8% の阻害にすぎなかった (図 19)。

30

40

【0095】

表 4：野生型及び変異 OSM-GST が ELISA においてプレートに結合した wt OSM と g p 130-Fc への結合を競合する効力。IC₅₀ 値は 3-6 の独立した実験で決定された。

【0096】

【表 4】

変異体	IC50[$\mu\text{g/ml}$]			平均	標準誤差
野生型	0.110	0.120	0.257	0.139	0.026
	0.136	0.070	0.142		
(1) S7A	0.199	0.078	0.121	0.133	0.035
(2) K8A	0.252	0.055	0.106	0.138	0.059
(3) E9A	0.208	0.163	0.097	0.156	0.032
(4) Y10A	0.320	0.180	0.168	0.223	0.049
(5) R11A	0.181	0.255	0.280	0.239	0.030
(6) L13A	2.960	1.990	2.640	2.530	0.285
(7) L14A	0.660	0.470	0.412	0.514	0.075
(8) G15A	0.090	0.203	0.171	0.155	0.034
(9) Q16A	>10	>10	>10	>10	
(10)L17A	2.210	1.900	1.350	1.820	0.251
(11)Q18A	0.320	0.310	0.555	0.395	0.080
(12)K19A	0.047	0.075	0.300	0.040	0.116
(13)Q20A	4.130	5.570	4.100	6.200	5.000
(14)T21A	0.108	0.044	0.101	0.084	0.020
(15)D22	0.040	0.080	0.092	0.071	0.016
(16)M113A	0.511	0.199	0.252	0.321	0.096
(17)P116A	0.232	0.169	0.197	0.199	0.018
(18)N117A	0.983	0.756	0.617	0.785	0.107
(19)L119A	0.272	0.266	0.227	0.255	0.014
(20)G120A	3.650	2.680	2.950	3.090	0.289
(21)R122A	0.140	0.220	0.167	0.176	0.024
(22)N123A	4.750	1.570	2.560	2.960	0.940
(23)N124A	1.630	1.950	2.380	1.990	0.217
(24)Y126A	0.386	0.359	0.400	0.382	0.012
(25)Y130A	0.145	0.180	0.094	0.140	0.025
(26)Q25A	0.042	0.036	0.055	0.044	0.006
(27)D26A	0.170	0.280	0.481	0.310	0.091

10

20

30

例 9 d : Hep G2 B6 インビトロアッセイにおける OSM 駆動 sPAP 産生に対する OSM 中の点変異の影響 40

上記例 7 b に記載したアッセイを利用した。OSM-GST 変異体は、濃度が明らかな例 9 b で作成したインタクトな OSM 変異体を用いて、100 ng/mL の濃度に希釈した。対照用に野生型 OSM-GST を含有せしめた。1% の熱で不活化された FCS、低アルカリホスファターゼ活性の Hep G2 B6 溶媒で希釈を行った。続いて、1:3 の連続希釈を行った (100; 33.33; 11.11; 3.7; 1.23; 0.4 ng/mL)。100 μL の溶媒中、96 穴のプレートの各ウェルの中に 3×10^4 個の Hep G2 B6 を分配した。48 時間、細胞を平衡化させた。続いて、溶媒を取り除き、100 μL の希釈された OSM-GST 変異体で置換した。さらに 20 時間細胞をインキュベートした。各希釈は 3 個ずつ行った。20 μL の溶媒を除去し、基質として pNPP を用い 50

てs P A Pをアッセイした。内在性A L PはL - ホモアルギニンでブロックした。O . D . は、4 0 5 - 6 5 0 n mで読んだ。実験は、2 回繰り返した。

【 0 0 9 7 】

多くの変異体は、野生型と同じように、s P A Pの放出を駆動することができた。3 つの変異体は、極めて低レベルのs P A Pを産生した。E C ₅₀ は、これらの変異体からは得られなかった。(図 2 0) は、s P A Pの産生を駆動する効率がより低い「変異体 9 (Q 1 6 A)、1 3 (Q 2 0 A)、及び 2 0 (G 1 2 0 A) から得られたO . D . プロットを示している。野生型O S M - G S Tを比較のために示す。これらのデータは、E C ₅₀ 値を算出するために使用した。各変異体に対する実際のE C ₅₀、及び野生型のパーセントとしての表記が表 5 に示されている。

【 0 0 9 8 】

【 表 5 】

表 5

変異体	実験1 %	実験1 EC ₅₀ ng ml ⁻¹	実験2 %	実験2 EC ₅₀ ng ml ⁻¹	実験3 %	実験3 EC ₅₀ ng ml ⁻¹	平均 %	効力
WT	100	24	100	32			100	
1 S7A	50	12	69	22.2			59.5	増加
2 K8A	66	16	38	12.5			52	増加
3 E9A	98	23.6	27	8.9			62.5	増加
4 Y10A	134	32.4	256	82			195	減少
5 R11A	118	28.6	86	27.7			102	同等
6 L13A	269	65.7	171	54.9			220	減少
7 L14A	81	19.4	77	24.9			79	増加
8 G15A	87	21	55	17.8			71	増加
9 Q16A		NC		NC				なし
10L17A	301	72.7	174	56			237.5	減少
11Q18A	84	20.2	68	21.7			76	増加
12K19A	98	23.6	37	11.9			67.5	増加
13Q20A		NC		NC				なし
14T21A	71	17	33	10.5			52	増加
15D22	152	36.7	50	16			101	同等
16M113A	106	25.6	78	25			92	同等
17P116A	104	25	47	15			75.5	増加
18N117A	241	58	132	42.5			186.5	減少
19L119A	115	27.8	72	23			93.5	同等
20G120A		NC		NC				なし
21R122A	135	32.4	43	13.8	124	47.3	101	同等
22N123A	157	37.9	154	49.7			155.5	減少
23N124A	125	30.2	113	36.2			119	同等
24Y126A	386	93	32	10.3	106.5	40.8	175	減少
25Q130A	52	12.5	26	8.2			39	増加
26Q25A	55	13.3	41	13			48	増加
27D26A	81	19.5	79	25.5			80	同等

EC₅₀値は、野生型 EC₅₀ のパーセントとして表されてなり、実験の EC₅₀ 値が示されている。 <80% 野生型に比べて効力増加; 80-120% 同等の効力; >120% 効力減少。 NC—算出せず。

この表を調べると、ELISAにおいて野生型とは相当異なるそれらの変異体のうち3つは、sPAPアッセイでもより効力が低く、6-L13A; 10-L17A; 22-N123A、及び4番目の23-N124Aは、任意的なスコアリングシステムにより、同等の効力グレードに区分される。このように、両タイプのアッセイは、良好な一致を示している。変異体の幾つかは、sPAP産生の駆動において野生型より「効力」が低かったが、sPAPを全く駆動しなかった変異体(Q16A、Q20A、G120A)での実験を除く2つの実験の間には変動があった。該アッセイ結果は、G120A、Q16A、及び

10

20

30

40

50

Q20AはOSMのgp130への結合に影響を与えることを示している。N123AとN124Aもgp130との相互作用に幾らかの影響を有するようである。

【0099】

例10：胃炎におけるOSMの役割

H.ピロリは、胃炎、消化性潰瘍性疾患、及び胃癌を引き起こすと推測されているらせん状のグラム陰性細菌である。H.ピロリCag+株は、H.ピロリCag-株よりも潰瘍の発生率が高い。ディファレンシャル遺伝子発現分析によって、宿主のH.ピロリ感染に対する応答を調べるために、H.ピロリ株（より病原性の強いCag+、及びCag-）を胃内皮細胞株KATO I I I (E C A C C)と共にインピトロで培養した。45分、3時間、及び24時間の3つの時点でmRNAを単離し、由来する放射性プローブを（サイトカイン、サイトカイン受容体、及び接着分子を含むおよそ136のヒト遺伝子を含む）高密度cDNA遺伝子アレイにハイブリダイズさせた。得られた遺伝子発現のプロファイルの分析によって、H.ピロリ株に感染した多数の遺伝子の誘導/抑制が明らかになった。オンコスタチンMは、病原性が弱いH.ピロリ(Cag-)に暴露された細胞又は未処置の対照に比べて、病原性が強いH.ピロリ(Cag+)株に暴露された細胞中で誘導されることが見出された。

10

【図面の簡単な説明】

【図1】 滑膜生検培養物によるエクソピボでのオンコスタチンMの分泌を示すELISAを示す図。

【図2】 炎症性であるが、非炎症性でない滑膜培養物によるエクソピボでのオンコスタチンMの自発的分泌を示す図。

20

【図3】 PMAで分化されたTHP-1細胞によるrhOSMのTNF産生の効果を示す図。

【図4】 OSMとTNFとのエクソピボでのコラーゲン放出を促進する協働作用を示す図。

【図5】 OSMとTNFとのエクソピボでのコラーゲン放出を促進する協働作用を示す図。

【図6】 抗L-セレクチン抗体を介したOSMの分泌を示す図。

【図7】 フコイダンで誘導されたOSMの分泌を示す図。

【図8】 gp130P及びE-セレクチン抗体を用いたRAの血管内皮細胞の染色を実証した顕微鏡写真。

30

【図9】 gp130P及びE-セレクチン抗体を用いたRAの血管内皮細胞の染色を実証した顕微鏡写真。

【図10】 対照及びCII-関節炎マウスから得た関節中のOSMのmRNAを示す図。

【図11】 ヤギ抗OSM抗体又は対照ヤギIgGで処置した関節炎DBA-1マウスを示す図（11Aは臨床スコア、11Bは肢の厚さ）。

【図12】 コラーゲン関節炎マウスにおける関節の浸潤と軟骨の損傷を比較した組織学的データを示す図（対照マウスは、PMN及び単核細胞による関節への著しい浸潤を示した）。

40

【図13】 コラーゲン関節炎マウスにおける関節の浸潤と軟骨の損傷を比較した組織学的データを示す図（関節の軟骨の表面破壊は、広い好中球の浸潤を特徴とした）。

【図14】 コラーゲン関節炎マウスにおける関節の浸潤と軟骨の損傷を比較した組織学的データを示す図；細胞の浸潤レベルが顕著に減少しており関節の軟骨が損傷されていないことを実証する、正常/穏やかな関節炎の抗OSM処理した動物の代表的な関節。

【図15】 コラーゲン関節炎マウスにおける関節の浸潤と軟骨の損傷を比較した組織学的データを示す図；細胞の浸潤レベルが顕著に減少しており関節の軟骨が損傷されていないことを実証する、正常/穏やかな関節炎を有する抗OSM処理した動物の代表的な関節。

【図16】 OSMに誘導されたsPAP放出の濃度依存性阻害を示すN-(1H-ピラ

50

ゾロ[3, 4-d]ピリミジン-4イル)ベンズアミドに対するHepG2 B6 sPAP及びMTSアッセイを示す図。

【図17】 A549細胞からのTNF誘導性sPAPの放出の限られた阻害を示すN-(1H-ピラゾロ[3, 4-d]ピリミジン-4イル)ベンズアミドに対するTNF sPAP及びMTSアッセイを示す図。

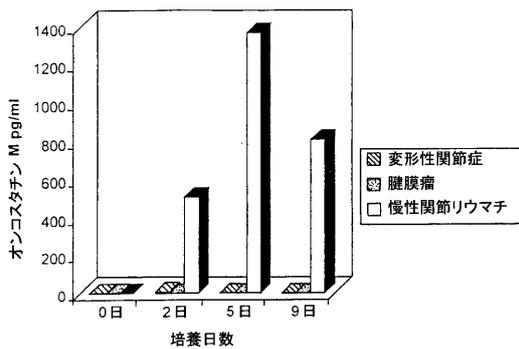
【図18】 HepG2 B6アッセイにおけるsPAP産生の抗体阻害を示す図(M2 M4は、4匹のマウス個体から採取したマウスの血清を表し、OM5-6.1、OM5-6.10、OM6-10.111は実験的に得られたハイブリドーマの上清を表す)。

【図19】 野生型及びプレートに結合した野生型OSMとの変異OSM-GST融合体とのElisaにおけるgp130-fcへの結合の拮抗を示す図。

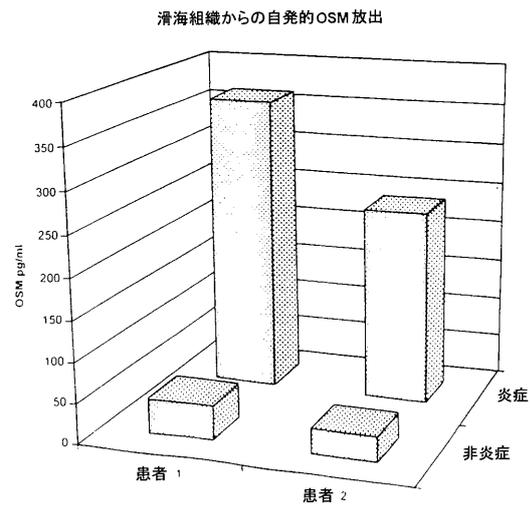
【図20】 HepG2細胞におけるsPAP産生を引き起こす活性が最少である3つの変異OSM-GSTのO.D.プロットを示す図。

10

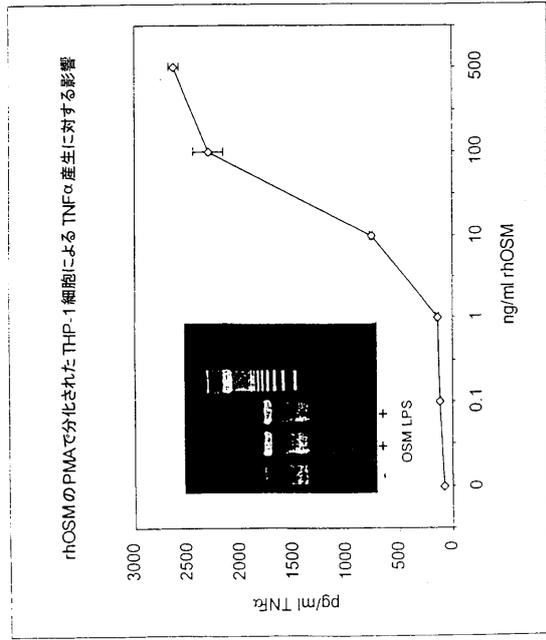
【図1】



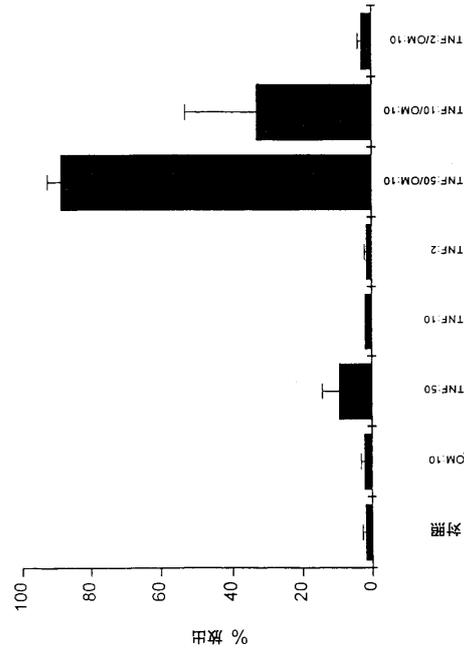
【図2】



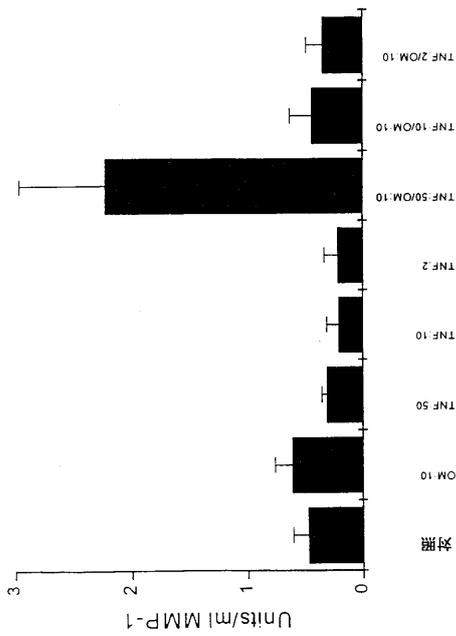
【 図 3 】



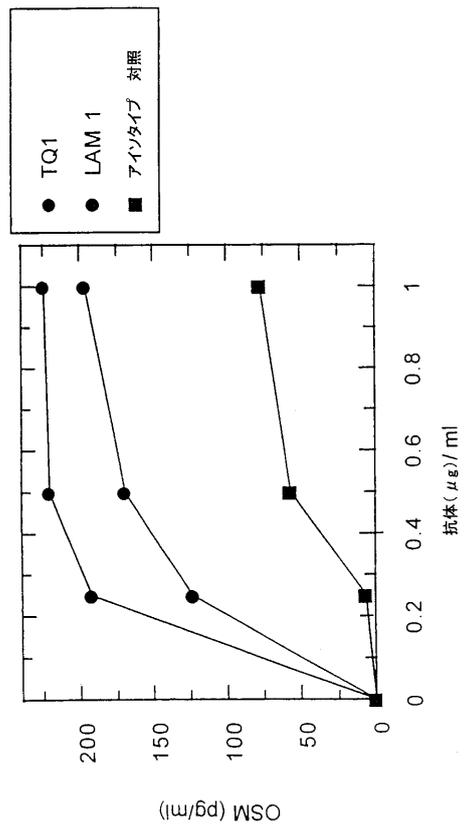
【 図 4 】



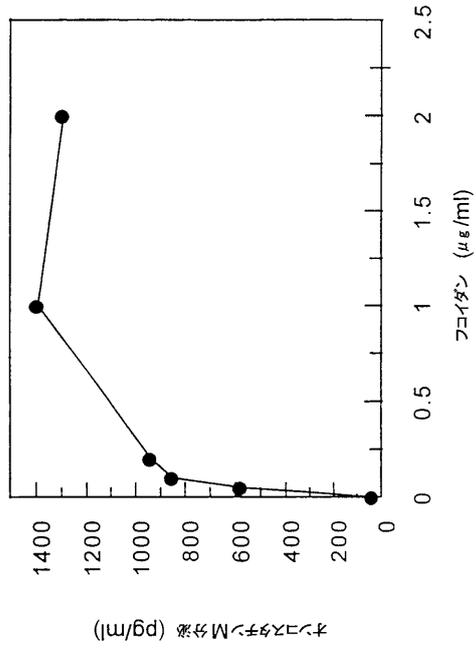
【 図 5 】



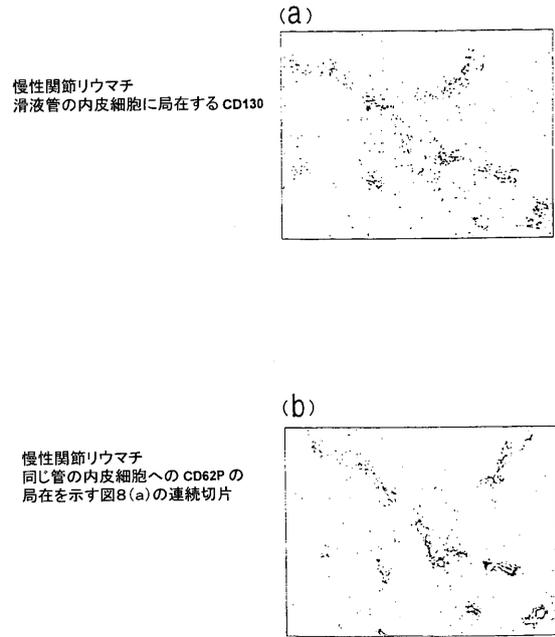
【 図 6 】



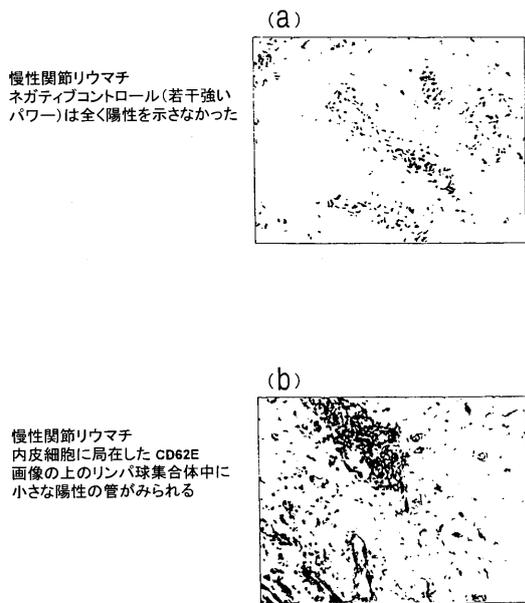
【 図 7 】



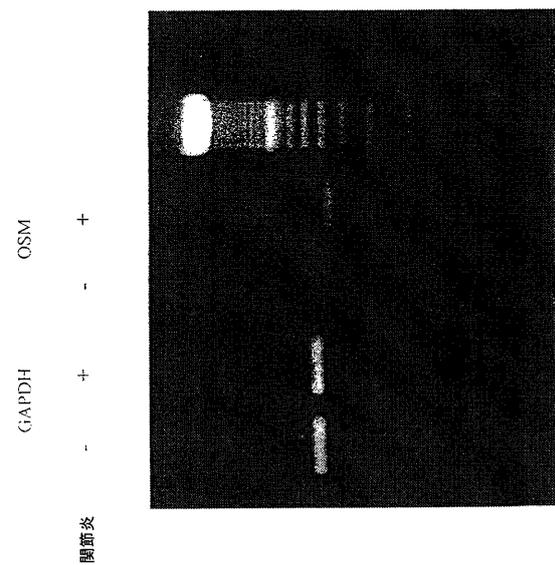
【 図 8 】



【 図 9 】

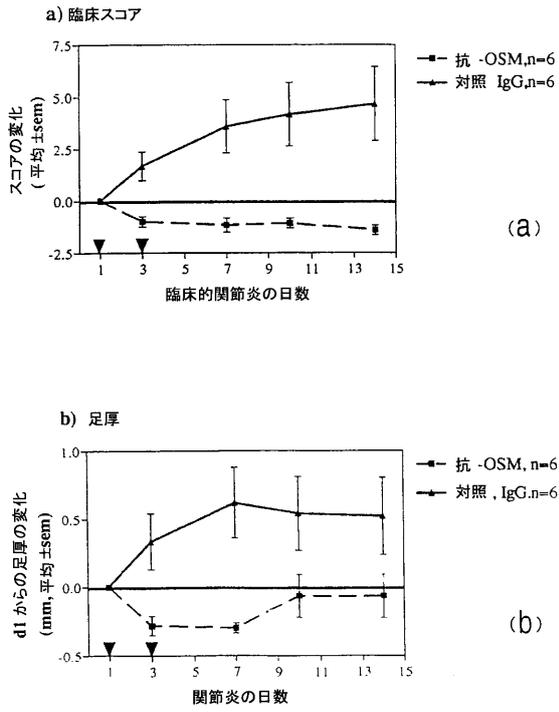


【 図 10 】



【 図 1 1 】

第1日及び第3日にヤギ抗-OSM Ab 又は対照ヤギ IgG (100 µg/ 投与)で処置した関節炎の DBA/1 マウスの臨床症状



【 図 1 2 】



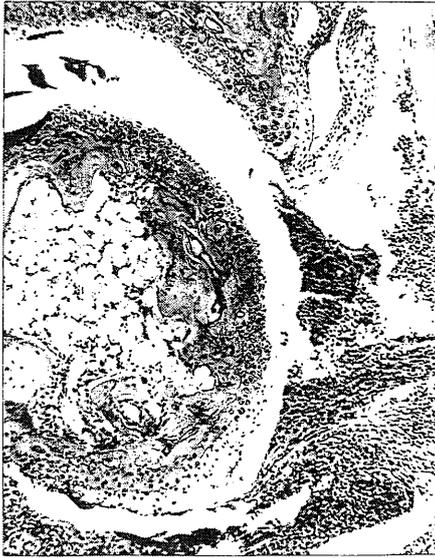
【 図 1 3 】



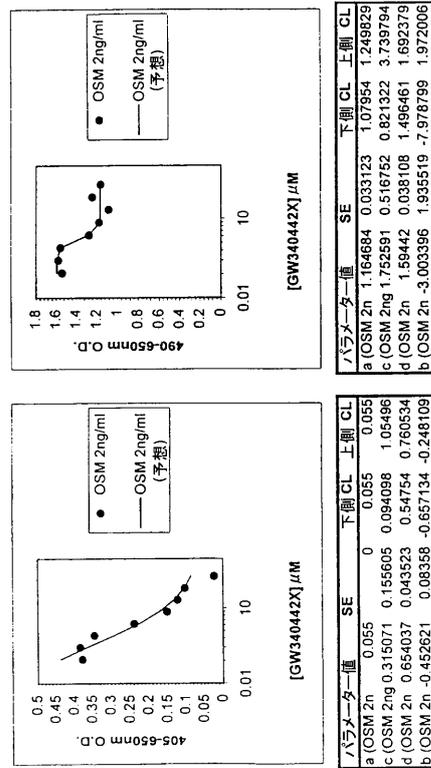
【 図 1 4 】



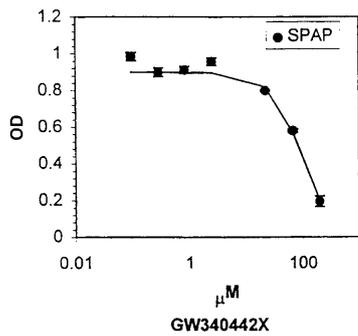
【 図 15 】



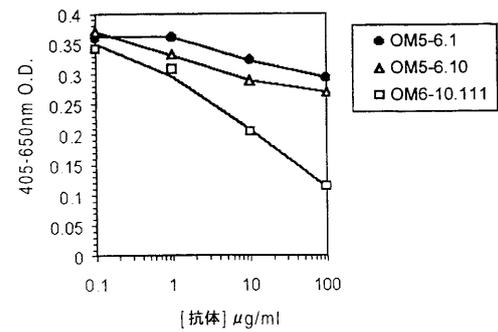
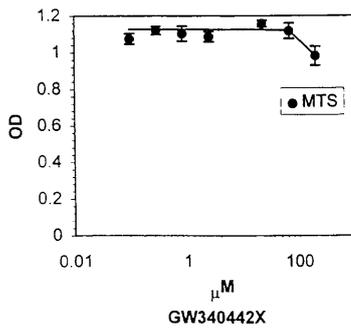
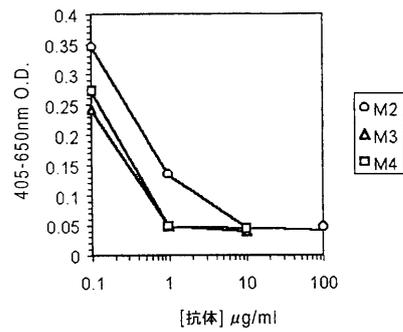
【 図 16 】



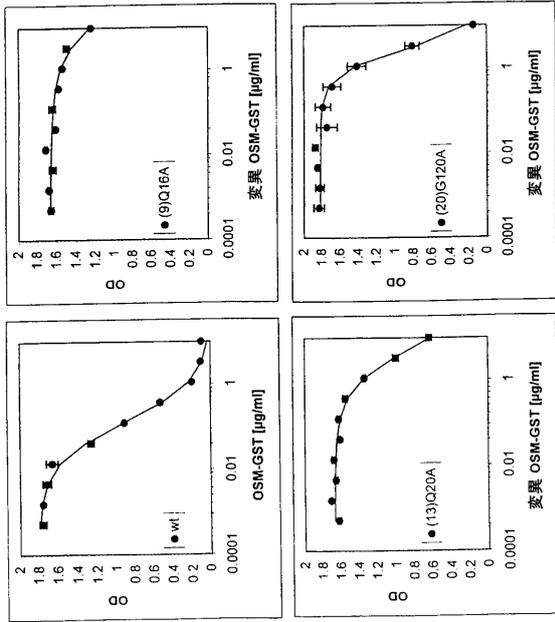
【 図 17 】



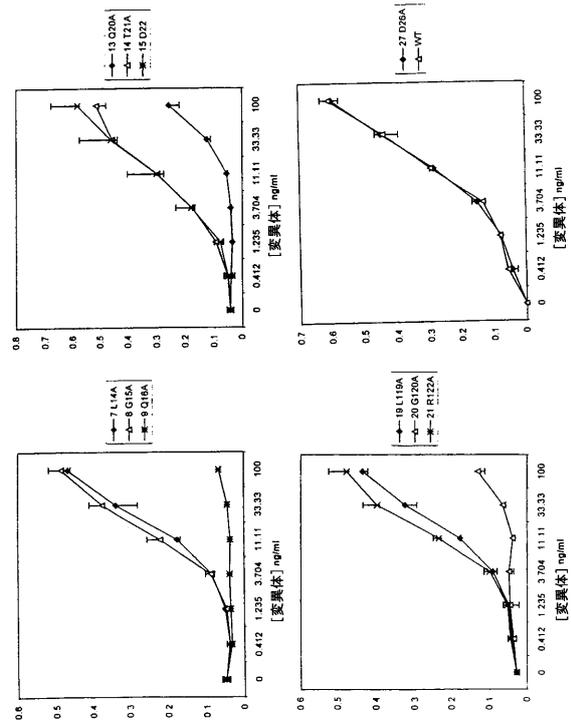
【 図 18 】



【 図 19 】



【 図 20 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl.

F I

A 6 1 P 43/00 1 1 1

(74)代理人 100084618

弁理士 村松 貞男

(74)代理人 100068814

弁理士 坪井 淳

(74)代理人 100092196

弁理士 橋本 良郎

(74)代理人 100095441

弁理士 白根 俊郎

(72)発明者 ライフ、ポール・フレデリック

イギリス国、エスジー・２エヌワイ、ハートフォードシャー、スティーブンエイジ、ガンネルズ
・ウッド・ロード、グラクソ・ウェルカム・パブリック・リミテッド・カンパニー内(番地なし)

審査官 瀬下 浩一

(56)参考文献 特開平０５－２４４９８０(ＪＰ，Ａ)

国際公開第９７／００９３５１(ＷＯ，Ａ１)

国際公開第９６／０１２７４１(ＷＯ，Ａ１)

INFLAMMATION RESEARCH, Jan 1998, Vol.47, No.1, pp.1-7

NEW ENGLAND JOURNAL OF MEDICINE, 1997, Vol.9, No.7, pp.2847-2853

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)

A61K 45/00

A61K 39/395

A61P 19/02

A61P 29/00

A61P 43/00

BIOSIS(STN)

CAplus(STN)

EMBASE(STN)

MEDLINE(STN)