

I290832

(此處由本局於收
文時黏貼條碼)



發明專利說明書

737949-1



(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：94109603 (由89116997分割)

※申請日期 89.8.22

※IPC分類：A61K 38/21,

一、發明名稱：

39/395, A61P 35/00

(中) HM1 · 24 抗原之表現增強劑

(英) Expression enhancer for HM1.24 antigen

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 中外製藥股份有限公司

(英) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

代表人：(中) 1. 永山治

(英)

地 址：(中) 日本國東京都北區浮間五丁目五番一號

(英) 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo, Japan

國籍：(中英) 日本 JAPAN

三、發明人：(共 3 人)

1. 姓 名：(中) 小阪昌明

(英) KOSAKA, MASAOKI

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

2. 姓 名：(中) 尾崎修治

(英) OZAKI, SHUJI

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

3. 姓 名：(中) 若原裕二

(英) WAKAHARA, YUJI

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 ☐ 主張國際優先權：

I290832

(此處由本局於收
文時黏貼條碼)



發明專利說明書

737949-1



(本申請書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：94109603 (由89116997分割)

※申請日期 89.8.22

※IPC分類：A61K 38/21,

一、發明名稱：

39/395, A61P 35/00

(中) HM1 · 24 抗原之表現增強劑

(英) Expression enhancer for HM1.24 antigen

二、申請人：(共 1 人)

1. 姓 名：(中) 中外製藥股份有限公司

(英) CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

代表人：(中) 1. 永山治

(英)

地 址：(中) 日本國東京都北區浮間五丁目五番一號

(英) 5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku, Tokyo, Japan

國籍：(中英) 日本 JAPAN

三、發明人：(共 3 人)

1. 姓 名：(中) 小阪昌明

(英) KOSAKA, MASAOKI

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

2. 姓 名：(中) 尾崎修治

(英) OZAKI, SHUJI

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

3. 姓 名：(中) 若原裕二

(英) WAKAHARA, YUJI

國 籍：(中) 日本

(英) JAPAN

四、聲明事項：

◎本案申請前已向下列國家(地區)申請專利 ☐ 主張國際優先權：

I290832

737949-1

【格式請依：受理國家（地區）；申請日；申請案號數 順序註記】

1. 日本 ; 1999/08/23 ; 11-236007 ☒有主張優先權
2. 日本 ; 2000/02/16 ; 2000-38689 ☒有主張優先權

(1)

九、發明說明

【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種對骨髓瘤作為表現增強劑的干擾素 α 與干擾素 γ 以及 IRF-2 蛋白質的使用。

【先前技術】

骨髓瘤 (myeloma) 亦稱為漿細胞瘤 (plasmacytoma)、多發性骨髓瘤 (multiple myeloma)，係於單株的漿細胞之骨髓內聚集為特徵之腫瘤性疾病。骨髓瘤，係產生並分泌免疫球蛋白的分化至最終之 B 細胞，即，以漿細胞為單株的主體對骨髓的增殖之疾病，此疾病的患者血清中被檢測出單株的免疫球蛋白或其構成成份之 L 鏈、H 鏈等。

骨髓瘤的治療上，至今雖有使用化學治療法，但未見到可將骨髓瘤完全鬆解、延長骨髓患者的生存期間之有效治療。具有骨髓瘤有效治療之藥劑被期待者。

另一方面，Goto, T. 們有報告指出人類骨髓瘤細胞由將老鼠免疫所獲得之單株抗體（老鼠抗 HM1.24 抗體）（Blood (1994) 84, 1922-1930）。由移植人類骨髓瘤細胞的老鼠上投與抗 HM1.24 抗體時，此抗體會特異地聚積於腫瘤組織（小阪昌明們，日本臨床 (1995) 53, 627-635），可應用至放射線物質標識抗 HM1.24 抗體作腫瘤部位的診斷，或放射線免疫治療等的追蹤治療法。

又，如上述 Blood (1994) 84, 1922-1930 中，抗 HM1.24 抗體對體外而言，有記載對人類骨髓瘤細胞株 RPMI 8226 具有細胞傷害活性。又記載著，抗老鼠 HM1.24 抗體經嵌合化

(2)

的抗嵌合 HM1.24 抗體、以及人類化的重組抗 HM1.24 抗體，與骨髓瘤細胞作特異性的結合，且顯示具有細胞傷害活性 (Blood (1999)93,3922-3930)。

如此的 HM1.24 抗原於最終分化 B 細胞的骨髓瘤細胞中有特異性地高度表現，辨識此抗體的抗 HM1.24 抗體，可發揮與細胞表面的 HM1.24 分子數成比例的殺細胞活性，可知使用抗 HM1.24 抗體的免疫治療法係對多發性骨髓瘤具有效果之治療法。因此，僅可增強作為抗 HM1.24 抗體的抗原之 HM1.24 抗原其細胞表面上的表現量，即可由少量的抗體投與而期待同等的細胞傷害活性，且副作用可降低。

另一方面，作為顯示病毒增殖抑制活性的物質而被發現之干擾素，現今對乳類而言，分類成 α 、 β 、 γ 以及 ω 4 種類，已知其具有多種生理活性 (Pestka, S., et.al., Ann. Rev. Biochem, (1987)56, 727-777; Langer, J. A., et. Al., Immunology Today (1988) 9, 393-400)。然而，無報告指出干擾素 α 以及干擾素 γ 對骨髓瘤細胞具有增加 HM1.24 抗原之表現量作用。

另一方面，干擾素調節因子 (interferon regulatory factor) (IRF) - 1 以及 2，被定性為 IFN- β 基因的轉錄調節因子。已知 IRF-1 以及 2 與一般的基因控制序列結合，而 IRE-1 作為轉錄活性化因子、IRF-2 作為轉錄抑制因子而具有拮抗作用。使 IRF-2 高度表現的 NIH3T3 細胞被認定其細胞飽和的上昇、甲基纖維膠中菌落的形成、裸鼠的造腫瘤性，故 IRF-2 作為癌基因其功能已明朗化。

另一方面，由最近的研究發展可知，IRF-2 顯示對具有

(3)

細胞週期調節作用之組織蛋白 H4 的表現為必須的。又，IRF-2 對於肌肉細胞而言，顯示可上昇維管束細胞附著分子 (vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1)) 之表現，且 VCAM-1 的活性化過程中有 IRF-2 的酸性區域 (182 至 218) 共作用的事已明朗化。由此可知，IRF-2 不僅作為轉錄因子亦可作為轉錄活性化因子而作用。

然而，已知 RF-2 蛋白質與 HM1.24 的抗原基因之啟動子 (HM1.24 啟動子) 結合，使該啟動子活性化。

【發明內容】

發明的揭示

現今被進行的骨髓瘤治療法，如上述亦未完整，期待可將骨髓瘤導向完全鬆解、延長患者存活期間之劃時代的治療劑或治療法。抗 HM1.24 抗體對骨髓瘤的治療，可作為特異性以及有效性的劃時代性治療劑，可望有效發揮抗 HM1.24 抗體作用的方法。

因此，本發明的目的對骨髓瘤細胞而言，經由增加 HM1.24 抗原之表現量，提供一種增強抗 HM1.24 抗體的骨髓瘤抑制作用之方法。

本發明者欲提供相關方法，探索可增加 HM1.24 抗原表現量之藥劑，其結果發現干擾素 α 以及干擾素 γ 具有期望的活性，便完成本發明。

因此本發明提供一種以干擾素 α 或干擾素 γ 作為有效成份，可增強具有序列號碼：2 所示胺基酸序列的蛋白質 (HM1.24 抗原) 於骨髓瘤細胞中表現之增強劑。

(4)

本發明的另一發明係提供一種骨髓瘤治療劑，其作為有效成份係含有

(1) 干擾素 α 或干擾素 γ ，以及

(2) 與具有序列號碼：2 所示胺基酸序列蛋白質作特異性結合，且具有細胞傷害活性之抗體所成者。

作為上述骨髓瘤的典型物質係為多發性骨髓瘤。

前述抗體中較佳為單株抗體、嵌合抗體或人類化抗體、較佳為具有細胞傷害活性者。

本發明者又對 HM1.24 啟動子的活性化劑作探索的結果，發現具有期待活性的 IRF-2 蛋白質，而完成本發明。

因此，本發明提供一種以 IRF-2 蛋白質作為有效成份，可增強具有序列號碼：2 所示胺基酸序列的蛋白質（HM1.24 抗原）於骨髓瘤細胞中表現之增強劑。

本發明另提供一種以 IRF-2 蛋白質作為有效成份之 HM1.24 啟動子活性化劑。

本發明更提供一種骨髓瘤的治療劑，其作為有效成份含有

(1) IRF-2 蛋白質、以及

(2) 與具有序列號碼：2 所示胺基酸序列蛋白質作特異性結合，且具有細胞傷害活性之抗體所成者。

前述抗體中較佳為單株抗體、嵌合抗體或人類化抗體、較佳為具有細胞傷害活性者。

本發明更提供一種含有以增強 IRF-2 蛋白質表現的化合物作為有效成份之 HM1.24 抗原於骨髓瘤細胞中之表現增強劑。

(5)

本發明更提供一種含有以增強 IRF-2 蛋白質表現的化合物作為有效成份之 HM1.24 啟動子的活性化劑。

本發明更提供一種可篩選 HM1.24 抗原的表現增強劑之方法。

本發明更提供一種可治療具有骨髓瘤病患之套組，其包含指示

(1) 與具有序列號碼：2 所示胺基酸序列之蛋白質作特異性的結合，且具有細胞傷害活性之抗體；以及

(2) 將上述抗體與可增強具有序列號碼：2 所示胺基酸序列之蛋白質表現的藥劑組合投與於患者之使用說明書所成。

前述骨髓瘤，例如為多發性骨髓瘤。前述抗體較佳為人類型抗 HM1.24 抗體。又，增強具有前述序列號碼：2 所示胺基酸的蛋白質之表現的藥劑，較佳為干擾素 α 或干擾素 γ 。

本發明更提供一種醫藥組成物，其含有與具有序列號碼：2 所示胺基酸的蛋白質作特異結合，且具有細胞傷害活性之抗體所成，係治療具有骨髓瘤的病患之醫藥組成物，其與具有序列號碼：2 所示胺基酸的蛋白質表現之增強藥劑組合而投與於患者者。

前述骨髓瘤，例如為多發性骨髓瘤。前述抗體，較佳為人類型化抗 HM1.24 抗體。可增強具有前述序列號碼：2 所示胺基酸序列之蛋白質表現之藥劑，較佳為干擾素 α 或干擾素 γ 。

發明的實施型態

干擾素 α 以及干擾素 γ

本發明所使用的干擾素 α 以及干擾素 γ ，不僅具有可增加 HM1.24 抗原的表現量之活性，更可使用其突變體。欲測定 HM1.24 抗原之表現量，如實施例所記載，可使用骨髓瘤細胞株或由骨髓瘤患者所採樣之骨髓瘤細胞，而由流動細胞儀檢測。作為突變體，例如為 1 或數個，或複數個胺基酸序列，因欠缺或取代或插入或附加等而突變之干擾素 α 或干擾素 γ 亦可。

作為經由欠缺或取代或插入將蛋白質導入的方法，可使用改變對應基因之部位特異性突變誘發法。

(Hashimoto-Gotoh, Gene (1995) 152, 271-275, Zoller, Methods Enzymol. (1983)100, 468-500, Kramer, Nucleic Acids Res. (1984)12, 9441-8456, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1985)82,488-492、 「新細胞工學實驗手冊東京大學醫科學研究所抗癌研究部編 (1993) p241-248」)。

又，可使用市面上利用 PCR 之「部位特異性突變誘發系統 (GIBCO-BRL) 或「快速改變指定位置突變套組 (Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit) 」 (史達拉達金公司製)。又，蛋白質中胺基酸的突變於自然界中可自然產生。又，如此突變被導入之蛋白質與原來的蛋白質具有相同之活性，此為 Mark, Proc, Natl. Acad. Sci. USA(1984) 81, 5662-5666 所示。

對於胺基酸的取代，以保存性質之胺基酸彼此間取代較為佳。例如疏水性胺基酸 (A , I , L , M , F , P , W , Y , V)

(7)

、親水性胺基酸(R, D, N, C, E, Q, G, H, K, S, T)、具有脂肪族支鏈之胺基酸(G, A, V, L, I, P)、含有羥基具有支鏈之胺基酸(S, T, Y)、含有硫磺原子具有支鏈之胺基酸(C, M)、含有羧基具有支鏈之胺基酸(D, N, E, Q)、含有鹼基具有支鏈之胺基酸(R, K, H)、含有芳香族具有支鏈之胺基酸(H, F, Y, W)彼此間取代較佳。

且，作為突變體，可使用干擾素 α 或干擾素 γ 之肽片段。特別具有與干擾素 α 或干擾素 γ 受容體的結合部位之肽片段為佳。較佳為100個以上、再佳為130個以上、更佳為150個以上、最佳為160個以上之連續胺基酸序列所構成之肽片段。

IRF-2 蛋白質

定性干擾素調節因子(interferon regulatory factor)

IRF-1 以及 2 作為 IFN- β 基因之轉錄調節因子。已知 IRF-1 以及 2 一般與相同的基因控制序列結合，IRE-1 作為轉錄活性化因子、而 IRF-2 作為轉錄抑制因子而彼此間具有拮抗作用。使 IRF-2 高表現之 NIH3T3 細胞，被認定具有上昇細胞飽和密度、甲基纖維膠中菌落之形成、裸鼠的造瘤性之作用、而 IRF-2 作為對癌基因可發揮其功能之事已明瞭。

另一方面，由最近的研究進展看來，IRF-2 係作用於細胞週期調節之組織蛋白 H4 的表現上為必須的。又，IRF-2 對肌肉細胞而言，顯示其提升維管束細胞附著分子(vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1))的表現，且明瞭 VCAM-1 的活性化為作用於 IRF-2 的酸性區域(自

182 至 218)。由此可知，IRF 不僅作為轉錄抑制因子，且已知有時可作為轉錄活性化因子而作用。

融合細胞

產生使用於本發明的抗體之融合細胞，基本上係為使用公知技術，如以下製得。即，表現 HM1.24 抗原蛋白質或 HM1.24 抗原之細胞作為致敏抗原使用，依據通常的免疫方法進行免疫，所得之免疫細胞以一般的細胞融合法與公知的母細胞，經一般的篩選方法，製得經篩選之產生單株抗體細胞。

具體而言，若要製得單株抗體可經由下述而得。例如，作為取得抗體的致敏抗原之 HM1.24 抗原表現細胞，可使用人類多發性骨髓瘤細胞株的 KPMM2（特開平 7-236475）或 KPC - 32（Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol.(1991)32, 1400）。又，可使用作為致敏抗原於抗 HM1.24 抗體具有序列號碼 1 所示胺基酸序列的蛋白質，或含有可辨識抗 HM1.24 抗體的抗原決定基之肽類或聚肽類。

且，作為致敏抗原而使用的質體 pRS38-pUC19，其由如具有序列號碼 1 所示胺基酸序列之蛋白質的 cDNA，插入 pUC19 載體的 XbaI 切斷部位之間調製出。含有此質體 pRS38-pUC19 的大腸菌（E.coli）於平成 5 年（1993 年）10 月 5 日於工業技術院生命工學工業技術研究所，將大腸菌 DH5 α （pRS38-pUC19）以布達佩斯條約為基準作寄存號碼為 FERM BP-4434 之國際寄存（參照特開平 7-196694）。使用含於此質體 pRS38-pUC19 的 cDNA 片段，

經由基因工程的方法，製作含可辨識抗 HM1.24 抗體之抗原決定基之肽類或聚肽類。

作為經致敏抗原而免疫之哺乳動物，雖無特別限制，但以考慮到與使用於細胞融合的母細胞適合性而選擇為佳，一般而言可使用嚙齒動物、例如大鼠、小白鼠、田鼠等。

欲將致敏抗原使動物免疫，可依照公知的方法進行。例如，作為一般方法，致敏抗原可注射於哺乳動物之腹腔內或皮下。

具體而言，將致敏抗原以 PBS (Phosphate-Buffered Saline) 或生理食鹽水等作適當量的稀釋、懸濁者與所望的一般助劑，例如胡氏完全助劑 (Freund's complete adjuvant) 以適量混合，經乳化後每 4 至 21 天分數次投與於哺乳動物為佳。又，致敏抗原進行免疫時，可使用適當的載體。

如此經過免疫，確認血清中目標抗體水平已上昇後，由哺乳動物取出免疫細胞，作為細胞融合用。使用於細胞融合的較佳免疫細胞，特別可舉出脾細胞。

作為與前述免疫細胞融合之其他母細胞的哺乳動物之骨髓瘤細胞，已公知的種種細胞株，例如為 P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550), P3X63Ag8U. 1 (Current Topics in Microbiology and IMMUNOLOGY (1978) 81:1-7), NS-1 (Kohler. G. And Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519), MPC-11 (Margulies. D.H. et al., Cell (1976) 8: 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270), F0 (de St. Groth, S. F. Et al., J. Immunol. Methods (1980) 35:1-21), S194 (Towbridge, I. S. J.

Exp. Med. (1978) 148: 313-323), R210(Galfre, G. et al., Nature(1979) 277: 131-133)等適合使用。

前述免疫細胞與骨髓瘤細胞之細胞融合基本上為公知的方法，例如秘魯史丁等的方法（Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol.(1981)73:3-46）等為準進行。

較具體而言，前述細胞融合例如為，細胞融合促進劑的存在下，以一般的營養培養液中實施。作為融合促進劑例如可使用聚乙二醇（PEG）、仙台病毒（HVJ）等，而且欲提高融合效率而可添加使用二甲基亞碸等的補助劑。

免疫細胞與骨髓瘤細胞的使用比例，例如對骨髓瘤細胞而言為 1 至 10 倍為佳。使用於前述細胞融合之培養液，例如可使用對前述骨髓瘤細胞株增殖較適合之 RPMI1640 培養液、MEM 培養液、其他使用於此種之細胞培養液的一般培養液，且可與牛胚胎血清（FCS）等血清補充液併用。

細胞融合係由，前述免疫細胞與骨髓瘤細胞以所定量於前述培養液中充分混合，添加預先加溫 37℃ 程度之 PEG 溶液、例如平均分子量為 1000 至 6000 的程度之 PEG 溶液，一般以 30 至 60%（w/v）的濃度添加，經混合而形成目標之融合細胞（hybridoma）。繼續逐次添加適當的培養液，經離心將上清液除去，重複操作可除去使對融合細胞的生成不利之細胞融合劑等。

當該融合細胞係由，一般選擇出之培養液，例如由 HAT 培養液（含有次黃嘌呤、胺基嘌呤以及胸腺嘧啶的培養液）培養而選擇出。當該 HAT 培養液中的培養，其中目的的融合細胞以外之細胞（非融合細胞）需花非常長的時間才可死滅

，通常需繼續至數日至數週。接者，實施極限稀釋法，進行產生目的抗體之融合瘤之篩選以及單一性篩選。

又，人類以外的動物以抗原作免疫得到上述融合瘤，其他則將人類淋巴於體外進行 HM1.24 抗原或 HM1.24 抗原表現細胞之致敏，致敏淋巴球與人類骨髓瘤細胞，例如與 U266 融合，得到具有與 HM1.24 抗原或 HM1.24 抗原表現細胞結合活性之目標人類抗體（參照特公平 1-59878）。且，對具有所有人類抗體基因的取代之基因轉移動物，投與作為抗原的 HM1.24 抗原或 HM1.24 抗原表現細胞，可依據前述的方法取得所望的人類抗體（參照國際專利申請公開號碼 W093 / 12227，W092 / 03918，W094 / 02602，W094 / 25585，W096 / 34096，W096 / 33735）。

如此所製得產生單株抗體之融合細胞，可以一般的培養液中作傳代培養，又，可於液態氮中長期保存。

由該融合細胞取得單株抗體的方法，可採用依據該融合細胞的一般方法培養後，取得其培養上清液的方法，或將融合細胞投與於適當的哺乳類動物上使其增殖，從其腹水中獲得之方法等。前述方法可得到高純度的抗體，另一方面後者的方法可大量產生抗體。

單株抗體

具體而言，產生抗 HM1.24 抗體的融合細胞之製作，可依照 Goto,T.們的方法（Blood（1994）84.1922-1930）進行。於工業技術學院生命工學工業技術研究所（茨城縣筑波市東 1 丁目 1-3 號），平成 7 年 4 月 27 日以 FERM BP-

5233，依據布達佩斯條約將國際寄存的產生抗 HM1.24 抗體之融合細胞，注入於 BALB/c 老鼠（日本 Clear 製）腹腔中獲得腹水，由此腹水中純化抗 HM1.24 抗體的方法，或將原融合細胞於適當的培養基，例如可進行以含有 10% 牛胚胎血清、5% BM-CondimedH1（Boehringer Mannheim 製）的 RPMI1640 培養基、融合細胞 SFM 培養基（GIBCO-BRL 製）、PFHM-II 培養基（GIBCO-BRL 製）等作培養，由此培養上清液中純化抗 HM1.24 抗體的方法。

重組型抗體

本發明中，作為單株抗體，可使用融合細胞中篩選出抗體基因後，殖入適當的載體中，將此導入宿主後，使用基因重組技術而產生之重組型抗體。（例如參照 Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990）。

具體而言，由產生作為目的抗體的融合細胞，可單離編碼抗體可變（V）區之 mRNA。mRNA 的單離可由公知方法，例如可使用脈超離心法（Chirgwin, J. M., Biochemistry (1979) 18, 5294-5299）、AGPC 法（Chmczynski, P., (1987)162, 156-159）等製作出 mRNA、或使用 mRNA 純化套組（Kit）（法馬西亞製）。又可使用 QuickPrep mRNA 純化 Kit（法馬西亞製）直接製作出 mRNA。

由所得之 mRNA 使用逆轉錄酵素合成抗體 V 區之 cDNA。此 cDNA 的合成，可使用 AMV 逆轉化酶第 1 股 cDNA 合

成套組 (Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit) 等進行。又，cDNA 的合成以及增幅可使用 5' - Ampli FINDER RACE Kit (克洛替克製) 以及使用 PCR 的 5' - RACE 法 (Frohman, M. A., Proc. Natl. Acad. Sci. USA(1988)85, 8998-9002; Belyavsky, a., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932)。由所得之 PCR 產物可純化目的之 DNA 片段，與載體 DNA 連結。且，由此做成的重組載體，導入大腸菌等選擇其菌落調製出所望的重組載體。作為目的之 DNA 之鹼基序列由例如雙脫氧法 (dideoxy 法) 之公知的方法確認。

僅得到編碼作為目的抗體的 V 區之 DNA，將此與編碼所望的抗體恆定區 (C 區) 之 DNA 連結，將此殖入表現載體中。或將編碼抗體 V 區的 DNA 值入含有抗體 C 區的 DNA 之表現載體。製造本發明所使用的抗體係將如後述抗體基因欲其可於表現控制區，例如為增強子，引子的控制區進行表現而殖入表現載體中。再經由此表現載體使宿主細胞進行轉形，可使抗體表現。再藉由此表現載體使宿主細胞進行轉形，而可表現抗體。

改變抗體

本發明中，對於人類作為欲降低異種抗原性等目的，人工改變的基因重組型抗體，例如可使用嵌合 (Chimeric) 抗體、人類型化 (Humanized) 抗體等。這些改變抗體，可使用已知的方法製造。

嵌合抗體係，如上述編碼所得抗體 V 區之 DNA 與編碼

人類抗體 C 區之 DNA 連結，將此殖入表現載體導入宿主而產生此抗體，（參考歐洲專利申請公開號碼 EP 125023、國際專利申請公開號碼 W096/02576）。使用此既知的方法，可得到本發明有用的嵌合抗體。

例如，具我含有嵌合抗 HM1.24 體的 L 鍊以及 H 鍊質體之大腸菌，作為各個大腸菌 DH5 α (pUC19-1.24L-g κ) 以及大腸菌 DH5 α (pUC19-1.24H-g γ 1)，於工業技術學院生命工學工業技術研究所（茨城縣筑波市東 1 丁目 1-3 號），平成 8 年 8 月 29 日個別以 FERM BP-5646 以及 FERM BP-5644，依據布達佩斯條約將國際作寄存（參照特願平 8-264756）。

人類型化抗體又稱為重建 (reshaped) 人類抗體，將人類以外的哺乳動物、例如老鼠抗體之互補性決定區 (CDR; complementarity determining region) 移植至人類抗體之互補性決定區者，其一般性的基因重組方法已為公知（參照歐洲專利申請公開號碼 EO 125023、國際專利申請公開號碼 WO 96/02576）。

具體而言，設計如老鼠抗體的 CDR 與人類抗體的架構區 (framework-region; FR) 連結之 DNA 序列，其由製成末端部具有重疊部分的數個寡核苷酸之 PCR 法合成。所得之 DNA 與編碼人類抗體 C 區之 DNA 連結，再殖入表現載體中，將此導入宿主使其產生抗體（參考歐洲專利申請公開號碼 EP 239400、國際專利申請公開號碼 WO 96/02576）。

介者 CDR 所連結的人類抗體之 FR，選自可形成優良互補性決定區之抗原結合部位。因應必須，欲使重建人類抗體

的互補性決定區形成適當的抗原結合部位，可改變抗體可變區之FR區的胺基酸（Sato, et al., Cancer Res.(1993)53, 851-856）。

例如，具有含人類型化抗 HM1.24 抗體 L 鍊以及 H 鍊的質體之大腸菌，作為各個大腸菌 DH5 α （pUC19-RVLa-AHM-g κ ）以及大腸菌 DH5 α （pUC19-RVHr-AHM-g γ 1），於工業技術學院生命工學工業技術研究所（茨城縣筑波市東 1 丁目 1-3 號），平成 8 年 8 月 29 日個別以 FERM BP-5645 以及 FERM BP-5643，依據布達佩斯條約將國際作寄存（參照特願平 8-264756）。

嵌合抗體、人類型化抗體中，作為使用人類抗體 C 區呈現細胞傷害活性之人類抗體 C 區，可使用人類 C γ ，例如 C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4。其中，特別以具有 C γ 1、C γ 3 的抗體其顯示強力的細胞傷害活性，即具有 ADCC 活性、CDC 活性，適用於本發明中。

嵌合抗體係由，來自人類以外的哺乳動物抗體之可變區與來自人類抗體之 C 區所成，人類型化抗體係由，來自人類以外的哺乳動物抗體之互補性決定區，與來自人類抗體之 FR 區以及 C 區所成，欲降低人類體內之抗原性，其作為本發明的治療劑之有效成份上係為有用的。

使用於本發明的人類型化抗體之較佳具體例子，可舉出人類型化抗 HM1.24 抗體（參照特願平 8-264756）。

表現以及生產

如前述所構築的抗體基因，可由公知方法使其表現、獲

得。哺乳動物的情況，可藉由常用的有用啓動子、使表現抗體基因、3'-側下游與聚 A 信號作功能性地結合之 DNA 或含有此之載體等而表現。例如作為啓動子／增強子，可舉出人類巨細胞病毒早期啓動子／增強子。

又，作為其他使用於本發明的抗體表現中可使用的啓動子／增強子，可使用逆轉錄病毒、多瘤病毒、腺病毒、猴病毒 40 (SV 40) 等病毒啓動子／增強子或人類人類伸長因子 1 α (HEF1 α) 等之來自哺乳類細胞的啓動子／增強子。

例如，使用 SV40 啓動子／增強子時，可依據姆來剛們的方法 (Nature(1979) 277, 108)、或 HEF1 α 啓動子／或增強子時、或水島們的方法 (Nucleic Acid Res. (1990) 18, 5322) 而容易實施。

大腸桿菌的情況，可與常被用的有用啓動子、欲抗體分泌的通訊序列、被表現的抗體基因作機能性的結合使其表現。例如作為啓動子，可舉出 lacZ 啓動子、araB 啓動子等。使用 lacZ 啓動子時，可依據 Ward 們的方法 (Nature (1998) 341, 544-546; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427)、使用 araB 啓動子時，可依據 Better 們的方法 (Science (1988) 240, 1041-1043)。

作為欲抗體分泌的通訊序列，於大腸菌周質產生時，可使用 pelB 通訊序列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379)。與於周質產生的抗體分離後，將抗體的構造作適切的重摺(refold)而是使用 (例如，參照 WO 96/30394)。

作為複製的源點，可使用來自 SV40、多瘤病毒、腺病毒、牛乳頭狀瘤病毒 (BPV) 等者，且欲於宿主細胞系中增

幅基因複製數，表現載體作為選擇性標記基因，可含有胺糖苷轉化酶（APH）基因、胸苷酶（TK）基因、大腸菌黃嘌呤鳥嘌呤磷酸核糖轉化酶（Ecogpt）基因、二氫葉酸還原酶（dhfr）基因等。

欲製造本發明所使用的抗體，可使用任意的生產系。欲製造抗體的生產系可係為體內以及體外的生產系。作為體外生產系，可舉出使用真核細胞的生產系或使用原核細胞的生產系。

使用真核細胞時，可使用動物細胞、植物細胞、真菌細胞的生產系。作為動物細胞，有（1）哺乳動物、例如 CHO、COS、骨髓瘤、BHK（baby hamster kidney）、HeLa, Vero、（2）兩生類細胞、例如非洲爪蛙卵細胞、或（3）昆蟲細胞、例如 sf9, sf21, Tn5 等為已知。作為植物細胞，有煙草屬（Nicotiana），例如來自煙草（*Nicotiana tabacum*）的細胞，將此進行癒傷組織培養即可。作為真菌細菌有酵母菌，例如 *Saccharomyces* 屬、例如酒酵母（*Saccharomyces cerevisiae*）、絲狀菌、例如麴霉屬（*Aspergillus*），例如黑麴霉（*Aspergillus niger*）等。

使用原核細胞時，可使用細菌細胞的生產系。作為細菌細胞，已知有大腸菌（*E. coli*）、枯草芽。

這些細胞中，作為目標的抗體基因經由轉形而導入，經轉形的細胞於體外培養而得到抗體。培養方法可依照公知的方法進行。例如，作為培養液，可使用 DMEM、MEM、RPMI1640、IMDM。亦可與牛胚胎血清（FCS）等血清補充液併用。又，將抗體基因導入之細胞移植至動物的腹腔等，

亦可於體外產生抗體。

另一方面，作為體外產生系，可舉出使用動物生產系或使用植物生產系。使用動物時，可使用哺乳類動物、昆蟲生產系。

作為哺乳動物，可使用羊、豬、綿羊、老鼠、牛等（Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Application, 1993）。又，作為昆蟲，可使用蠶。

使用植物時，可使用煙草等。

將這些動物或植物導入抗體基因，使動物或植物產生的體內產生抗體後回收。例如，將抗體基因於編碼如羊 β 酪蛋白般的乳汁中產生固有蛋白質之基因途中插入，而調製出融合基因。將含有抗體基因所插入的融合基因之DNA片段注入羊的胚胎中，將此胚胎導入母羊中。接受胚胎的母羊所生出的基因轉移小羊或其後代所產生的乳汁中可得到具有抗體的乳汁。欲增加含有基因轉移動物中所生產的預期抗體之乳汁量，可使用適當的賀爾蒙於基因轉移動物上。（Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994)12, 699-702）。

又，使用於蠶時，插入目標抗體基因的空泡病毒使蠶感染，由此蠶的體液中得到期待的抗體（Susumu, M. et al., Nature (1985) 315, 592-594）。且，使用煙草時，將目標抗體基因插入例如pMON 530的植物表現載體中，將此載體導入如土壤桿菌（*Agrobacterium tumefaciens*）的細菌中。將此細菌感染至例如 *Nicotiana tabacum* 的煙草中，藉由此煙草的葉子得到期待的抗體（Julian, K. -C. Ma et al, Eur. J. Immunol. (1994)24, 131-138）。

如上述於體外或體內的生產系產生抗體時，可將編碼抗體重鍊（H 鍊）或輕鍊（L 鍊）之 DNA，分別殖入表現載體中將宿主同時進行轉形，或將編碼抗體重鍊（H 鍊）或輕鍊（L 鍊）之 DNA，殖入單一表現載體中，使宿主進行轉形（參照國際專利申請公開號碼 WO94-11523）。

如上述所得之抗體，可與聚乙二醇（PEG）等的各種分子結合而作為抗體修飾物使用。本發明的專利申請範圍中的「抗體」則包含這些抗體修飾物。欲獲得如此抗體修飾物，可將所得之抗體施行化學修飾而得。這些方法已於此領域中獲得證實。

抗體的分離、純化

如前述所產生、表現的抗體，可於細胞內外，由宿主分離後純化至均一性。本發明所使用的抗體之分離、純化可使用親和性色譜法進行。使用於親和性色譜法的柱子，例如可舉出蛋白質 A 柱、蛋白質 G 柱。作為使用蛋白質 A 柱的載體，例如可舉出 Hyper D, POROS, Sepharose F. F. 等。

其他，僅可使用一般使用於蛋白質的分離、純化方法即可，無任何限制。例如上述親和性色譜法以外的色譜法、過濾法、超過濾法、透析等可適宜地選擇，組合使用，僅可將本發明所使用的抗體進行分離、純化即可。作為色譜法，例如可舉出離子交換色譜法、疏水性色譜法、膠體過濾等方法。

抗體的濃度測定

上述方法所得之抗體濃度測定可進行吸光度之測定或 ELISA 等。即，以吸光度測定而言，本發明所使用的抗體或含有抗體的樣品以 PBS (-) 作適當的稀釋後，以 280nm 的吸光度測定，1mg/ml 作為 1.35OD 而算出。又，以 ELISA 而言，可如下述測定。即，以 0.1 M 碳酸氫緩衝液 (pH9.6) 稀釋至 1 μ g/ml 的羊抗人類 IgG (BIO SOURCE 製) 之 100 μ l 加入 96 穴培養皿 (Nunc 製) 中，4℃ 下恆溫培養 1 晚，將抗體固著化。

遮蔽步驟後，適當稀釋至本發明所使用的抗體或含有抗體的樣品，或作為標準品添加 100 μ l 的人類 IgG (CAPPEL 製)，於室溫下進行 1 小時恆溫培養。洗淨後，加入稀釋至 5000 倍的 100 μ l 鹼性磷酸酶標識抗人類 IgG (BIO SOURCE 製)，於是溫下恆溫培養 1 小時。洗淨後，加入基質溶液培養後，使用 MICROPLATE READER Model 3550 (Bio-Rad 製) 以 405nm 的吸光度測定，算出目的抗體的濃度。

FCM 解析

骨髓瘤細胞與本發明所使用的抗體的反應性，可以 FCM (流動細胞儀) 解析進行。作為細胞，使用已建立的細胞株、來自骨髓瘤的 RPMI 8226 (ATCC CCL 155)、同 U266 (ATCC TIB 196)、同 K P C - 32、可使用來自漿細胞瘤 A R H - 77 (ATCC CRL 1621) 等。

上述細胞以 PBS (-) 洗淨後，加入 100 μ g 的以 FACS 緩衝液 (2% 牛胚胎血清、含 0.05% 迭氮化的 PBS (-)) 稀釋至 25 μ g/ml 之抗體或對照組抗體，冰浴下 30 分鐘恆

溫培養。經 FACS 緩衝液洗淨後，加入 $25 \mu\text{g/ml}$ 的 $100 \mu\text{l}$ 之 FITC 標識羊抗老鼠抗體 (GAM, Becton Dickinson 製)，冰浴下 30 分鐘恆溫培養。以 FACS 緩衝液洗淨後，懸濁於 $600 \mu\text{l}$ 或 1ml 的 FACS 緩衝液中，以 FACScan (伯頓迪克生製) 測定各細胞的螢光強度。

篩選方法

欲篩選 HM1.24 抗原的表現增強劑，例如無刺激的狀態下是否表現 HM1.24 抗原，或使用少量表現細胞以 FCM 解析測定。例如，於實施例所記載的細胞與檢驗物質進行 1 至 2 天的恆溫培養，再作為一次抗體以老鼠抗人類 HM1.24 抗體染色。細胞經洗淨後，再作為 2 次抗體以 FITC 標識老鼠 IgG 抗體染色。最後將細胞洗淨後以流動細胞儀測定細胞的 FITC 螢光強度。

又可非以前述的間接法染色，細胞以高濃度的免疫球蛋白處理，經 Fc 受體遮蔽後使用 FITC 標識的抗人類 HM1.24 抗體以直接法染色再做 FCM 分析。

又，可使用 HM1.24 啟動子序列作訊息基因測定法篩選 HM1.24 抗原的表現增強劑。作為訊息基因，可使用螢光酵素。將 HM1.24 序列構築於含於訊息基因上游的質體，再經細胞轉形後，所得之細胞與檢驗物質作 1 至 2 天的培養，經回收的細胞因以 FCM 解析，而可篩選增強 HM1.24 抗原的表現之藥劑。

細胞傷害活性

ADCC 活性的測定

本發明所使用的抗體，作為細胞傷害活性，例如具有 ADCC 活性之抗體。

本發明中對骨髓細胞的 ADCC 活性，可如以下測定。首先，人類末梢血或骨髓的比重離心法將單核球分離，調製出效應細胞（Effector cell：E）。

又，作為標的細胞（Target cell：T），RPMI 8226（ATCC CCL 155）、U266（ATCC TIB 196）、KPMM2、KPC-32、ARH-77（ATCC CRL 1621）等以 ^{51}Cr 標識，調製出目標細胞。再將標識的標的細胞加入測定 ADCC 活性的抗體，經恆溫培養後，加入對標的細胞適當比例之效應細胞進行恆溫培養。

經恆溫培養後取出上清液，以 γ 射線活性測定儀測定。此時使用於最大游離放射能測定可使用 1% NP-40。細胞傷害活性（%）可由 $(A - C) / (B - C) \times 100$ 計算出。且，A 為抗體存在下游離的放射活性（cpm）、B 為因 NP-40 而游離的放射活性（cpm）、C 為不含抗體僅為培養液的游離之放射活性（cpm）。

細胞傷害活性之增強

欲發揮如 ADCC 活性一般的細胞傷害活性，對於人類抗體固定區（C 區）的 $C\gamma$ ，特別使用 $C\gamma 1$ 、 $C\gamma 3$ 為佳。且附加、改變、修飾一部份的抗體 C 區的胺基酸，可誘導強力的 ADCC 活性、或 CDC 活性。

例如，可舉出胺基酸取代的如 IgG 之 IgM 聚合化、（

Smith, R. I. F. & Morrison, S. L. BIO/TECHNOLOGY (1994) 12, 683-688)、胺基酸附加的如 IgG 之 IgM 聚合化、(Smith, R. I. F. et al., J. Immunology(1995) 154, 2226-2236)、編碼 L 鍊的基因之直列連結的表現(Shuford, W. et al., Science(1991)252, 724-727)、胺基酸取代的 IgG 之二量體化(Caron, P. C. et al., J. Exp. Med.(1992) 176, 1191-1195, Shopes, B., J. Immunology (1992) 148, 2918-2922)、化學修飾的 IgG 之二量體化(Wolff, E. A. et al., Cancer Res. (1993) 53, 2560-2565)、以及抗體蝶銜區的胺基酸改變之效應子功能導入(Norderhaug, L. et al., Eur. J. Immunol. (1991) 21,2379-2384)。

這些利用引子 (primer) 的寡聚物部位特異性突變導入法，附加利用限制酵素切斷部位之鹼基序列，以共價鍵使用化學修試劑達成。

患者的治療

本發明的型態之一，係關於經由將增強 HM1.24 抗原表現量之藥劑與抗 HM1.24 抗體投與於患者，治療骨髓瘤、較佳為多發性骨髓瘤之方法。欲增強 HM1.24 抗原的表現量之藥劑，較佳為干擾素 α 或干擾素 γ 。干擾素與抗 HM1.24 抗體，可同時投與，或個別投與。後者的情況，首先投與干擾素，於 96 小時內投與 HM1.24 抗體較佳。干擾素的投與與抗 HM1.24 抗體的投與之間隔，依干擾素的投與，僅可增強 HM1.24 抗原的表現量即可並無特別限制，較佳為 96 小時之內，更佳為 72 小時之內，特佳為 48 小時之內。因應患者的

臨床反應，干擾素與抗 HM1.24 抗體可複數次地投與、交換投與，此皆為本發明的範圍內。投與的途徑，血循環中直接投與為佳，靜脈內投與或動脈內投與亦佳。亦可持續投與或靜脈內以點滴投與。

本發明的其他型態，係關於含有干擾素 α 或干擾素 γ 與抗 HM1.24 抗體之骨髓瘤治療劑。本發明的治療劑可同時包含，醫藥學上許可的載色劑、例如生理食鹽水或 5% 的葡聚糖與一般的安定劑或賦形劑。

本發明的其他型態係為，提供一種欲治療具有骨髓瘤的患者之套組，含有抗 HM1.24 抗體作為有效成份之醫藥組成物，與含有記載有關干擾素 α 或干擾素 γ 之並用治療法的說明書所成之套組。

本發明的其他型態係為，提供一種醫藥組成物，其含有抗 HM1.24 抗體作為有效成份，其治療具有骨髓瘤的患者之醫藥組成物，並用干擾素 α 或干擾素 γ 者。

【實施方式】

實施例

實施例 1. 干擾素 α 對骨髓瘤細胞的 HM1.24 抗原表現量之增強

人類骨髓瘤細胞株 U266 (ATCC TIB 196) 以及來自多發性骨髓瘤患者骨髓之骨髓瘤細胞，使用含有 10% 牛胚胎血清 (Whittaker Bioproducts, Inc, Walkersville, MD, USA) 的 PRMI 1640 培養基 (Sigma, St Louis, MO, USA) 於 5% 碳酸氣體培養皿中，於 37°C 下培養。產生老鼠抗 1.24 抗體

的融合細胞，於工業技術院生命工學工業技術研究所（日本國茨城縣筑波市東 1-1-3）以寄存號碼 FERM BP-5233（寄存日 1995 年 4 月 27 日）寄存。

骨髓瘤細胞（ 1×10^5 / ml）於 1000U / ml 的天然型干擾素 α （大塚製藥、東京）存在下或非存在下培養 48 小時，以流動細胞儀測定 HM1.24 抗原（將此編碼的鹼基序列以序列號碼：1 表示）的變化。細胞以添加 0.1% 牛血清白蛋白（Sigma, St Louis, MO, USA）與 0.02% 的迭氮化鈉的磷酸緩衝液（Gibco BRL, Grand Island, NY, USA）洗淨後，於加入人類免疫白蛋白（3mg/ml、綠十字、大阪）的 PBS（100 μ l）中浮游，於 4℃ 下反應 15 分鐘。

其後，加入 2 μ l 的 FITC-人類 IgG1（1mg/ml）或 FITC-抗 HM1.24 抗體（1mg/ml）、於 4℃ 下反應 60 分鐘使其染色。使用患者的骨髓瘤細胞的情況，欲固定骨髓瘤細胞加入 20 μ l 的 PE-anti-CD38（Becton Dickinson, San Jose, CA, USA），進行雙重染色。染色後，將細胞於 PBC 中洗淨 2 次，以含有 1% 仲甲醛（和光純藥，大阪）的 PBS 中保存。其後，使用流動細胞儀（EPICS XL, Coulter, Hialeah, FL, USA），解析 HM1.24 抗原的表現。

其結果，骨髓瘤細胞株 U266（圖 1）以及患者骨髓瘤細胞（圖 2）於無刺激下狀態表現 HM1.24 抗原，而經干擾素 α 的刺激，可更增加 HM1.24 抗原的表現量。

干擾素 α 可更增強骨髓瘤細胞的 HM1.24 抗原的表現，增加與骨髓瘤細胞結合的抗 HM1.24 抗體的數目。以抗 HM1.24 抗體治療抗腫瘤的效果，與所結合的抗體數成比例

的事看來，對於骨髓瘤患者，投與干擾素 α 後進行抗 HM1.24 抗體的治療，可增強抗體的治療效果，提高有效性的治療法。

實施例 2.以通訊基因解析方法對 HM1.24 抗原的表現功能作解析。

欲調查抗原的表現之誘導是否有被 HM1.24 啟動區所調節，而進行啟動區中的通訊基因的解析。

HM1.24 啟動區的基因（序列號碼：3）由 PCR 純系化而獲得。使用人類末梢血單核細胞的 DNAzol reagent（GIBCO），調製出基因組 DNA。所得之基因組 DNA 作為鑄模，使用引子 HM2k（aaaggtaccagctgtctttctgtctgtcc）（序列號碼：4）、以及 BST2B（atagtcatacgaagtagatgccatccag）（序列號碼：5），使用 TaKaRa Taq（寶酒造，大津）以 Thermal Cycler 480(Perkin Elmer, CA, USA) 進行 PCR（94℃ 1min, 55℃ 1min, 72℃ 1min, 30cycles）。

得到約 2kb 的片段以限制酶 KpnI 以及 BglII（寶酒造）處理，以訊息基因質體 pGL3-basic(Promega,WI, USA)的 KpnI-BglII 位置以 DNA 連結套組（DNA ligation Kit ver.II，寶酒造）純系化，將可勝任（competent）的大腸菌 JM109（日本基因公司）進行轉形。轉形之後的大腸菌以含有 100 μ g/ml 的胺苄青黴素之 LB 培養基以 37℃ 下培養，以 QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 調製出質體。

所得之質體 HM-2k/GL3 以限制酶 KpnI 以及 XhoI 處理

，kilo-sequence 使用 deletion kit (缺失套組，寶酒造) 製成缺失純系 (deletion clone)，得到含有自轉錄起始點至上游 - 493bp 為止的質體 HM-493/GL3。又，HM-2k/GL3 以限制酶 KpnI 以及 AflIII 處理，如上述的方法製成缺失純系，得到含有自轉錄起始點至上游 - 151bp 或 - 77bp 為止，分別為 HM-151 以及 HM-77/GL3。

對細胞的質體導入可使用 Polyethylenimine-Transferrinfection Kit(Tf PEI-Kit)(Bender MedSystems, Vienna, Austria)、蟲螢光素酶測定法係使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)。將細胞株以含有 50 μ M Defferrioxamine、10% FBS 的 RPMI-1640 的培養基進行 1 晚的培養。欲將導入的質體與 Tf-PEI 成複合體，製成終濃度為 20 μ g/ml 的訊息基因質體與 0.4 μ g/ml 的 pRL-SV40、1 μ g/ml 的 Tf-PEI 試藥之混合液，於室溫下恆溫培養 20 分鐘。加入 Tf-PEI·質體混合液 3 倍容量之 5×10^5 細胞/ml 細胞，經 4 小時 37°C 的恆溫培養後以培養液洗淨，調製出每 1 單位 (well) 為 2×10^5 細胞/ml 濃度之 100 μ l 於 96 單位 (well) 平底培養皿中培養。

添加 IFN- α 至最終濃度為 0、10、100 或 1000U/ml，於 37°C 下 2 天培養。細胞以 PBS (-) 洗淨後，以 20 μ l 的被動溶解緩衝液 (Passive Lysis Buffer) 溶解，以 6 μ l 的量使用於 C96 White Polysorp Fluoronunc (Nunc)。於 Luminoskan (LabSystems) 30 μ l 的基質液，測定時間為 10 秒鐘分別測出 Firefly 以及 Renila 的發光強度。測定值經 Firefly/Renila 修正後，對照組 (medium，培養基) 作為 1 求得

相對活性。

其結果，上游 2kbp 以及 493bp 同時具有 IFN α 濃度依賴性，而上昇訊息基因的蟲螢光素酶活性。確認訊息基因區的轉錄活性上昇會引起抗原的表現。（圖 3）。

且，使用轉錄起始點上游 151bp 或 77bp 的訊息質體時的結果，上游 151bp 的訊息質體顯示因 IFN α 刺激而上昇蟲螢光素酶活性。另一方面，上游 77bp 的訊息質體無顯示因 IFN α 刺激而有活性變化的現象（圖 4）。由自 77 至 151bp 區中存在著對 GAS element，ISRE 的高度序列相同性，與對 IFN α 刺激反應之活性化轉錄調節因子，顯示 IRF 族系的轉錄調節因子與活性有關連。

實施例 3.干擾素 γ 對骨髓瘤細胞的 HM1.24 抗原表現量之增強

如實施例 1 所記載的方法，使用 1000U/ml 的天然型干擾素 γ （R&D System 公司）進行解析。其結果，對骨髓細胞株 U266（圖 5）以及患者骨髓細胞（圖 6），與干擾素 α 相同，觀察致 HM1.24 抗原表現量的增加。

實施例 4.IRF-2 與 HM1.24 啟動區的結合

欲定性與 HM1.24 啟動區結合的轉錄因子，以 EMSA（Electrophoresis Mobility Shift Assay）作為 HM1.24 啟動區的探查物，如下述進行，定性 IRF-2 作為結合因子。

（1）核萃取物的調製

將骨髓瘤細胞 U266-B1 (ATCC-TIB 196) 以含有 10% 的 FBS (HyClone) 之 RPMI-1640 培養基 (GIBCO-BRL) 於 37°C 下、5% 的碳酸氣體恆溫箱中進行培養。欲以干擾素 α (IFN- α) (Pepro Tech EC) 進行對細胞的刺激，於培養基中添加 IFN- α 至最終濃度為 1000U/ml，添加後 30 分鐘、2 小時、4 小時以及 8 小時後回收細胞。細胞懸濁於冷 PBS (-) 中，以 1000rpm 離心將上清液除去，再懸濁於 10mM Tris, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂ 溶液中。

於冰浴中靜置 5 分鐘後再次離心，除去上清液。將細胞懸浮於 10mM Tris, 10mM NaCl, 6mM MgCl₂, 1mM DTT, 0.4mM PMSF, 1mM Na₃VO₄ 溶液中。使用玻璃製的均質機使細胞於冰浴中均質，經 6000g, 3 分鐘的離心，去除上清液。將細胞懸濁於萃取緩衝液中 (20% 的甘油、20mM HEPES, 420mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 0.2mM EDTA, 0.2mM PMSF, 1mM DTT, 0.1mM Na₃VO₄, 2mg/ml 的抑肽酶、5mg/ml 的亮肽素) 中，冰浴中靜置 20 分鐘後經 12000g, 10 分鐘離心，回收上清液。

(2) 標識探查物 (prob) 的調製

作為探查物，於 HM1.24 啟動區具有 GAS (IFN- γ 活性化部位：GAS 共有序列為 ttncnnnaa (序列號碼：8))、ISRE (IFN- α 刺激回應因子：ISRE 共有序列為 ngaaanngaaact (序列號碼：9)) 與同系性的序列 (製作含有 ttcccagaa (序列號碼：10) 以及 ggaaactgaaact (序列號碼：11) 的 ISRE2。即寡 DNA DSRE-F2 (

(30)

aatttctgggaaactgaaactgaaaacct (序列號碼 : 12)) 以及 ISRE - R 2 (aattaggttttcagtttcagtttcccaga (序列號碼 : 13)) 混合 , 使其連接製成雙股的 DNA 探查物 ISRE2 。

又 , 將寡 DNA adp - 1 (catggactctacttcgtatgactattgcagagtgcc (序列號碼 : 14)) 以及 adp - 2 (catgggcactctgcaatagtcatacgaagtagatgc (序列號碼 : 15)) 混合 , 連接後作為 unrelated 探查物 adp。探查物使用 Band Shift Kit (Amersham Pharmacia Biotech) 標識 , 依據其標準方法進行。即將 50ng 的依據上述做成的雙股 DNA 以含有 [α - 32 P] dATP (20 μ Ci) (Amersham Pharmacia Biotech) 的反應液中與 Klenow 片段的聚合酶進行 37°C , 1 小時的反應。反應終了後將溶液稀釋至 2 倍後加入 Nick Spin Column (Amersham Pharmacia Biotech) 中 , 進行 1600rpm , 4 分鐘的離心而回收的溶液作為標識探查物。

(3) 經 IFN - α 刺激所產生的結合因子之經時性變化

依照 Band Shift Kit (Amersham Pharmacia Biotech, NJ, USA) 的標準方法進行以下之操作。對於前述 (1) 藉由經時性所調製出的 5 μ g 萃取物加入 2 μ l 的套組中之 10x 結合緩衝液中 (100mM Tris - HCl (pH7.5) , 500mM NaCl , 5mM DTT) 2 μ l , 加入 4 μ l 的 50% 甘油 , 1 μ l 的 1% NP - 40 , 以及 1 μ l 的 poly (dI - dC) · poly (dI - dC) , 加入 2 μ l 前述 (2) 所調製的 32 P 標識 ISRE - 2 探查物 , 加水至全量成 20 μ l 後 , 將此反應混合物於室溫下進行 20 分鐘的恆溫培養 , 前述萃取物中可能存在的結合因子 , 與前述

^{32}P 標識 ISRE-2 探查物會產生結合。

反應液 $18\mu\text{l}$ 中加入 $2\mu\text{l}$ 的 $10\times$ 染色液（附於組套中者），於 $1\times$ Tris-甘胺酸緩衝液（ 25mM Tris， 190mM 甘胺酸， 1mM EDTA， $\text{pH}8.1$ ）中，於 7.5% 的丙烯醯胺瓊膠上進行電泳，電泳後，將膠體貼附於濾紙上，將蛋白質移至濾紙上。以膠體乾燥器進行乾燥後的濾紙以 X 光底片使其感光，檢測出信號。

欲作比較將不添加萃取物的反應液〔（NEC-）〕、添加不經干擾素 α 的刺激所培養的細胞培養物萃取物的反應液〔0h〕、準備對 8 小時的培養液其標識探查物由添加 50ng 的未標識 ISRE2 探查物作取代之反應液〔8h（+cold）〕、以及 8 小時的培養後之萃取液中添加 50ng 的 unrelated 探查物 adp 之反應液〔8h（+cold unrelated）〕，進行如上述相同的處理進行信號的檢測。

結果如圖 7 所示。由此圖 7 可明白指出，與相當於 HM1.24 探查物的一部份之雙股 DNA 結合物質，由干擾素的刺激下培養之 U266-B1 細胞中有經時性地增加。

（4）經由與各種抗體反應進而定性轉錄因子

如前述（1）所記載，骨髓瘤細胞 U266-B1（ATCC-TIB196）於 $1000\text{U}/\text{ml}$ 的干擾素- α 的存在下經 8 小時培養，調製出萃取物。依據 Band Shift Kit（Amersham Pharmacia Biotech）的標準使用手冊進行下述的操作。即， $5\mu\text{g}$ 的萃取物中添加 $2\mu\text{g}$ 的抗體，於室溫下恆溫培養 15 分鐘，得到萃取液／抗體反應液。於前述 kit 所附的 $2\mu\text{l}$

之 $10\times$ 結合緩衝液、 $4\mu\text{l}$ 的 50% 甘油、 $1\mu\text{l}$ 之 1% NP-40 以及 $1\mu\text{l}$ 之 Poly(dI-dC)·Poly(dI-dC) 中，添加 $2\mu\text{l}$ 前述的萃取液／抗體反應液以及 $2\mu\text{l}$ 之前述 (2) 所調製的標識探查物，加入水至全量為 $20\mu\text{l}$ 後，此反應混合物於室溫下作 20 分鐘的恆溫培養。

此反應混合物，以如上述 (3) 所記載進行電泳，進行信號的檢測。

作為上述的抗體，可使用下述抗體（任一種皆為 Santa Cruz Biotechnology）。

抗－人類 STAT1 p84/p91(E-23)：（說明）兔子多細胞系抗體（SC-364 X）

抗－人類 STAT2 (C-20)：兔子多細胞系抗體（SC-476X）

抗－老鼠 STAT3 (K-15)：兔子多細胞系抗體（SC-483X）

抗－人類 ISGF-3 γ p 48 (C-20)：兔子多細胞系抗體（SC-496 X）

抗－人類 IRF-1 (C-20)：兔子多細胞系抗體（SC-497X）

抗－人類 IRF-2 (C-19)：兔子多細胞系抗體（SC-498X）

抗－老鼠 ICSAT (M-17)：羊多細胞系抗體（SC-6059X）

又，作為對照組，準備使用無干擾素刺激所培養的細胞萃取物之反應液〔0h〕；添加 $1000\text{U}/\text{ml}$ 之干擾素 α 刺激

下 8 小時培養後的細胞萃取物，不添加抗體的反應液〔8h〕；取代標識 ISRE2 探查物添加 50ng 未標識的 ISRE2 探查物之反應液〔8h (+ cold)〕；以及取代標識 ISRE2 探查物添加 50ng 未標識 dp 探查物之反應液〔8h (+unrelated cold)〕等，如上述作相同的處理。

結果如圖 8 所示。由圖 8 可清楚明白，與由干擾素 α 刺激下培養的細胞所得萃取物中之標識 ISRE2 探查物結合的成分，其僅與抗-IRE-2 抗體結合，再與 HM1.24 啟動子結合使其活性化之因子，顯示為轉錄因子 IRE-2。

實施例 5.對 IRE-2 之 HM1.24 啟動子活性化之確認

IRE-2 共表現對 HM1.24 啟動子活性的影響，使用 U266 細胞以訊息基因測定儀測定，顯示實際上 IRE-2 具有 HM1.24 啟動子之轉錄活性化作用。以下的實驗中使用骨髓瘤細胞株 U266-B1 (ATCC TIB196)。細胞係由含有 10% FBS (GIBCO BRL) 的 RPMI-1640 培養基 (GIBCO)(以下稱 medium)，進行 5% CO₂ 恆溫培養。

(1) 構築含有 HM1.24 啟動子區的質體

HM1.24 啟動子區之基因由 PCR 純系化所獲得。由人類末梢血單核細胞使用 DNAzol reagent(GIBCO)，調製成基因團 DNA。所得基因團 DNA 作為鑄模，使用引子 HM2k (aaaggtaccagctgtctttctgtctgtcc) (序列號碼：16)、BST2B (atagtcatacgaagtagatgccatccag) (序列號碼：17)、使用 TaKaRa Taq (寶酒造，大津) 以 Thermal Cycler 480(Perkin

Elmer, CA, USA) 進行 PCR (94℃ , 1 分、55℃ , 1 分鐘、72℃ , 1 分鐘、30 次重複) 。

所得之約 2kb 的片段以限制酶 KpnI, BglII (寶酒造) 處理 , 訊息基因質體 pGL3 - basic (Promega, WI, USA) 的 KpnI, BglII 位置使用 DNA ligation Kit ver. II (寶酒造) 進行純係化 , 將可勝任大腸菌 JM109 (Nippongene) 進行轉形。轉形之後的大腸菌以含有 100 μ g/ml 的胺苄青黴素之 LB 培養基以 37℃ 下培養 , 以 QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 調製出質體。

所得之質體 HM - 2k/GL3 以限制酶 Kpn I 以及 XhoI 處理 , kilo-sequence 使用 deletion kit (缺失套組, 寶酒造) 製成缺失純系 (deletion clone) , 得到含有自轉錄起始點至上游 - 491bp 為止的質體 HM - 491 / GL3。又 , HM - 2k/GL3 以限制酶 KpnI 以及 AflIII 處理 , 如上述的方法製成缺失純系 , 得到含有自轉錄起始點至上游 - 151bp 為止的 HM - 151 / GL3。

且以 HM-2k/GL3 為鑄模使用引子 10S (ttctcggtacctaattaatcctctgcctg) (序列號碼 : 18) 以及 GL 引子 2 (ctttatgtttttggcgtcttcca) (序列號碼 : 19) , 使用 TaKaRa Taq (寶酒造 , 大津) 以 Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, CA, USA) 進行 PCR (94℃ , 1 分、55℃ , 1 分鐘、72℃ , 1 分鐘、30 次重複) 。所得之片段以限制酶 KpnI, BglII (寶酒造) 處理 , 訊息基因質體 pGL3 - basic (Promega, WI, USA) 的 KpnI, BglII 位置使用 ligation high (東洋紡) 進行純係化 , 將可勝任大腸菌 JM109 (日本基因公司) 進行轉形。

轉形之後的大腸菌以含有 $100 \mu\text{g/ml}$ 的胺苄青黴素之 LB 培養基以 37°C 下培養，以 QIAGEN plasmid maxi kit (QIAGEN, Hilden, Germany) 調製出質體。如此得到含有自轉錄起始點至上游 125bp 為止的質體 HM-125/GL3。又，HM-2k/GL3 作為鑄模，使用引子 HMP 700 ($\text{aaaggtaccagaggtttacctggtatcctgg}$) (序列號碼：20) 以及 GL 引子 2，以相同的步驟進行 PCR。pGL3-basic 的限制酶 KpnI 以及 Af1II 位置導入片段，而得到含有自轉錄起始點至上游約 700bp 為止的 HM-700/GL3。

且 HM-2k/GL3 作為鑄模使用引子 HMP700 以及 11A' ($\text{cagaggattaattaggtaccgaaagagaggtgggctttt}$) (序列號碼：21)，使用 KOD 聚合酶 (東洋紡) 以 Thermal Cycler 480 (Perkin Elmer, CA, USA) 進行 PCR (98°C ，15 秒、 65°C ，2 秒、 74°C ，30 秒、25 次重複)。所得之片段使用 Zero Blunt TOPO PCR cloning kit for sequencing ver. B (Invitrogen)，插入 pCR4 Blunt-TOPO 載體中。所得之質體以限制酶 KpnI 處理，回收約 550bp 的片段，HM-125/GL3 之 KpnI 位置使用 ligation high 導入。如此得到缺失自轉錄起始點上游 -125 至 -145 附近之 d ISRE/GL3。

(2) 構築 IRE-2 表現質體

IRF-2 表現質體如以下製得。以干擾素 α (1000U/ml) 刺激後經 8 小時的 U266 細胞，使用 TRIzol 試藥 (GIBCO-BRL) 萃取之全 RNA。使用第一股 cDNA 合成套組 (First-strand cDNA synthesis Kit (Pharmacia))，得到 RN

A 的鑄模，將 NotI-d(T)₁₈ 作為引子進行 37°C 1 小時的逆轉錄反應。所得之 cDNA 作為鑄模，使用 IRF2-F2 (ttgtattggttagcgtgaaaaaagc) (序列號碼：22)、IRF2-2R (cagctagtccacattatctcgtcc) (序列號碼：23) 作為引子以 LA-Taq (寶酒造) 進行 PCR (94°C, 45 秒、60°C, 45 秒、72°C, 60 秒、40 次重複)。

所得之 PCR 反應液作為鑄模，使用 IRF2-F1 (agaggggtaccatgccggtggaaaggatgcg) (序列號碼：24)、IRF2-R 1 (agtcgggtaccttaactgctcttgacgcggg) (序列號碼：25) 作為引子，以 KOD 聚合酶 (東洋紡) 再次作 PCR (94°C, 45 秒、60°C, 45 秒、72°C, 60 秒、30 次重複)。所得之片段以限制酶 KpnI 處理，使用 ligation high (東洋紡) 導入於表現質體 pTracer-CMV (Invitrogen) 的 KpnI 位置，得到 IRF-2 表現質體 pIRF-2 / 追蹤體 (tracer)。

(3) 訊息基因活性的測定

對細胞的質體導入係以 Polyethylenimine-Transferrinfection Kit (Tf PEI-Kit) (Bender MedSystems, Vienna, Austria), 蟲螢光素酶測定使用 Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega)。細胞株於含有 50 μ M 的 Defferrioxamine 與 10% 的 FBS 之 RPMI-1640 培養一晚。欲將導入的質體與 Tf-PEI 形成複合體，製作成最終濃度為 20 μ g/ml 的訊息基因質體、20 μ g/ml 的 pIRF-2 / 追蹤體或 pTracer-CMV, 0.4 μ g/ml 的 pRL-SV40, 1 μ g/ml Tf-PEI 藥劑之混合液，於是溫下 20 分鐘恆溫培養。

(37)

5×10^5 細胞 / ml 的細胞以 Tf-PEI 質體混合液的 3 倍容量加入，進行 4 小時 37°C 的恆溫培養，以培養基洗淨後，以 2×10^5 細胞 / ml 濃度於每 1 單位 (well) 100 μ l 的程度以 96 單位 (well) 的平底培養皿進行培養。添加 IFN- α 的最終濃度為 0 與 1000U / ml，進行 37°C 的 2 天培養。細胞以 PBS (-) 洗淨後，溶解於 20 μ l 的被動分解緩衝液，其中 6 μ l 使用於 C96 White Polysorp Fluoronunc plate (Nunc) 中。於 Luminoskin (Labsystems) 中基質為 30 μ l，測定時間為 10 秒分別測出 Firefly, Renila 的發光強度測定值以進行 Firefly/Renila 的轉移效率之修正而求得相對活性。

(4) 結果

將 HM1.24 啟動通訊質體與 IRF-2 表現質體導入 U266 細胞中，測定通訊活性 (圖 9)。其結果，IRF-2 結合部位之含有 ISRE 單位 (motif) 序列之 -700 以及 -151 中，可因 IRF-2 共表現而提升蟲螢光素酶活性。另一方面，缺失 ISRE 序列的 d ISRE / GL3 中不因 IRF-2 共表現而使得蟲螢光素酶活性有所變化。以上結果得知 IRF-2 與 HM1.24 啟動子的 ISRE 區結合，可增強其轉錄活性。

(5) 對 IRF-2 的強制表現使得 HM1.24 抗原的增強之確認

IRF-2 對 HM1.24 抗原表現量的變化，係由將 IRF-2 表現質體 (pIRF-2 / 追蹤體) 或對照組質體 (pTracer / CMV) 以上述方法導入 U266 細胞，經 1 至 2 天的培養後將細胞回

收，作為一次抗體以老鼠抗人類 HM1.24 抗體染色。細胞經洗淨，且作為第二抗體以 FITC 標識抗老鼠 IgG 抗體染色。將細胞洗淨後，以流動細胞測定儀測定細胞的 FITC 螢光強度。確認 IRF-2 表現質體導入細胞，與對照質體導入細胞作比較，顯示其 FITC 強度較高之細胞較為多。

依據專利協力條約第 13 條規定之有關微生物寄存以及寄存機關

寄存機關 名稱：工業技術生命工學工業技術研究所

地址：日本國茨城縣筑波市東 1 丁目 1-3

微生物 (1) 名稱：大腸桿菌 DH5 α (pRS38-pUC19)

寄存號碼：FERM BP-4434

寄存日期：1993 年 10 月 5 日

(2) 名稱：老鼠-老鼠融合瘤 HM1.24

寄存號碼：FERM BP-5233

寄存日期：1995 年 4 月 27 日

(3) 名稱：大腸桿菌 DH5 α

(pUC19-RVHr-AHM-g γ l)

寄存號碼：FERM BP-5643

寄存日期：1996 年 8 月 29 日

(4) 名稱：大腸桿菌 DH5 α

(pUC19-1.24H-g γ l)

寄存號碼：FERM BP-5644

寄存日期：1996 年 8 月 29 日

(5) 名稱：大腸桿菌 DH5 α

(pUC19-RVLa-AHM-gk)

(39)

寄存號碼：FERM BP-5645

寄存日期：1996年8月29日

(6) 名稱：大腸桿菌 DH5 α

(pUC19-1.24 L - gk)

寄存號碼：FERM BP-5646

寄存日期：1996年8月29日

圖式簡單說明

圖 1 係表示干擾素 α 非存在下（上）或存在下（下），將培養的骨髓瘤細胞株 U266，使用人類 IgG（對照）或抗 HM1.24 抗體標識以流動細胞儀分析之結果。

圖 2 係表示干擾素 α 非存在下（上）或存在下（下），將培養的患者骨髓瘤細胞，使用人類 IgG（對照）或抗 HM1.24 抗體標識以流動細胞儀分析之結果。

圖 3 係表示將插入編碼 HM1.24 抗原基因的啓動子區域之通訊質體，進行轉形後所得之 U266 細胞，於干擾素 α 的非存在下或種種濃度存在下培養後，測定其蟲螢光素酶所得結果之圖。

圖 4 係表示插入編碼 HM1.24 抗原基因的啓動子區域內，由轉錄起始點至 151bp 上游為止、或 77bp 上游為止之通訊質體，進行轉形所得之 U266 細胞或 HEL 細胞，於干擾素 α （1000U/ml）的存在下培養後，測定其蟲螢光素酶所得結果之圖。

圖 5 係表示干擾素 γ 非存在下（上）或存在下（下），將培養的骨髓瘤細胞株 U266，使用人類 IgG（對照）或抗

HM1.24 抗體標識以流動細胞儀分析之結果。

圖 6 係表示干擾素 γ 非存在下（上）或存在下（下），將培養的患者骨髓瘤細胞，使用人類 IgG（對照）或抗 HM1.24 抗體標識以流動細胞儀分析之結果。

圖 7 係表示於 U266 培養細胞中添加 IFN- α ，而產生與 HM1.24 啟動子區域結合之轉錄因子，其量的經時性變化所示之電泳圖，圖面由照片代用。NE（-）為無添加核萃取物。0h 表示添加無 IFN- α 刺激的核萃取物。0.5 至 8h 表示添加 IFN- α （1000U/ml）刺激後經各時間之核萃取物。+cold 係表示添加 50ng 的未標識 ISRE2 探查物，+cold unrelated 係表示添加 50ng 的未標識 adp 序列。

圖 8 係表示與 HM1.24 啟動子結合之轉錄因子，使用各種抗體定性的結果所示之電泳圖，圖面由照片代用。NE（-）為無添加核萃取物。0h 表示添加無 IFN- α 刺激的核萃取物。8h 表示添加 IFN- α （1000U/ml）刺激後經 8h 之核萃取物。+cold 係表示添加 50ng 的未標識 ISRE2 探查物，+cold unrelated 係表示添加 50ng 的未標識 adp 序列。分別添加 2 μ g 的各抗體。

圖 9 係表示 HM1.24 啟動子通訊質體與 IRF-2 表現質體導入 U266 細胞，測定通訊活性時之結果所示圖。

序列表

<110> CHUGAI SEIYAKU 股份有限公司

<120> 以干擾素 α 作為活性成份的 MH1.24 抗原之表現增強劑

<130> H757

<160> 5

<210> 1

<211> 1073

<212> DNA

<213> 人類

<223> 編碼 HM1.24 抗體蛋白質的核苷酸序列

<400> 1

gaattcggca cgagggatct gg atg gca tct act tcg tat gac tat tgc 49

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys

1 5

aga gtg ccc atg gaa gac ggg gat aag cgc tgt aag ctt ctg ctg ggg 97

Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly

10 15 20 25

ata gga att ctg gtg ctc ctg atc atc.gtg att ctg ggg gtg ccc ttg 145

Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu

30 35 40

att atc ttc acc atc aag gcc aac agc gag gcc tgc cgg gac ggc ctt 193

Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu

45 50 55

cgg gca gtg atg gag tgt cgc aat gtc acc cat ctc ctg caa caa gag 241
 Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu
 60 65 70
 ctg acc gag gcc cag aag ggc ttt cag gat gtg gag gcc cag gcc gcc 289
 Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala
 75 80 85
 acc tgc aac cac act gtg atg gcc cta atg gct tcc ctg gat gca gag 337
 Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu
 90 95 100 105
 aag gcc caa gga caa aag aaa gtg gag gag ctt gag gga gag atc act 385
 Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr
 110 115 120
 aca tta aac cat aag ctt cag gac gcg tct gca gag gtg gag cga ctg 433
 Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu
 125 130 135
 aga aga gaa aac cag gtc tta agc gtg aga atc gcg gac aag aag tac 481
 Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr
 140 145 150
 tac ccc agc tcc cag gac tcc agc tcc gct gcg gcg ccc cag ctg ctg 529
 Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu
 155 160 165
 att gtg ctg ctg ggc ctc agc gct ctg ctg cag tga gatcccagga 575
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln
 170 175 180
 agctggcaca tcttgaagg tccgtcctgc tcggcttttc gcttgaacat tcccttgatc 635
 tcatcagttc tgagcgggtc atggggcaac acggttagcg gggagagcac ggggtagccg 695
 gagaagggcc tctggagcag gtctggaggg gccatggggc agtcctgggt ctggggacac 755

```

agtcgggttg acccagggct gtctccctcc agagcctccc tccggacaat gagtcccccc 815
tcttgtctcc caccctgaga ttgggcatgg ggtgcggtgt ggggggcatg tgctgcctgt 875
tgttatgggt ttttttgcg ggggggggttg cttttttctg gggctcttga gctccaaaaa 935
aataaacact tcctttgagg gagagcacac cttaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 995
aaaattcggg cggccgcc                                     1013

```

<210> 2

<211> 180

<212> PRT

<213> 人類

<223> HM1.24 抗體蛋白質的胺基序列

<440> 2

```

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys Arg Val Pro Met Glu Asp Gly
  1             5             10             15
Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu
          20             25             30
Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala
          35             40             45
Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu Arg Ala Val Met Glu Cys Arg
  50             55             60
Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly
  65             70             75             80
Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala Thr Cys Asn His Thr Val Met
          85             90             95
Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys
          100            105            110

```

Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr Thr Leu Asn His Lys Leu Gln

115

120

125

Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu

130

135

140

Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser

145

150

155

160

Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser

165

170

175

Ala Leu Leu Gln

180

<210> 3

<211> 2016

<212> DNA

<213> 人類

<223> 編碼 HM1.24 抗體蛋白質中啓動區的基因之核苷酸序列

<400> 3

```
actaaaagtc tctgatatgc agaaataatg gcataagctg tctttctgtc tgtccctct 60
ctctctctct gcctcggctg ccaggcaggg aagggccccc tgtccagtgg acacgtgacc 120
cacatgacct tacctatcat tggagatgac tcacactctt taccctgccc cttttgcttt 180
gtatccaata aataacagca cagccagaca ttcggggcca ctaccagtct ccgcgcattg 240
ctggtagtgg tccccgggc ccagctgtct tttcttttat ctcttcgtct tgtgtcttta 300
tttctacact ctctcgtcgc cgcacacagg gagagacca ctgaccctgt ggggctggtc 360
cctacagtaa ttttaaaggg aagagcaaca aactttcggg ttgcagggtt gggactgttt 420
acagctgcaa aatttagaga ggacatcaat ctattattat ccacatttta cagctgggga 480
aatcaatgct aagagaggaa attcatttgc ccagagggtg accaccctgg cctccaatgt 540
```

gcaattcatg caattgtgat ttccgacctg gtcccaaact aaccctaaag ttagcaggcc 600
 agaacagtgc tgctcaaata agtcagctta gtcaaataag tcaggcaaag gtcgtgtctt 660
 tgcacctgga gtcctggcca ggctggtagg tccctcctcc tgggacaagt tcaccctcag 720
 aattttcagc aagatcatct cccacagctt gttaattggt tcttggttct aagtgatttt 780
 tttgtttatt ggtttaagag atgggatccc actctatcac ccaggcttga gtgccgtggc 840
 acaatcatag ctgctgcag cctcaaactc ctgggctcga gtgacccctc tgcctcagcc 900
 tcccagcctc agcctgggac cacaggcatg taccaccatg cctggctcta agtggcttta 960
 atggggctct tctgagggat gttggagtca gggcctgggg ggagttcccc aggccttctg 1020
 ggaggcctgg gctctggact tgacctgcc tactgtctgg ccctgctgaa aagaaaaaaaa 1080
 aacatggaaa tggcagacct aacagaatct gggctgtggt caggatgtgg ctgaagaagc 1140
 cacaagaaaa acatgcagtc ccctttcagc ggtcatgccc agcagttggg tgccgataat 1200
 gggcctgatt tcctgtagga agccctggct ctcttggcca catggacagt gtctgaggct 1260
 ggccctgtta ttccccttg cagatgaaga aacaggctca gagagtttac ctggtatcct 1320
 ggagtcccag gagcactttt tctggaagta ggagcttggt tcctgcaggt gccaagacag 1380
 agaccgacat tgtttgttg ctgggtcgggt ctcccagttt tcagctggct ccagtctcac 1440
 ctgttgctca cacaccctcc atgtctccca tagtcccctc ggtggggaca gaggcactgg 1500
 atgaagccct gctcgtcacc acagagacac ctgaacacaa aaaccagtcc ctggggtcag 1560
 acccaggccc cgccccaga cccaggccct gccctcactc caccacgcaa ctgtgcaacc 1620
 tcagtttccc cagggtggaga ccggaccaac aatgatggcc tctgcctctt caggctatag 1680
 tacagatgaa tacaggctgg cacggcctag gcactcagta acacacggca gaggcacagg 1740
 gacttaagat ggagtgtccc aggcagccac agttggctgg caccagttg ggaagggccc 1800
 aagggtttt aaagcagggt gaaaaaaaaa gccacctcc tttctgggaa actgaaactg 1860
 aaaacctaataaatccctctg cctgtaggtg cctcatgcaa gagctgctgg tcagagcact 1920
 tcctggaact tgctattggt caggacgttt cctatgctaa taaaggggtg gcccgtagaa 1980
 gattccagca cctcccccta actccaggcc agactccttt cagctaaagg ggagatctgg 2040
 atg gca tct act tcg tat gac 2061

Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 HM2K

<400> 4

aaaggtacca gctgtctttc tgtctgtcc

29

<210> 5

<211> 78

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 BST2B

<400> 5

atagtcatac gaagtagatg ccatccag

28

<210> 6

<211> 2144

<212> DNA

<213> 人類

<223> 編碼 IRF-2 蛋白質之核苷酸序列

<400> 6

```
aactgacggg ctttcatttc catttcacac accctagcaa cacttatacc ttgcggaatt 60
gtattggtag cgtgaaaaaa gcacactgag agggcaccat gccggtggaa aggatgcgca 120
tgcgcccgtg gctggaggag cagataaact ccaacacgat cccggggctc aagtggccta 180
acaaggaaaa gaagattttt cagatcccct ggatgcatgc ggctagacat ggggtgggatg 240
tggaaaaaga tgcaccactc tttagaaacc gggcaatcca tacaggaaag catcaaccag 300
gagtagataa acctgatccc aaaacatgga aggcgaattt cagatgcgcc atgaattcct 360
tgcctgatat tgaagaagtc aaggataaaa gcataaagaa aggaaataat gccttcaggg 420
tctaccgaat gctgccccta tcagaacggc cttctaagaa aggaaagaaa ccaaagacag 480
aaaaagaaga caaagttaag cacatcaagc aagaaccagt tgagtcattt ctggggccta 540
gtaatggagt aagtgatctt tctcctgagt atgcggtcct gacttcaact ataaaaaatg 600
aagtggatag tacggtgaac atcatagttg taggacagtc ccatctggac agcaacattg 660
agaatcaaga gattgtcacc aatccgccag acatttgcca agttgtagag gtgaccactg 720
agagcgacga gcagccggtc agcatgagcg agctctaccc tctgcagatc tccccgtgt 780
```

cttcctatgc agaaagcgaa acgactgata gtgtgccag cgatgaagag agtgccgagg 840
ggcggccaca ctggcggaag aggaatatig aaggcaaaca gtacctcagc aacatgggga 900
ctcgaggctc ctacctgctg cccggcatgg cgctcttctg cacttccaac aaaccggacc 960
tccaggtcac catcaaagag gagagcaatc cgggtgcctta caacagctcc tggccccctt 1020
ttcaagacct ccccccttct tcttccatga ccccgacatc cagcagcagt cggccagacc 1080
gggagacccg ggccagcgtc atcaagaaaa catcggatat caccagggcc cgcgtcaaga 1140
gctgttaagc ctctgactct ccgcggtggt tgttggggct tcttggcttt gttttgttgt 1200
ttgtttgtat tttatTTTTT tctctctgac acctatttta gacaaatcta agggaaaaag 1260
ccttgacaat agaacattga ttgctgtgtc caactccagt acctggagct tctctttaac 1320
tcaggactcc agcccatgg tagacgtgtg tttctagagc ctgctggatc tcccagggct 1380
actcactcaa gttcaaggac caacaagggc agtggagggtg ctgcattgcc tgcggtcaag 1440
gccagcaagg tggagtggat gcctcagaac ggacgagata atgtgaacta gctggaattt 1500
tttattcttg tgaatatgta cataggcagc actagcgaca ttgcagtctg cttctgcacc 1560
ttatcttaaa gcacttacag ataggccttc ttgtgatctt gctctatctc acagcacact 1620
cagcaccccc ttctctgccc attccccagc ctctcttctt atcccatccc atcccatccc 1680
atcccatccc atcccatccc gctcttttcc tacttttctt tccctcaaag cttccattcc 1740
acatccggag gagaagaagg aaatgaattt ctctacagat gtcccatTTT cagactgctt 1800

taaaaaaaaat ccttctaatac tgctatgctt gaatgccacg cgtacaaaag gaaaaagtat 1860
 catggaaata ttatgcaaat tcccagattt gaagacaaaa atactctaata tctaaccaga 1920
 gcaagctttt ttatTTTTTTa tacaggggaa tattttattc aaggtaaaat tctaaataaa 1980
 atataattgt tttttatctt ttctacagca aatttataat tttaagattc cttttcttgt 2040
 ttatcagcag ttgttattac atccttgtgg cacatttttt tttaattttg taaaggtgaa 2100
 aaaagctttt atgagctcat ctagcaatca gattttcctg tgga 2144

<210> 7

<211> 349

<212> PRT

<213> 人類

<223> IRF-2 蛋白質的胺基酸序列

<400> 7

Met	Pro	Val	Glu	Arg	Met	Arg	Met	Arg	Pro	Trp	Leu	Glu	Glu	Gln	Ile
1				5					10					15	
Asn	Ser	Asn	Thr	Ile	Pro	Gly	Leu	Lys	Trp	Leu	Asn	Lys	Glu	Lys	Lys
			20					25					30		
Ile	Phe	Gln	Ile	Pro	Trp	Met	His	Ala	Ala	Arg	His	Gly	Trp	Asp	Val
	35						40					45			
Glu	Lys	Asp	Ala	Pro	Leu	Phe	Arg	Asn	Arg	Ala	Ile	His	Thr	Gly	Lys
	50						55				60				
His	Gln	Pro	Gly	Val	Asp	Lys	Pro	Asp	Pro	Lys	Thr	Trp	Lys	Ala	Asn
65				70						75				80	
Phe	Arg	Cys	Ala	Met	Asn	Ser	Leu	Pro	Asp	Ile	Glu	Glu	Val	Lys	Asp
				85					90					95	
Lys	Ser	Ile	Lys	Lys	Gly	Asn	Asn	Ala	Phe	Arg	Val	Tyr	Arg	Met	Leu
			100					105						110	
Pro	Leu	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser	Lys	Lys	Gly	Lys	Lys	Pro	Lys	Thr	Glu
		115						120					125		
Lys	Glu	Asp	Lys	Val	Lys	His	Ile	Lys	Gln	Glu	Pro	Val	Glu	Ser	Ser
	130						135						140		
Leu	Gly	Leu	Ser	Asn	Gly	Val	Ser	Asp	Leu	Ser	Pro	Glu	Tyr	Ala	Val
145				150						155				160	
Leu	Thr	Ser	Thr	Ile	Lys	Asn	Glu	Val	Asp	Ser	Thr	Val	Asn	Ile	Ile
			165						170					175	
Val	Val	Gly	Gln	Ser	His	Leu	Asp	Ser	Asn	Ile	Glu	Asn	Gln	Glu	Ile
		180							185					190	
Val	Thr	Asn	Pro	Pro	Asp	Ile	Cys	Gln	Val	Val	Glu	Val	Thr	Thr	Glu
		195							200					205	

Ser Asp Glu Gln Pro Val Ser Met Ser Glu Leu Tyr Pro Leu Gln Ile
 210 215 220
 Ser Pro Val Ser Ser Tyr Ala Glu Ser Glu Thr Thr Asp Ser Val Pro
 225 230 235 240
 Ser Asp Glu Glu Ser Ala Glu Gly Arg Pro His Trp Arg Lys Arg Asn
 245 250 255
 Ile Glu Gly Lys Gln Tyr Leu Ser Asn Met Gly Thr Arg Gly Ser Tyr
 260 265 270
 Leu Leu Pro Gly Met Ala Ser Phe Val Thr Ser Asn Lys Pro Asp Leu
 275 280 285
 Gln Val Thr Ile Lys Glu Glu Ser Asn Pro Val Pro Tyr Asn Ser Ser
 290 295 300
 Trp Pro Pro Phe Gln Asp Leu Pro Leu Ser Ser Ser Met Thr Pro Ala
 305 310 315 320
 Ser Ser Ser Ser Arg Pro Asp Arg Glu Thr Arg Ala Ser Val Ile Lys
 325 330 335
 Lys Thr Ser Asp Ile Thr Gln Ala Arg Val Lys Ser Cys
 340 345

<210> 8

<211> 9

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> IFN- γ 活性化部位共同序列

<400> 8

ttncnnnaa

9

<210> 9

<211> 13

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> IFN- α 刺激回應因子 (ISRE) 共同序列

<400> 9

ngaaanngaa act

13

<210> 10

<211> 9

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 10

9

ttcccagaa

<210> 11

<211> 13

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223>

<400> 11

13

ggaaactgaa act

<210> 12

<211> 29

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> ISRE-F2 探查物

<400> 12

aatttctggg aaactgaaae tgaaaacct

29

<210> 13

<211> 29

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> ISRE-F2 探查物

<400> 13

aattaggttt tcagtttcag tttcccaga

29

<210> 14

<211> 37

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> adp-1 探查物

<400> 14

catggcatct acttcgtatg actattgcag agtgcc

37

<210> 15

<211> 36

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> adp-2 探查物

<400> 15

catgggcact ctgcaatagt catacgaagt agatgc

36

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 HM2k

<400> 16

aaaggtacca gctgtctttc tgtctgtcc

29

<210> 17

<211> 28

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> BST2B

<400> 17

atagtcatac gaagtagatg ccatccag

28

<210> 18

<211> 28

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 10S

<400> 18

tttcggtacc taattaatcc tctgcctg

28

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> GL 引子 2

<400> 19

ctttatgttt ttggcgtcctt cca

23

<210> 20

<211> 30

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 HMP700

<400> 20

aaaggtacca gagtttacct ggtatcctgg

30

<210> 21

<211> 39

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 11A'

<400> 21

cagaggatta attaggtacc gaaagagagg tgggctttt

39

<210> 22

<211> 24

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 IRF2-F2

<400> 22

ttgtattggc agcgtgaaaa aagc

24

<210> 23

<211> 24

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 IRF2-R2

<400> 23

cagctagttc acattatctc gtcc

24

<210> 24

<211> 30

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 IRF2-F1

<400> 24

agagggtacc atgccggtgg aaaggatgcg

30

<210> 25

<211> 30

<212> DNA

<213> 人造序列

<220>

<221>

<222>

<223> 引子 IRF2-R1

<400> 25

agtcggtacc ttaactgctc ttgacgcggg

30

五、中文發明摘要

發明之名稱：HM1.24 抗原之表現增強劑

本發明提供一種對於骨髓瘤細胞的 HM1.24 抗原之表現增強劑，其特徵為以干擾素 α 或干擾素 γ 或 IRF-2 蛋白質作為有效成份。其中干擾素 α 或干擾素 γ 介著編碼 HM1.24 抗原的基因之啟動子活性化，增強 HM1.24 抗原的表現者。

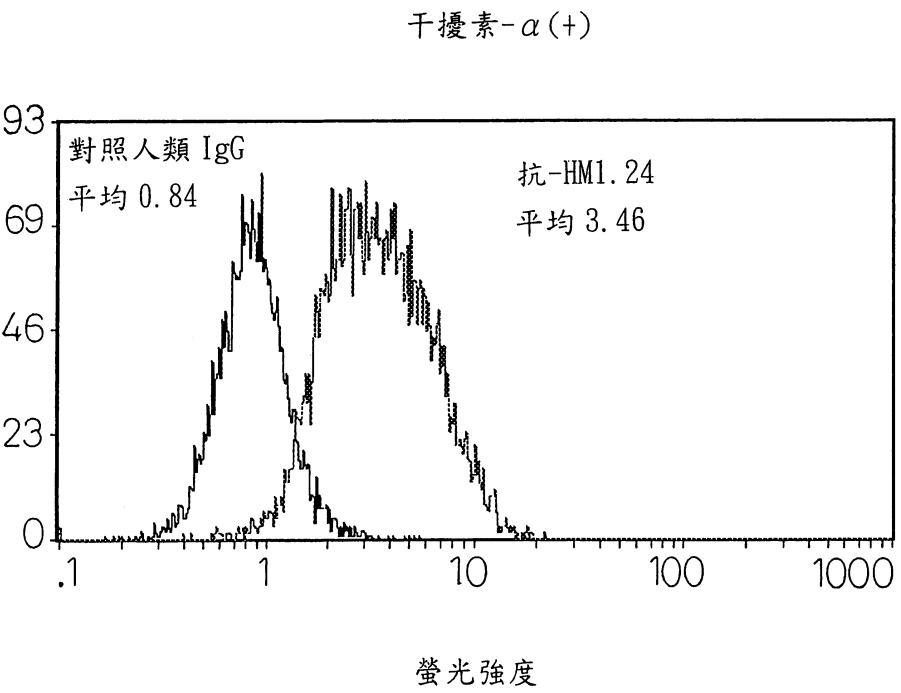
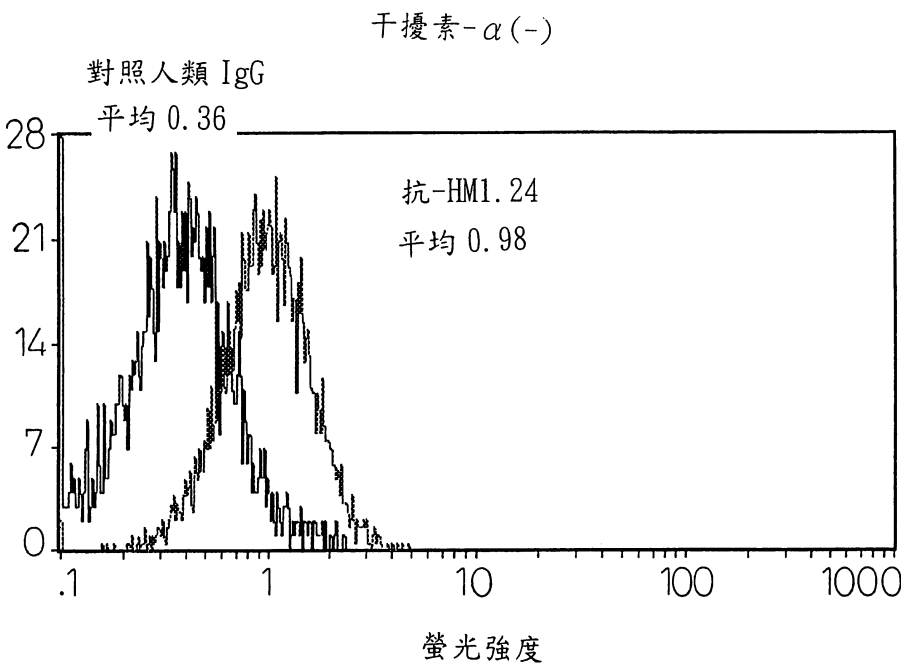
六、英文發明摘要

發明之名稱： Expression Enhancer for HM1.24 Antigen

Expression enhancer for HM1.24 antigen in myeloma cells, comprising interleukin- α or - γ or IRF-2 protein. It is expected that interferon- α and - γ enhances the expression of HM1.24 antigen by activating a promoter of a gene encoding HM1.24.

1/9

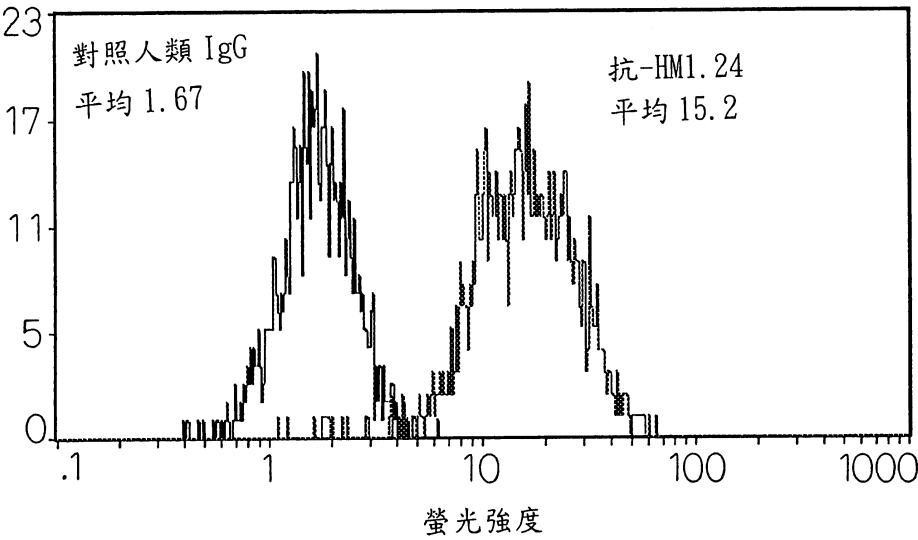
第 1 圖



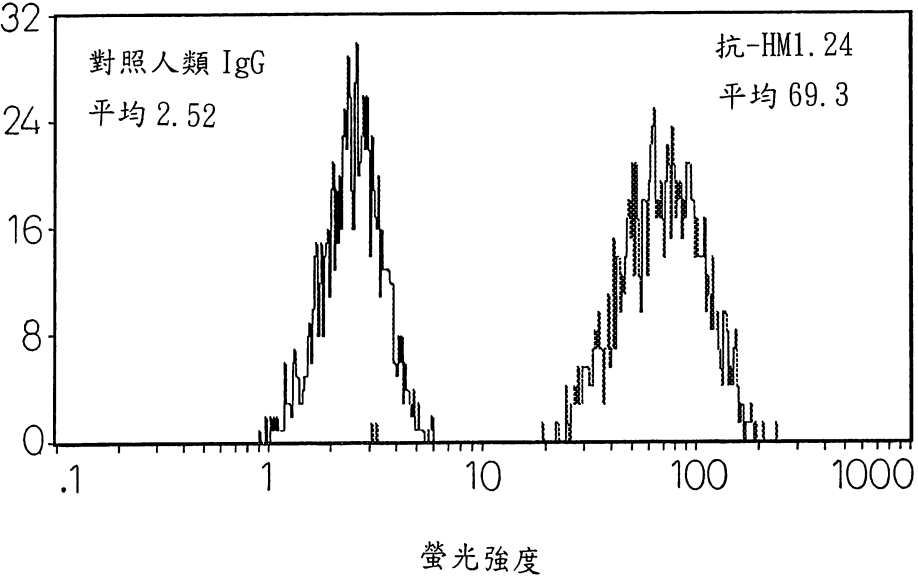
2/9

第 2 圖

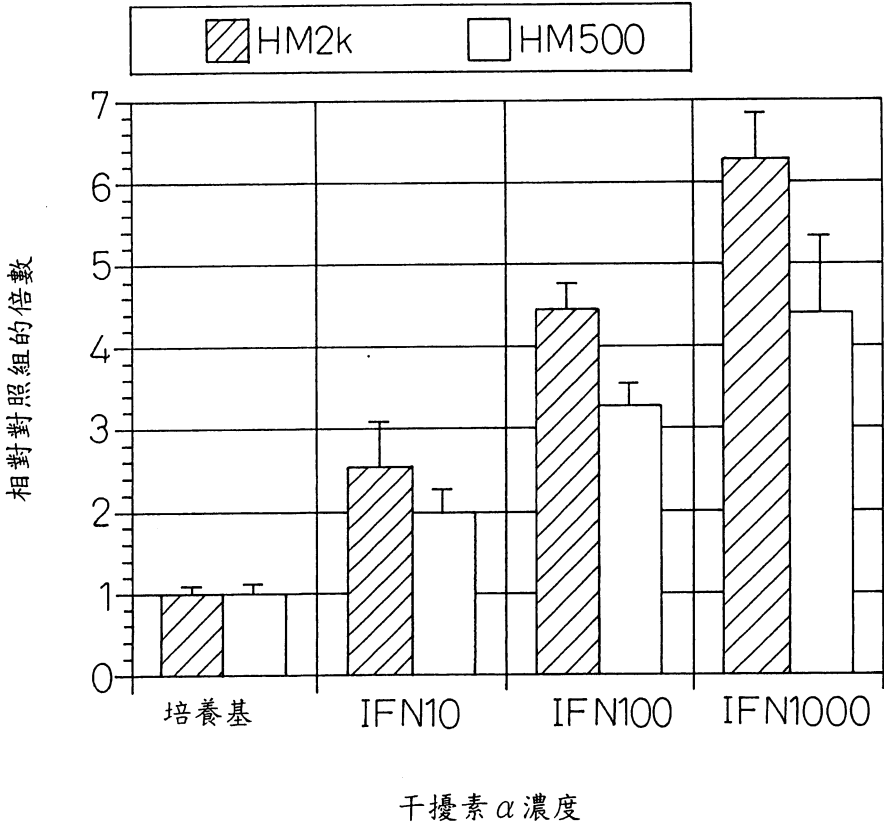
干擾素- α (-)



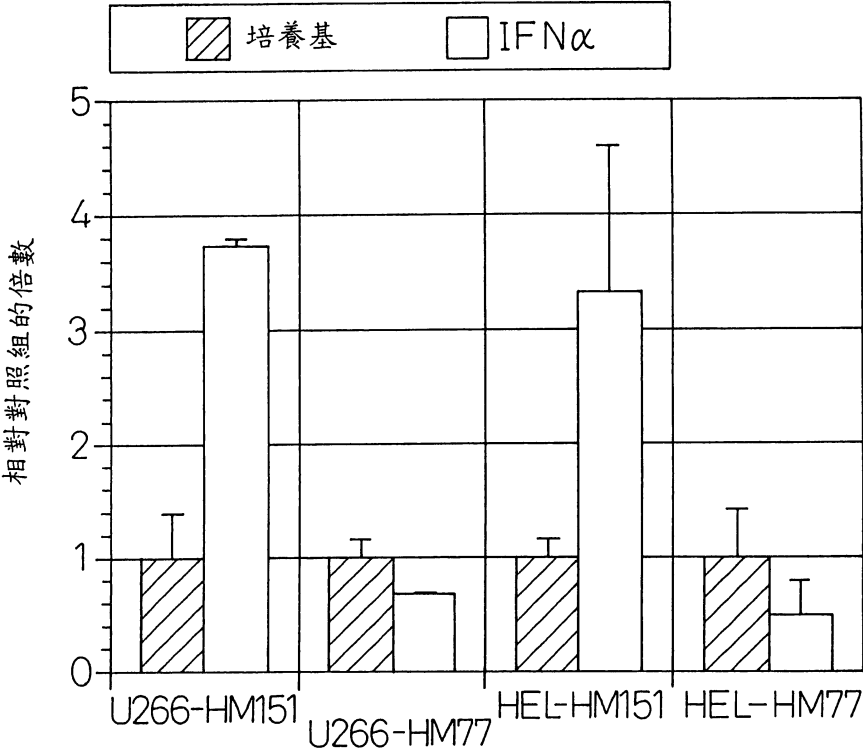
干擾素- α (+)



第 3 圖



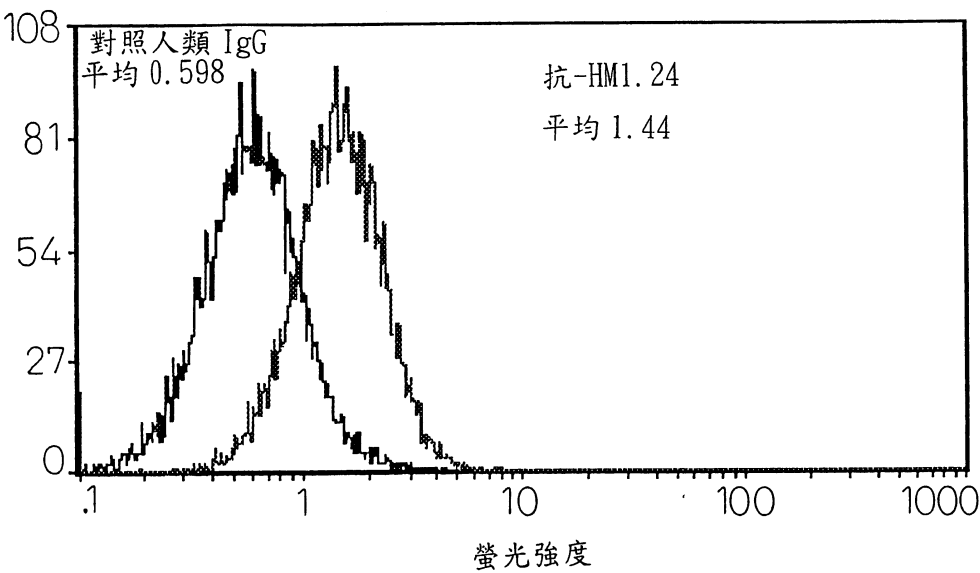
第 4 圖



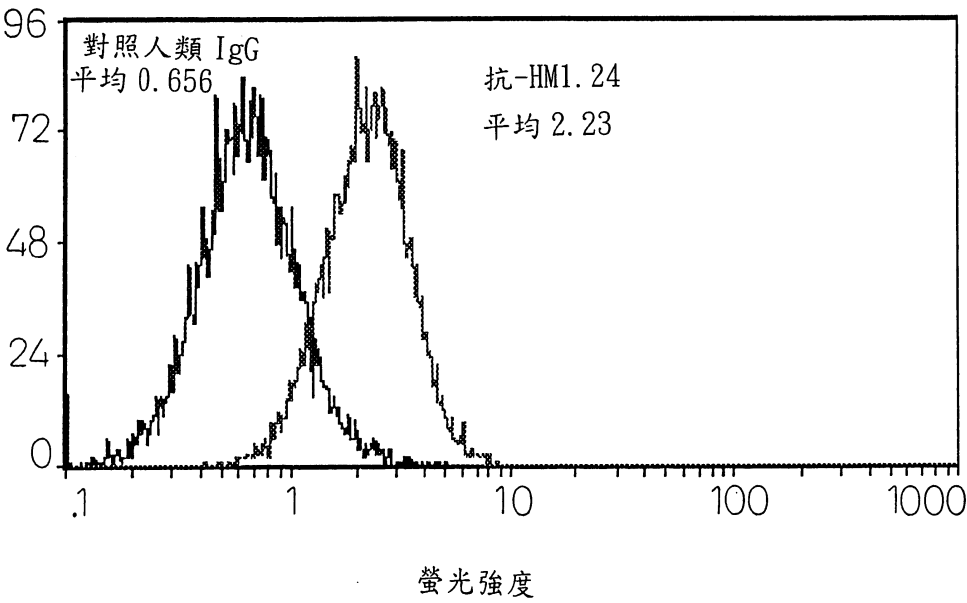
5/9

第 5 圖

干擾素- γ (-)

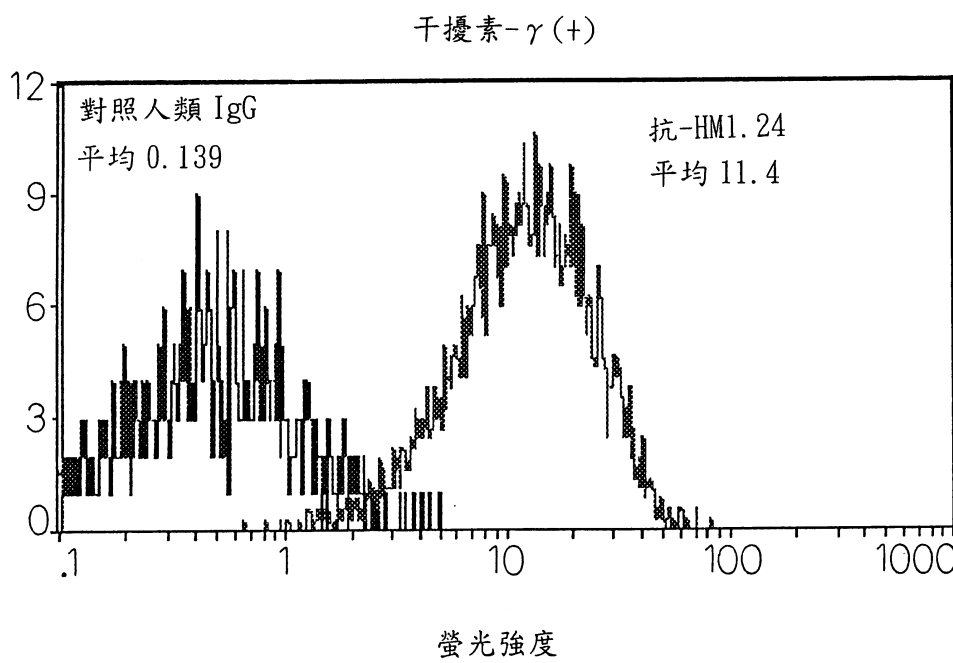
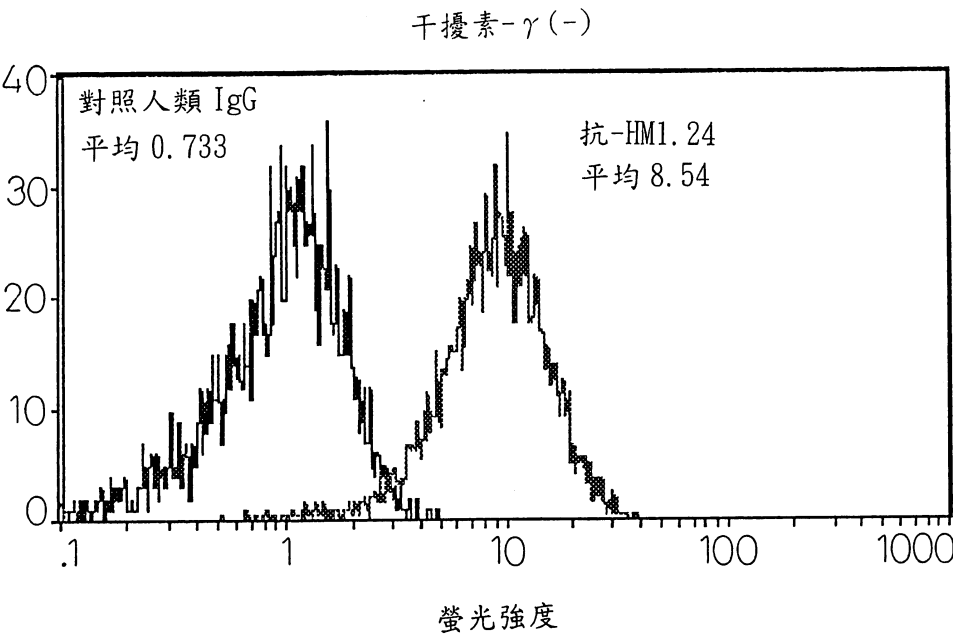


干擾素- γ (+)

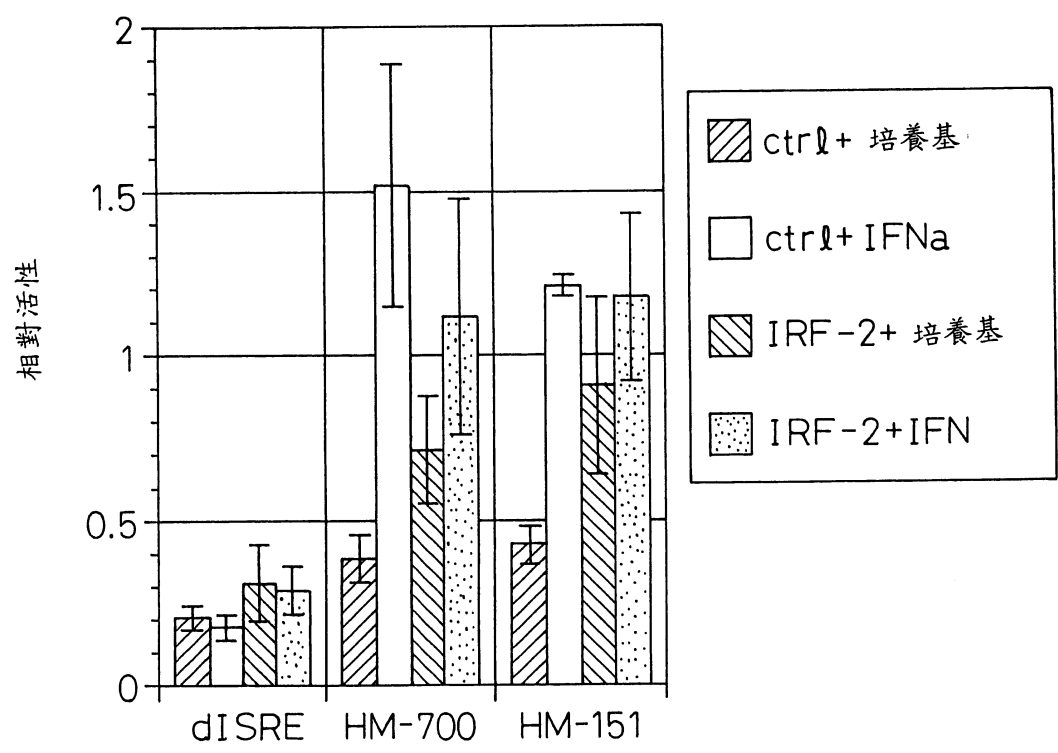


6/9

第 6 圖



第 9 圖



七、指定代表圖：

(一)、本案指定代表圖為：第 (2) 圖

(二)、本代表圖之元件代表符號簡單說明：無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：無

十、申請專利範圍

第 94109603 號專利申請案

中文申請專利範圍修正本

民國 96 年 7 月 17 日修正

1. 一種對於具有序列號碼：2 所示胺基酸序列的蛋白質（HM1.24 抗原）之骨髓瘤細胞的表現增強劑，其特徵為以人類干擾素 α 或人類干擾素 γ 作為有效成份者。

2. 一種對於具有序列號碼：2 所示胺基酸序列的蛋白質（HM1.24 抗原）之骨髓瘤細胞的表現增強劑，其特徵為以人類 IRF-2 蛋白質作為有效成份者。

3. 一種 HM1.24 啟動子之活性化劑，其特徵為以人類 IRF-2 蛋白質作為有效成份者。

4. 如申請專利範圍第 1 項的表現增強劑，其為含有以增強人類 IRF-2 蛋白質表現之化合物作為有效成份之對於 HM1.24 抗原的骨髓瘤細胞之表現增強劑。

5. 如申請專利範圍第 1 項的表現增強劑，其為以增強人類 IRF-2 蛋白質表現的化合物作為有效成份之 HM1.24 啟動子的活性化劑。