PCT

世界知的所有権機関
国 際 事 務 局

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 [3]
C07C103/52; C07G 7/00
A61K 39/00, 39/44; C61K 45/02
A61K 37/00, 37/02; C12N 5/00
C12P 21/00; G01N 33/54

A1

(11) 国際公開番号 WO 84/ 01149

(43) 国際公開日 1984年3月29日 (29. 03. 84)

(21) 国際出願番号 PCT／JP82／00381

(22) 国際出願日 1982年9月22日 (22. 09. 82)

(71) 出願人
武田薬品工業株式会社
(TAKEDA CHEMICAL INDUSTRIES, LTD.) [JP／JP]
〒541 大阪府大阪市東区道修町2丁目27番地 Osaka, (JP)

(72) 発明者
塚本恭造 (TSUKAMOTO, Kyozo) [JP／JP]
〒560 大阪府豊中市上野東1丁目9番1の402号 Osaka, (JP)
市森有三 (ICHIMORI, Yuzo) [JP／JP]
〒592 大阪府堺市浜寺元町5丁728番地 Osaka, (JP)
脇舛光廣 (WAKIMASU, Mitsuhiro) [JP／JP]
〒564 大阪府吹田市山手町3丁目17番 B－510号 Osaka, (JP)

(74) 代理人
弁理士 天井作次 (AMAI, Sakuji), 外
〒532 大阪府大阪市淀川区十三本町2丁目17番85号
武田薬品工業株式会社大阪工場内 Osaka, (JP)

(81) 指定国
MC.

添付公開書類 国際調査報告書

(54) Title: NOVEL POLYPEPTIDE AND ITS USE

(54) 発明の名称 新規ポリペプチドおよびその用途

(57) Abstract

A novel polypeptide represented by the following formula: H-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg-Gly-Arg-Arg-Ala-Ser-Gln-OH and a conjugated protein thereof, hybridoma and monoclonal antibody induced from said polypeptide or said conjugated protein, and a method for detecting and purifying gamma-type human interferon.

(57) 要約

本発明は、次式
H－Lys－Arg－Lys－Arg－Ser－Gln－Met－Leu－Phe－Arg－Gly－Arg－Arg－Ala－Ser－Gln－OH
で表わされる新規ポリペプチドおよびその蛋白複合体，該ポリペプチドまたは蛋白複合体から誘導されるハイブリドーマおよびモノクローナル抗体、ならびにこれらを利用するヒトγ型インターフエロンの検出法および精製法に関するものである。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	LI	リヒテンシュタイン
AU	オーストラリア	LK	スリランカ
BE	ベルギー	LU	ルクセンブルグ
BR	ブラジル	MC	モナコ
CF	中央アフリカ共和国	MG	マダガスカル
CG	コンゴー	MR	モーリタニア
CH	スイス	MW	マラウイ
CM	カメルーン	NL	オランダ
DE	西ドイツ	NO	ノルウエー
DK	デンマーク	RO	ルーマニア
FI	フインランド	SE	スウエーデン
FR	フランス	SN	セネガル
GA	ガボン	SU	ソビエト連邦
GB	イギリス	TD	チャード
HU	ハンガリー	TG	トーゴ
JP	日本	US	米国
KP	朝鮮民主主義人民共和国		

明　細　書

新規ポリペプチドおよびその用途

技術分野

本発明は、新規ポリペプチドおよびその用途に関する。

背景技術

ケーラーとミルスタインにより開発され（ネイチャー，第256巻，495頁，1975年）、近年盛んになつて来たハイブリドーマを用いたモノクローナル抗体の製造法は、各々の抗原決定基に対し、単一特異性を示す抗体が得られることや、粗精製標品に対して得られた抗体について吸収操作を必要としないことなどのすぐれた特徴をもつている。またこの他に、抗体取得という面からも、ハイブリドーマの腹水化により、高力価の抗体が、自由に、多量に、しかも常に均質な標品を再現性よく得られるなど多くの利点がある。この様な意味からハイブリドーマによるモノクローナル抗体取得の手法は、多方面にわたつてその有用性が高く評価されている。また、その使い方も単に抗原検出にとどまらず、抗体カラム作製を通じて、微量成分の精製に用いたり（ネイチャー，第285巻，446頁，1980年）、更には、診断薬，治療薬への応用（ヨーロピアン　ジャーナル　オブ　イムノロジー，第9巻，94頁，1979年）も展開されている。

ヒトのインターフエロン（ＩＦＮ）には、抗原的に異なるα，β，γ型の少くとも3種のタイプが存在することが知られて居る（ネーチャー，第286巻，110頁，1980年）。γ型インターフエロン（ＩＦＮ－γ）については、マイトージエンや抗原刺激によつて、主としてＴリンパ球から産生されることが判つて居り、別名免疫インターフエロンとも呼ばれている（ザ　インターフエロン　システム，スプリンガー社，

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

ニューヨーク，１９７８年）．ＩＦＮ－γは生体内で、種々の免疫反応にともなつて産生されることが予想され、免疫調節に重要な役割を果たしていると考えられている。また、ＩＦＮ－γの性質としては、α型インターフエロン（ＩＦＮ－α）やβ型インターフエロン（ＩＦＮ－β）と抗原性が異なることや、誘起剤の種類が異なることの他に、酸や熱に対する安定性が悪いことなども判つている（ザ　インターフエロンシステム，スプリンガー社，ニューヨーク，１９７９年）。

一般的にＩＦＮは、生体の産生する抗ウイルス作用をもつものとして定義されているが、この他に多くの生物活性をもつことが証明されており、特に抗腫瘍効果を有する点で注目されている（ブラッド，５５巻７１１頁，１９８０年；同誌，５６巻，８７５頁，１９８０年）。腫瘍の増殖を抑制する方法として、腫瘍細胞の増殖を直接抑制する方法と、~~腫瘍を抑制する方法が考えられ、後者の場合~~腫瘍を抑制する方法が考えられ、後者の場合、宿主の免疫反応を介して、間接的に．例えばナチュラルキラー細胞（ＮＫ）や、マクロファージの活性化、或いはキラーＴ細胞の活性化などが考えられる。実際、ＩＦＮには直接作用の他に、この様な種々の免疫増強活性があることが証明されている（バイオケミカ　エト　バイオフイジカ　アクタ，第５１６巻，２３１頁，１９７８年）。ＩＦＮ－γはインビトロでのこれら抗腫瘍につながる各種の活性、およびインビボに於ける抗腫瘍活性が、ＩＦＮ－αやＩＦＮ－βに比べ遙かに高いことから、その重要性が強く指摘されている（セルラーイムノロジー，第４９巻，３９０頁，１９８０年）。

然しながら、インビトロで誘導されるＩＦＮ－γの力価は一般に低いことや適切なＩＦＮ－γ産生株細胞がほとんどないこと、さらに酸や酸に対する安定性が悪いため精製がむつかしいことなどのためにＩＦＮ－γの大量生産および精製はＩＦＮ－αやＩＦＮ－βに比べ大幅に遅れて

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

いる。

ごく最近、天然のＩＦＮ－γが単一に出来たという報告があるが（プロシジング オブ ナショナル アカデミー オブ サイエンス，第７９巻，１８２０頁，１９８２年）、活性の回収が大変悪く、より効果的な精製法が待望されている。

一方最近に至り、ヒトＩＦＮ－γ遺伝子のクローニングが報告され、少くともＩＦＮ－γの一種として、１６６個のアミノ酸から成る約１７キロダルトンの分子種が、大腸菌で作られる様になつた（ネーチヤー，第２９５巻，５０３頁，１９８２年；ヌクレイック アシツズ リサーチ，第１０巻，２４８７頁，１９８２年）が、天然に産生されるＩＦＮ－γについては、種々の分子量のものが報告されて居り、その分子種間の対応関係は未だ不明である。

この様な視点から、各種のＩＦＮ－γに対するモノクローナル抗体を得ることは、分子種間の対応をつけるのに重要なだけでなく、天然の、或いは遺伝子組み換え法による大腸菌などで作らせたＩＦＮ－γを精製する上に極めて強力な武器となる。ごく最近に至り、天然のＩＦＮ－γに対するモノクローナル抗体の取得が報告された（ネーチヤー，第296巻，２５８頁，１９８２年）が、ＩＦＮ－γが複数の分子種から成つている場合、遺伝子の組み換え法によりクローン化された分子種に対するモノクローナル抗体を取得することは極めて重要となる。

発明の開示

本発明者らは、ヒト末梢血リンパ球より誘導したＩＦＮ－γのmRNAをもとに、ＩＦＮ－γ遺伝子のクローニングを行い、その塩基配列を明らかにしたが（ＰＣＴ／ＪＰ８２／０００８０明細書参照）、今回これをもとに推定されるアミノ酸配列のＣ末端側の部分構造を有する

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

式

$$H\text{-}X\text{-}\overset{(N)}{Lys}\ Arg\ Ser\ Gln\ Met\ Leu\ Phe\ Arg\ \overset{(C)}{Gly}\text{-}Y\text{-}OH\ (I)$$

〔式中、Xは結合手または$\overset{(N)}{Ile}$ Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys $\overset{(C)}{Arg}$ で示されるペプチド鎖のC末端から(において)そ数えて1~16個のアミノ酸数~~1~~~~8~~のペプチド(を有する)もしくはアミノ酸残基を示し、Yは$\overset{(N)}{Arg}$ Arg Ala Ser $\overset{(C)}{Gln}$で示されるペプチド鎖のN末端から(において)そ数えて1~5個のアミノ酸数~~1~~~~5~~のペプチド(を有する)もしくはアミノ酸残基を示す〕で表わされるポリペプチドを化学的に合成し、さらにキャリヤー蛋白と化学結合させ蛋白複合体とした。

ここで得られたポリペプチドまたは蛋白複合体で哺乳動物を免疫し、取り出した脾臓細胞と同種または異種のリンパ球様細胞とを細胞融合によりハイブリドーマとし、これをクローン化した。

ここで得られたハイブリドーマを哺乳動物に接種し、モノクローナル抗体を生成蓄積せしめ、これを採取して前記のポリペプチドに対するモノクローナル抗体を製造した。

さらに、ここで得られるモノクローナル抗体を利用し、粗ヒトＩＦＮ－γ含有物からヒト　ＩＦＮ－γを精製する方法およびラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）法ならびにエンザイムイムノアッセイ（ＥＩＡ）法によりヒトＩＦＮ－γを検出する方法を確立し、本発明を完成した。

すなわち本発明は、新規ポリペプチド（Ｉ），その蛋白複合体，新規クローン化されたハイブリドーマ，新規モノクローナル抗体およびこれらの製造法、さらに該モノクローナル抗体の用途を提供するものである。

前記ポリペプチド（Ｉ）に関し、YはArg Arg Ala Ser Glnであることが好ましく、とりわけこれに加えXがLys Argであることが好ましい。また、ポリペプチド（Ｉ）はアミノ酸残基数としてとりわけ

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

15～25個であることが好ましい。

当該ペプチドは、ペプチド合成の常套手段で製造しうる。固相合成法，液相合成法のいずれによつてもよいが、液相合成法が有利な場合が多い。このようなペプチドの合成の手段は、たとえば、“The Peptides”，第1巻（1966），Schroder and Lubke 著，Academic Press，New York，U.S.A.，あるいは“ペプチド合成”，泉屋ら著，丸善株式会社（1975年），あるいは“生化学実験講座，第1巻，207頁－400頁”矢島治明著，東京化学同人株式会社（1977年）に記載されており、たとえば、アジド法，クロライド法，酸無水物法，混合酸無水物法，DCC法，活性エステル法，ウッドワード試薬Kを用いる方法，カルボジイミダゾール法，酸化還元法，DCC／アディティブ（例、HONB，HOBt，HOSu）法などがあげられる。

当該ペプチドは、そのペプチド結合の任意の位置で2分される2種のフラグメントの一方に相当する反応性カルボキシル基を有する原料と、他方のフラグメントに相当する反応性アミノ基を有する原料をペプチド合成の常套手段で縮合させ、生成する縮合物が保護基を有する場合、その保護基を常套手段で脱離させることにより製造しうる。

原料の反応に関与すべきでない官能基の保護および保護基、ならびにその保護基の脱離、反応に関与する官能基の活性化などもまた公知のものあるいは手段から適宜選択しうる。

原料のアミノ基の保護基としては、たとえばカルボベンゾキシ，t－ブチルオキシカルボニル，t－アミルオキシカルボニル，イソボルニルオキシカルボニル，p－メトキシベンジルオキシカルボニル，2－クロル－ベンジルオキシカルボニル，アダマンチルオキシカルボニル，トリフルオロアセチル，フタリル，ホルミル，O－ニトロフエニルスルフエ

BUREAU OMPI WIPO

ニル，ジフエニルホスフイノチオイル，4－メトキシ－2，3，6－トリメチルベンゼンスルホニルなどがあげられる。カルボキシル基の保護基としては、たとえばアルキルエステル（例、メチル，エチル，プロピル，ブチル，t－ブチルなどのエステル基），ベンジルエステル基，p－ニトロベンジルエステル基，p－メトキシベンジルエステル基，p－クロルベンジルエステル基，ベンズヒドリルエステル基，カルボベンゾキシヒドラジド基，t－ブチルオキシカルボニルヒドラジド基，トリチルヒドラジド基などがあげられる。

アルギニンのグアニジノ基の保護基としては、たとえばニトロ基，トシル基，p－メトキシベンゼンスルホニル基，カルボベンゾキシ，イソボルニルオキシカルボニル，アダマンチルオキシカルボニル，4－メトキシ－2，6－ジメチルベンゼンスルホニル基，ペンタメチルベンゼンスルホニル基等が例示される。また、そのグアニジノ基は、酸（例、ベンゼンスルホン酸，トルエンスルホン酸，塩酸，硫酸など）塩の形で保護してもよい。

スレオニンの水酸基は、たとえばエステル化またはエーテル化によつて保護することができる。このエステル化に適する基としてはたとえばアセチル基などの低級アルカノイル基，ベンゾイル基などのアロイル基，ベンジルオキシカルボニル基，エチルオキシカルボニル基などの炭酸から誘導される基などがあげられる。またエーテル化に適する基としては、たとえばベンジル基，テトラヒドロピラニル基，t－ブチル基などである。しかしながらスレオニンの水酸基は必ずしも保護する必要はない。メチオニンはスルホキサイドの形で保護しておいてもよい。原料のカルボキシル基の活性化されたものとしては、たとえば対応する酸無水物，アジド，活性エステル（ペンタクロロフエノール，p－ニトロフエノー

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

ル，N－ハイドロキシサクシンイミド，N－ハイドロキシベンズトリアゾール，N－ハイドロキシ－5－ノルボルネン－2，3－ジカルボキシイミドなどとのエステル）などがあげられる。ペプチド結合形成反応は脱水剤（例、ジシクロヘキシルカルボジイミド，カルボジイミダゾール等のカルボジイミド試薬）の存在下に実施しうる場合がある。

本ペプチド縮合反応は溶媒の存在下に行うことができる。溶媒としては、ペプチド縮合反応に使用しうることが知られているものから適宜選択されうる。たとえば無水または含水のジメチルホルムアミド，ジメチルスルホキサイド，ピリジン，クロロホルム，ジオキサン，ジクロルメタン，テトラハイドロフラン，酢酸エチル，N－メチルピロリドンあるいはこれらの適宜の混合物などがあげられる。

反応温度はペプチド結合形成反応に使用されうることが知られている範囲から適宜選択され、通常約－40℃－約60℃，好ましくは約－20℃－約0℃の範囲から適宜選択される。

本縮合反応終了後、生成物が保護基を有している場合、それは常法により離脱できる。かかる常法としては、たとえば還元的方法（例、パラジウム黒等の触媒を用いる水素添加，液体アンモニア中金属ナトリウムによる還元），アシドリシス（例、トリフルオロ酢酸，フッ化水素，メタンスルホン酸あるいは、チオアニソール等の含硫化合物の存在下、上記の酸あるいは、その混合物によるアシドリシス）などがあげられる。

上記のようにして製造された本発明のペプチドは、反応終了後混合物から、通常のペプチドの分離手段，抽出，分配，カラムクロマトグラフィーなどにより採取できる。

ポリペプチドの蛋白複合体に関し、キャリヤー蛋白の種類およびキャリヤーとハプテン（この場合ペプチド）との混合比は、キャリヤーに

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

プリングさせて免疫したハプテンに対して抗体が効率よく出来れば、どの様なものをどの様な比率でカプリングさせてもよいが、例えば牛血清アルブミンや牛サイログロブリン等を重量比でハプテン1に対し0.1～20、好ましくは1～5の割合でカプルさせる方法が用いられる。

また、ハプテンとキャリヤーのカプリングには、種々の縮合剤を用いることが出来るが、グルタルアルデヒドやカルボジイミド等が好都合に用いられる。

ポリペプチド（Ⅰ）または蛋白複合体を用いて免疫するに際し、免疫する哺乳動物は、羊，山羊，兎，モルモット，ラット，マウス等の実験動物が使われるが、モノクローナル抗体を得るためには、ラット，マウスが好ましい。免疫方法は、例えばマウスを免疫する場合、皮下，腹腔内，静脈内，筋肉内，皮内等のいずれのルートからでも可能であるが、主として皮下，腹腔内静脈内に（とりわけ皮下）注入するのが好ましい。また、免疫間隔，免疫量等も可変度は高く、種々の方法が可能であるが、例えば2週間隔で2～6回免疫し、最終免疫後、1～5日、好ましくは2～4日後の脾細胞を用いる方法がよく用いられる。免疫量は1回にペプチド量として、マウス当り0.1 μg 以上、好ましくは10μg～300 μg 用いることが望ましい。又，脾臓を摘出する前に、部分採血を行い、血中の抗体価の上昇を確認した上で、脾臓細胞を用いる融合実験を行うことが望ましい。

上記脾臓細胞とリンパ球様細胞との細胞融合は、例えば摘出したマウスの脾臓細胞をヒポキサンチン－グアニン－ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（HGRRT$^-$）や、チミジンキナーゼ欠損（TK$^-$）の様なマーカーを持つた適切な同種または異種（好ましくは同種）のミエローマ等の、リンパ球様細胞株との間で融合させる。融合には、センダイウ

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

イルス，ポリエチングリコール（ＰＥＧ）等の融合剤が用いられる。もちろんジメチルスルホキシド（ＤＭＳＯ）その他の融合促進剤を加えることも可能である。ＰＥＧの重合度は、ふつう１０００～６０００，時間は0.5～３０分，濃度は１０％～８０％等が用いられるが、好ましい条件の一例として、ＰＥＧ６０００を３５～５５％で４～１０分処理することにより、効率よく融合させることが出来る。融合細胞は、ヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン培地（ＨＡＴ培地；ネイチャー，第２５６巻，４９５頁，１９７５年）等を用いて、選択的に増殖させることが出来る。

増殖して来た細胞の培養上清は、目的とする抗体産生があるか否かについてスクリーニングを行うことができるが、抗体価のスクリーニングは次の様に行うことが出来る。即ち、この場合には、まず第１段階として免疫したペプチドに対する抗体産生の有無を、ＲＩＡ法またはＥＩＡ法等の方法で調べることが出来るが、これらの方法についても種々の変法が可能である。好ましい測定法の一例として、ＥＩＡを用いる一つの方法について述べる。セルロースビーズ等の担体に、例えばウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体を常法に従つてカプリングさせておき、これに測定したい培養上清や、マウスの血清を加え、一定時間、定温（以下４～４０℃を示す）で反応させる。この後、反応物をよく洗つた後、酵素で標識したペプチド（酵素とペプチドを常法に従いカプリングさせた後精製）を加え、一定時間、定温で反応させる。反応物をよく洗つた後、酵素基質を加え、一定時間，定温で反応させ、その後、生成発色物を吸光度または螢光度等で測定することが出来る。

選択培地で増殖を示し、かつ免疫に用いたペプチドに対する抗体活性のみられたウエルの細胞は、限界希釈法等によりクローニングを行うこ

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

とが望ましい。クローン化された細胞の上清について同様にスクリーニングを行い抗体価の高いウエルの細胞を増やすことにより、免疫したペプチドと反応性を示すモノクローナル抗体産生ハイブリドーマクローンが得られる。

次にこれらクローンの産生する抗体が免疫に用いたペプチドだけでなく、ＩＦＮ－γ分子そのものと反応性を示すか否かを調べる必要があるが、このためには、標識されたＩＦＮ－γを用いたＲＩＡ法またはＥＩＡ法を用いて反応性を調べる方法や、生物活性（ＩＦＮ－γ活性）がこの抗体により吸収されるか否かを見る方法等が用いられる。後者の場合はＩＦＮ－γを精製する必要がないので有利に用いることが出来る。有利に用いられる一例を次に述べるが、もちろんこの他にもプロテインＡを用いて免疫沈降物を除いた上清中の残存ＩＦＮ－γ活性を測定する方法等も可能である。例えばウサギ抗マウスイムノグロブリン抗体をセルロースビーズ等の担体に常法に従いカプリングさせておき、これに測定したいハイブリドーマ上清またはマウスの血清を加え、一定時間、定温で反応させる。この後反応物をよく洗い一定量のＩＦＮ－γを加える。ＩＦＮ－γとして、例えばヒト末梢血リンパ球からレクチンとホルボールエステル等で誘導したＩＦＮ－γを含む培養上清等を用いることが出来る。ＩＦＮ－γを加えた後、一定時間，定温で反応させた後、反応上清中に含まれるＩＦＮ－γの活性を測定する。この様にして目的とする抗体のＩＦＮ－γ活性の吸収能を測定することが出来る。

このようにしてクローン化されたハイブリドーマは、マウス等の適切な哺乳動物の腹腔内に接種し、細胞を増殖させ、腹水を採取することにより、細胞培養上清よりも遙かに高力価の抗体を、多量に効率よく取得することが出来る。このためには、例えばマウスの場合、ミネラルオイ

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

ル等を前もつて接種したBALB／C等のマウスに1×10^4 ～1×10^7個、好ましくは5×10^5 ～2×10^6 個のハイブリドーマを腹腔内等に接種し、7～20日後、好ましくは10～14日後に腹水液等を採取する。腹水に生成蓄積した抗体は、例えば硫安分画，DEAE－セルロースカラムクロマト等により、容易にモノクローナル抗体を純粋な免疫グロブリンとして単離することが出来る。

本発明のモノクローナル抗体は、下記の性状を有する。

(1) 免疫に用いたポリペプチド（I）と結合する。

(2) IFN－γ分子と結合し、IFN－αやIFN－βとは結合しない。

(3) オクタロニー法による検定によりIgG_2b のサブクラスの抗体に属する。

(4) SDS－ポリアクリルアミドゲル電気泳動において、標準免疫グロブリンのH鎖およびL鎖に完全に一致する2本のバンドのみを示す。

なお本モノクローナル抗体は安全に製造，使用保管することができる。

本発明により得られるモノクローナル抗体は、EIA法或いはRIA法を活用することにより、生体中の、或いは試験管内での微量のIFN－γの検出に用いることが出来ることの他に、いわゆる抗体カラムを作製することにより、今迄大変困難とされていた天然の、或いは遺伝子組みかえにより作られるIFN－γを、非常に効率良く精製するのに使用することが出来る。

IFN－γの検出のためには、一例として、測定したいIFN－γを含む資料又は標準IFN－γを予め、例えば放射性ヨード又は酵素等により標識した当該モノクローナル抗体と反応させ次いで免疫複合体を沈降

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

させるべく例えばプロテインAを加え、一定時間反応させた後、免疫沈降物の放射活性又は酵素活性を測ることによりＩＦＮ－γの量を簡便に測定することが出来る。また、抗原認識部位の異なる2種のハイブリドーマクローンの産生するモノクローナル抗体を用いた場合は、いわゆるサンドウイッチ法による、より簡便なＩＦＮ－γの測定が可能となる。

ＩＦＮ－γの精製のためには、精製した当該抗体を例えばアフイゲル－１０の様な適切な担体に常法に従ってカプリングさせた後、カラムに充め、培養上清或いは破さいした菌体等の粗ＩＦＮ－γを含む資料をカラムにかけ、吸着させた後、洗浄し、その後例えばＫＳＣＮの様なカオトロピック試薬、或いはＩＦＮ－γの失活のない程度の弱酸性条件で溶出させる方法等により、効率よく精製できる。

本明細書において、アミノ酸，ペプチド，保護基，活性基，その他に関し略号で表示する場合、それらはＩＵＰＡＣ－ＩＵＢ(Commission on Biological Nomenclature による略号あるいは当該分野における慣用略号に基づくものであり、その例を次に挙げる。また、アミノ酸などに関し光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければＬ体を示すものとする。

Lys：リジン

Arg：アルギニン

Gly：グリシン

Ser：セリン

Ala：アラニン

Glu：グルタミン酸

Gln：グルタミン

Leu：ロイシン

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

Met：メチオニン

Phe：フエニルアラニン

Ile：イソロイシン

Val：バリン

Pro：プロリン

Thr：スレオニン

Z　：カルボベンゾキシ

Boc：t－ブトキシカルボニル

Mtr：4－メトキシ－2，3，6－トリメチルベンゼンスルホニル

Pme：ペンタメチルベンゼンスルホニル

OBu：t－ブチルエステル

ONB：N－ヒドロキシ－5－ノルボルネン－2，3－ジカルボキシイミドエステル

DCC：N，N'－ジシクロヘキシルカルボジイミド

DCU：N，N'－ジシクロヘキシルウレア

HONB：N－ヒドロキシ－5－ノルボルネン－2，3－ジカルボキシイミド

HOBt：N－ヒドロキシベンゾトリアゾール

CHA：シクロヘキシルアミン

DCHA：ジシクロヘキシルアミン

TEA：トリエチルアミン

TFA：トリフルオロ酢酸

MSA：メタンスルホン酸

THF：テトラヒドロフラン

DMF：ジメチルホルムアミド

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

MeOH:メタノール

AcOEt：酢酸エチル

図面の簡単な説明

図1は実施例10における本発明のモノクローナル抗体のDEAEセルロースカラムにおける溶出パターンを示し、図2は実施例10におけるモノクローナル抗体の電気泳動の結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下の実施例において、薄層クロマトグラフィーは、メルク社製シリカゲルプレート60 F_{254} 又は、フナコシ薬品社製セルロースプレート，アビセルSFを用い、下記の展開溶媒を用いた。

Rf^1：クロロホルム：メタノール：酢酸＝9：1：0.5

Rf^2：酢酸エチル：ピリジン：酢酸：水＝30：10：3：5

Rf^3：クロロホルム：メタノール：水＝7：3：0.5

Rf^4：n－ブタノール：ピリジン：酢酸：水＝30：20：6：24

Rf^5：酢酸エチル：n－ブタノール：酢酸：水＝1：1：1：1

実施例1

（i）Z-Ser-Gln-OBu^t の製造

Z-Gln-OBu^t 10.1gをメタノール500mlに溶解し、パラジウム黒を触媒に水素気流中で還元した。触媒をろ去し、溶媒を留去した残留物をZ-Ser-OH 7.5g，HONB 6.8gとともにDMF250mlに溶解し、氷冷した。氷冷下にDCC 7.15gを加え、0℃で4時間室温で12時間撹拌した。析出したDCUをろ去し、溶媒を留去ののち残留物をAcOEt 300mlに抽出し、4% $NaHCO_3$ 水，0.2N塩酸，水で洗い、無水硫酸ナトリウムで乾燥した。溶媒を留去し、析出した結晶をエーテルでろ取し、乾燥ののち CH_3CN より再結晶した。収量6.5g，収率

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

51.2%, Rf^1 0.64 mp. 97-100℃, $[\alpha]_D^{25}$ -24.1°
(c=0.40, メタノール)

元素分析 $C_{20}H_{29}O_7N_3$ として

計算値: C,56.72; H,6.90; N,9.92

実験値: C,56.21; H,6.72; N,9.76

(ii) Z-Ala-Ser-Gln-OBu^t の製造

Z-Ser-Gln-OBu^t 4.23gをメタノール300mlに溶解し、パラジウム黒を触媒に水素気流中で還元した。触媒をろ去し、溶媒を留去した残留物をZ-Ala-OH 2.34g, HOBt 2.27gとともに、AcOEt 200mlとジオキサン200ml, DMF 100mlの混合溶媒に溶解し、氷冷した。冷却下にDCC 2.38gを加え0℃で4時間、室温で12時間撹拌ののち、DCUをろ去し、溶媒を留去した。残留物にCH_3CNとエーテルを加え結晶としろ取、乾燥ののちCH_3CNより再結晶した。収量3.72g, 収率75.3%, Rf^1 0.60, mp. 165-170℃, $[\alpha]_D^{25}$ -41.2° (c=0.50, メタノール)

元素分析 $C_{23}H_{34}O_8N_4$ として

計算値: C,55.86; H,6.93; N,11.33

実験値: C,55.58; H,6.74; N,11.12

(iii) Z-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t の製造

Z-Ala-Ser-Gln-OBu^t 3.46gをメタノール300mlに溶解し、パラジウム黒を触媒に水素気流中で還元した。触媒をろ去し、溶媒を留去した残留物を、Z-Arg(Pme)-OH·CHA 4.54gから調製したZ-Arg(Pme)-OH, HOBt 1.9gとともにDMF 150mlに溶解し氷冷した。冷却下にDCC 1.9gを加え、0℃で4時間、室温で15時間撹拌した。DCUをろ去し、溶媒を留去し残留物にAcOEtを加えゲ

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

ル状の沈澱を得、ろ取した。乾燥後、メタノールとAcOEtより再沈殿した。収量4.55g，収率75.5%，Rf^1 0.57，mp. 130-134℃，$[\alpha]_D^{25}$ -24.1° (c=0.26，メタノール)

元素分析 $C_{40}H_{60}O_{11}N_8S \cdot \frac{1}{2}H_2O$ として

計算値：C,55.22; H,7.07; N,12.88; S,3.69

実験値：C,55.23; H,6.93; N,12.54; S,3.48

(Ⅳ) Z-Arg(Pme)-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t の製造

Z-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t 4.3gをメタノール400mlに溶解し、パラジウム黒を触媒に水素気流中で還元した。触媒をろ去し、溶媒を留去した残留物を、Z-Arg(Pme)-OH·CHA 3.24gより調製したZ-Arg(Pme)-OH，HOBt 1.42gとともにDMF200mlに溶解し氷冷した。冷却下にDCC 1.41gを加え0℃で4時間、室温で20時間撹拌した。DCUをろ去し、溶媒を留去した残留物にAcOEtを加え沈澱を得、ろ取した。乾燥後、メタノールとAcOEtより、再沈殿した。収量4.4g，収率71.7%，Rf^1 0.63，mp. 125-130℃，$[\alpha]_D^{25}$ -18.0° (c=0.40，メタノール)

元素分析 $C_{57}H_{86}O_{14}N_{12}S_2 \cdot H_2O$ として

計算値：C,54.96; H,7.12; N,13.50; S,5.15

実験値：C,54.66; H,6.92; N,13.32; S,5.34

(Ⅴ) Z-Arg(Pme)-Gly-OBu^t の製造

Z-Gly-OBu^t 13.0gをMeOH 500mlにとかし、Pd黒を触媒として、水素気流中、接触還元した。触媒を沪別し、沪液を減圧濃縮し、残留物をDMF200mlにとかした。これに、Z-Arg(Pme)-OH·CHA 20.0gより調製したZ-Arg(Pme)-OH，HOBt 5.4gを加えて氷冷し、DCC 8.2gを加えて48時間かき混ぜた。析出したDCU

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

を沪別し、濃縮後、AcOEt 500 mlにとかした。AcOEt 層を4% $NaHCO_3$ 水，10%クエン酸水で洗浄後、Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、石油ベンジンを加えて沈澱として沪取した。収量19.8 g (96.8 %)。mp. 71-73℃, $[\alpha]_D^{23}$ +0.2° (c=0.9, DMF), Rf^1 0.62

元素分析 $C_{31}H_{45}O_7N_5S$ として

計算値：C,58.93; H,7.18; N,11.09; S,5.08

実験値：C,59.42; H,7.58; N,10.95; S,4.84

(VI) Z-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t の製造

Z-Arg(Pme)-Gly-OBu^t 10.0 gをMeOH 500 ml中、接触還元したのち、DMF 300 mlに転溶した。これにZ-Phe-OH 4.72 g, HOBt 2.35 gを加えて氷冷し、DCC 3.59 gを加えて、15 時間かきまぜた。析出したDCUを沪別し、沪液を濃縮後、残留物をAcOEt 400 mlにとかした。AcOEt 層は、4%$NaHCO_3$ 水，10%クエン酸水で洗浄し、Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、エーテルを加えて結晶として沪取し、MeOH -エーテルより再結晶した。収量10.5 g (85.3%)。mp. 101-103℃, $[\alpha]_D^{26}$ -8.3°(c=0.9, DMF), Rf^1 0.64

元素分析 $C_{40}H_{54}O_8N_6S$ として

計算値：C,61.67; H,6.99; N,10.79; S,4.12

実験値：C,61.66; H,6.56; N,10.93; S,4.14

(VII) Z-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t の製造

Z-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t 5.5 gをMeOH 300 ml中、接触還元したのち、DMF 300 mlに転溶した。これに、Z-Leu-OH DCHA 3.31 gより調製したZ-Leu-OH, HONB 1.47 gを加えて氷

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

冷し、DCC 1.68 g を加えて48時間かきまぜた。析出したDCUを沪別し、濃縮後、AcOEt 300 mlにとかした。AcOEt 層は、4% $NaHCO_3$ 水，10%クエン酸水で洗浄し、Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、エーテルを加えて粉末として沪取した。収量6.2 g（98.3%）mp. 171-173℃，$[\alpha]_D^{26}$ -15.5°（c=0.9，DMF），Rf^1 0.64

元素分析 $C_{46}H_{65}O_9N_7S$

計算値：C,61.93; H,7.34; N,10.99; S,3.59

実験値：C,62.02; H,7.37; N,11.08; S,3.59

（Ⅷ）Boc-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t の製造

Z-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t 6.0 g をMeOH 200 ml中、接触還元したのち、DMF 150 mlに転溶した。これに、Boc-Met-OH·DCHA 3.0 g より調製したBoc-Met-OH，HONB 1.39 g を加えて氷冷し、DCC 1.59 g を加えて15時間かきまぜた。析出したDCUを沪別し、濃縮後、n-BuOH-AcOEtにとかし、10% クエン酸水で洗浄し、Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、エーテルを加えて結晶として沪取した。収量6.2 g（93.1%）。mp. 192-195℃，$[\alpha]_D^{26}$ -19.7°（c=1.0，DMF），Rf^1 0.64

元素分析 $C_{48}H_{76}O_{10}N_8S_2$ として

計算値：C,58.27; H,7.74; N,11.33; S,6.48

実験値：C,58.48; H,7.79; N,11.34; S,5.98

（Ⅸ）Boc-Gln-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OH の製造

Boc-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OBu^t 5.5 g にTFA 50 mlを加え、室温で10分間振りまぜたのち濃縮し、エーテルを加えて沪取し乾燥した。これを、DMF 50 mlにとかして氷冷し、TEA

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

1 1.8 mlを加えた。これにBoc-Gln-OH 1.85 g，HONB 1.49 g，DCC 1.90 gより調製したBoc-Gln-ONB を加え、15時間かきまぜた。濃縮後、AcOH を加え、AcOEt を加えて沈殿として沪取した。収量5.3 g（89.8 %）。mp. 181－183℃（分解），$[\alpha]_D^{26}$ －19.6°（c＝1.0，DMF），Rf^1 0.30

元素分析 $C_{49}H_{76}O_{12}N_{10}S_2$ として

計算値：C,55.45; H,7.22; N,13.20; S,6.04

実験値：C,55.39; H,7.17; N,13.34; S,6.20

（X）Z-Ser-NHNH-Boc の製造

Z-Ser-OH 10.0 g，t-ブチルカルバゼート6.2 gをDMF 150 mlにとかして氷冷し、HONB 8.0 g，DCC 9.3 gを加えて15時間かきまぜた。析出したDCUを沪別し、濃縮後、AcOEt に転溶した。AcOEt 層は、4 % $NaHCO_3$ 水，10 %クエン酸水で洗浄し、Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、エーテルを加えて結晶として沪取した。収量7.3 g （50.4 %） mp. 95－98℃，$[\alpha]_D^{26}$ －6.2°（c＝0.8，DMF），Rf^1 0.62

元素分析 $C_{16}H_{23}O_6N_3$ として

計算値：C,54.38; H,6.56; N,11.89

実験値：C,54.77; H,6.88; N,12.29

（XI）Z-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc の製造

Z-Ser-NHNH-Boc 3.9 gをMeOH 300 ml中接触還元したのち、DMF 50 mlに転溶した。これに、Z-Arg(Pme)-OH·CHA 6.2 gより調製したZ-Arg(Pme)-OH，HOBt 1.5 gを加えて氷冷し、DCC 2.3 gを加えて15時間かきまぜた。析出したDCUを沪別し、濃縮後、AcOEt にとかした。AcOEt 層は、4 % $NaHCO_3$ 水，10

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

1 5%クエン酸水で洗浄し、Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後エーテルを加えて、沈澱として沪取する。収量7.45g（93.7%）。mp.100-101℃，$[\alpha]_D^{26}$ -0.9°（c=1.2，DMF），Rf^1 0.51

元素分析 $C_{33}H_{49}O_9N_7S$ として

計算値：C,55.06; H,6.86; N,13.62; S,4.46

実験値：C,55.49; H,6.94; N,13.14; S,3.86

(XI) Z-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc の製造

Z-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc 3.9gをMeOH 300mlにとかし、接触還元したのち、DMF 50mlに転溶した。これに、Z-Lys(Mtr)-OH・DCHA 3.4gより調製したZ-Lys(Mtr)-OH，HOBt 0.88gを加えて氷冷し、DCC 1.34gを加えて20時間かきまぜた。析出したDCUを沪別し、濃縮後、AcOEt を加えて粉末として沪取し、MeOH-AcOEtより再結晶した。収量5.1g（93.4%）mp. 103-105℃，$[\alpha]_D^{26}$ -7.2°（c=0.8，DMF），Rf^1 0.57

元素分析 $C_{49}H_{73}O_{13}N_9S_2$ として

計算値：C,55.50; H,6.94; N,11.89; S,6.05

実験値：C,55.70; H,7.15; N,11.60; S,5.63

(XII) Z-Arg(Pme)-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Bocの製造

Z-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc 4.8gをMeOH 300mlにとかし、接触還元したのち、DMF 70mlに転溶した。これに、Z-Arg(Pme)-OH・CHA 2.8gより調製したZ-Arg(Pme)-OH，HOBt 0.74gを加えて氷冷し、DCC 1.12gを加えて15時間かきまぜた。析出したDCUを沪別し濃縮後、AcOEt にとかし、

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

AcOEt 層を4％ $NaHCO_3$ 水，10％クエン酸水で洗浄し、Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、エーテルを加えて沈澱として沪取し、MeOH－エーテルより再沈澱した。収量5.8 g（89.8％）。mp.136-137℃，$[\alpha]_D^{26}$ -6.6°（c = 1.0，DMF），Rf^1 0.58

元素分析 $C_{66}H_{99}O_{16}N_{13}S_3$ として

計算値：C,55.56; H,6.99; N,12.76; S,6.74

実験値：C,55.34; H,7.07; N,12.50; S,6.59

(XIV)Z-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc の製造

Z-Arg(Pme)-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc 3.0 g をMeOH 150 mlにとかし、接触還元したのち、DMF 60 mlに転溶した。これに、Z-Lys(Mtr)-OH·DCHA 1.54 g より調製した Z-Lys(Mtr)-OH，HOBt 0.31 g を加えて氷冷し、DCC 0.57 g を加えて15時間かきまぜた。析出したDCUを沪別し、濃縮後、AcOEt にとかし、AcOEt 層を4％ $NaHCO_3$ 水，10％クエン酸水で洗浄し、Na_2SO_4 で乾燥した。濃縮後、エーテルを加えて結晶として沪取し、AcOEt より再結晶した。収量2.70 g（72.8％）

mp. 123-125℃，$[\alpha]_D^{26}$ -5.9°（c = 1.1，DMF），Rf^1 0.57

元素分析 $C_{82}H_{123}O_{20}N_{15}S_4$ として

計算値：C,55.73; H,7.02; N,11.89; S,7.26

実験値：C,55.89; H,7.30; N,11.72; S,7.08

(XV)Boc-Gln-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-Arg(Pme)-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t の製造

Z-Arg(Pme)-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t 1.0 g を

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

MeOH 100 mlにとかし、接触還元したのちDMF 20 mlに転溶した。これに、Boc-Gln-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-OH 0.855 g, HOBt 135 mgを加えて氷冷し、DCC 210 mgを加えて20時間かきまぜた。析出したDCUを戸別し、濃縮後、MeOHを加えて沈澱として戸取した。収量1.506 g (87.4%)。

mp. 216-217℃(分解), $[\alpha]_D^{26}$ -11.8° (c=1.0, DMF), Rf^1 0.43

元素分析 $C_{98}H_{154}O_{23}N_{22}S_4$ として

計算値: C,55.09; H,7.27; N,14.42; S,6.00

実験値: C,54.81; H,7.33; N,14.23; S,5.79

(XVI)H-Lys-Arg-Lys-Arg-Ser-Gln-Met-Leu-Phe-Arg-Gly-Arg-Arg-Ala-Ser-Gln-OH の製造

Boc-Gln-Met-Leu-Phe-Arg(Pme)-Gly-Arg(Pme)-Arg(Pme)-Ala-Ser-Gln-OBu^t 1.0 gにTFA 10 mlを加え、室温で50分間振り混ぜたのち、濃縮し、エーテルを加えて沈澱として戸取し、乾燥した。

一方、Z-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Lys(Mtr)-Arg(Pme)-Ser-NHNH-Boc 0.83 gにTFA 10 mlを加えて室温で10分間振り混ぜたのち、濃縮し、エーテルを加えて沈澱として戸取し乾燥した。これをDMF 10 mlにとかし、ドライアイスーアセトンで冷却後、6.2 N HCl/AcOEt 0.23 ml, 亜硝酸イソアミル(0.075 ml)を加え、-25°~-20℃で20分間保つた(ヒドラジンテスト:陰性)。これを再びドライアイスーアセトンで冷却し、TEA 0.25 mlを加えて中和した。アミン成分をDMF 40 mlにとかし、氷冷しTEA 0.16 mlを加えたのち、先に調製したアジド溶液を加えて、4℃で72時間か

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

ませた。反応液を、希酢酸水にそそぎ、析出したゲルを沪取し、含水 CH_3CN で洗浄した。収量1.40g（81.5%），Rf^1 0.09。このうち400mgを0.15M MSAを含むTFA－チオアニソール－メチルスルフイド（8：1：1）60mlにとかし、室温で2時間振りませたのち、$AcONH_4$ 400mgを加えて濃縮し、エーテルを加えて沈澱として沪取し、乾燥した。これを少量の1N AcOH にとかしセファデックスG－25のカラム（2.2×120cm）に付した。1N AcOH で溶出し160ml－260mlの分画を集めて凍結乾燥し、ついでアンバーライトIRA－410（酢酸型）のカラムを通し、凍結乾燥した。これをさらにTSK－LS－410のカラム（2.14×7.5cm＋2.14×30cm）を用いるHPLCで精製し、目的物を得た。収量45mg

$[\alpha]_D^{24}$ －45.9° （c＝0.7，0.1N AcOH）

Rf^4 (cellulose) 0.20

アミノ酸分析：Lys 1.71，Arg 4.71，Ser 1.69，Glu 2.12，Gly 1.00，Ala 1.03，Met 0.32，Leu 1.30，Phe 1.08（平均回収率77%）

実施例2

キャリヤー蛋白とポリペプチド複合体の合成

実施例1（XVI）で得たポリペプチドとサイログロブリン（以下TG）との結合を、グットフレンドらの方法に準じて行なつた（サイエンス，144巻，1334頁，1964年）。即ち、当該ポリペプチド2.5mgをTG3.75mgと混合し、2mlの50mMのフオスフエートバッファーを加え、氷水中でよく撹拌した。これにカルボジイミド塩酸塩30.4mgを蒸留水200μlに溶かしたものを1滴ずつゆつくりと加えた後、3時間氷水中で撹拌しながら反応させた。反応後、蒸留水で透析を充分に

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

行ない、凍結乾燥を行なつて蛋白複合体4.7㎎を得た。

実施例3

抗体検出のための
ＥＩＡ用抗原の調製

ＥＩＡ用抗原の調製は北川らの方法（ジャーナル オブ バイオケミストリー，第79巻，233頁，1976年）の方法に準じて行つた。

(i) ポリペプチドへのマレイミド基の導入

実施例1（XVI）で得たポリペプチド（350ｎmoles）を1㎖の100ｍＭフオスフエートバツフアーpH 6.8 に溶解し、Ｎ－(4－カルボキシシクロヘキシルメチル）マレイミドのＮ－ヒドロキシサクシニミドエステル585μg（1.75μmoles）の70μℓ のＮ,Ｎ－ジメチルクロマミド溶液に加え混合し、30℃で30分撹拌して反応後、セファデツクスG－25カラムで分画を行ないマレイミド基の導入されたポリペプチド分画185ｎ moles を得た。

(ii) マレイミド基導入ポリペプチドとβ－Ｄガラクトシダーゼとの結合

実施例3(i)で得たマレイミド基導入ポリペプチド16.5ｎmoles とβ－Ｄ－ガラクトシダーゼ3.3ｎmoles を混合し、4℃で18時間反応後、412.5ｎmoles のβ－メルカプトエタノールで反応を停止させた。β－Ｄ－ガラクトシダーゼと結合したポリペプチドは、セファロース6Ｂカラムで分画を行ない、以下の実験に使用した。

実施例4

ＥＩＡ法

実施例2で得た蛋白複合体で免疫したマウス血清あるいはハイブリドーマ上清中の抗体活性の検出はＥＩＡ法を用いて行なつた（イムノファーマコロジー，第1巻，3頁，1978年）。すなわち、血清あるいはハイブリドーマ上清をバツフアーA（20ｍＭ Na_2HPO_4，100ｍＭ

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

NaCl，0.1% NaN_3，1mM $MgCl_2$，pH7.0）で希釈し、この100μgをとり、実施例3で得たポリペプチド誘導体100μgとよく混合し、24℃で24時間反応させた。反応後、ウサギ抗マウスIgGを結合した3%セルロース100μgを加えて24℃，4時間反応させた。反応後、セルロースを0.5%ツイーン20を含んだバッファーAでよく洗浄し、4－メチレンベリフエリル－β－D－ガラクトシド 20μg／mlを500μl加え、37℃で2時間反応後、100mMカーボネートバッファー（pH 10.5）を3ml加えて反応を停止し、上清中の螢光強度を螢光計で測定した（エキサイテーション365nm，エッミッション450nm）。

実施例5

免疫

7～8週令のBALB／C雌マウス6匹各々に抗原として実施例2で得た蛋白複合体の、タンパク量として、40μgをフロインドコンプリート アジュバントとよく混合し、皮下に接種した（初回免疫）。初回免疫の2週後、同量の抗原をフロインドインコンプリート アジュバントとよく混合し、皮下に接種した（二次免疫）。さらに、その2週後、二次免疫と同様の方法で三次免疫を行なつた。三次免疫の6日後、マウスから血液を部分採取し、血清中の抗体価を実施例4記載のEIA法で測定した。このうち、高い抗体価を示したマ－2マウスに対して120μgの抗原を0.5mlの食塩水に溶解させたものを静脈内に接種することにより最終免疫を行なつた。各マウスの抗体価は表1に示した。

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

表 1

免疫したマウスの抗ペプチド抗体価

マウス No.	B／T （%）		
	一次免疫 1)	二次免疫 2)	三次免疫 3)
γ-1	— 4)	N.D	24.5
2	N.D 5)	19.3	35.3
3	—	N.D	24.7
4	N.D	1.3	1.7
5	N.D	1.8	5.0
6	—	N.D	0.8
正常マウス	0.6	0.1	N.D

1）血清の希釈は1／1000

2）血清の希釈は1／6300

3）血清の希釈は1／7800

4）—：検出不可能

5）ND:検索せず

B／T：（結合した酵素活性／加えた全酵素活性）×100

実施例6

細胞融合

実施例5記載の方法で免疫を行ない、最終免疫の3日後のγ-2マウスから脾臓を摘出し、ステンレスメッシュで圧迫，沪過し、イーグルズ・ミニマム・エッセンシャルメディウム（MEM）に浮遊させ、脾臓細胞浮遊液を得た。細胞融合に用いる細胞として、BALB／Cマウス由来ミエローマ細胞P3-×63.Ag 8.U1（P3U1）を用いた（カレント トピックス イン マイクロバイオロジー アンド イムノロジ

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

－，第８１巻，１頁，１９７８年）。細胞融合は、原法（ネイチヤー，２５６巻，４９５頁，１９７５年）に準じて行なつた。即ち、脾臓細胞およびＰ３Ｕ１をそれぞれ血清を含有しないＭＥＭで３度洗浄し、脾臓細胞とＰ３Ｕ１数の比率を５：１になるよう混合して、８００回転で１５分間遠心を行なつて細胞を沈殿させた。上清を充分に除去した後、沈殿を軽くほぐし、４５％ポリエチレングリコール（ＰＥＧ）６０００（コッホライト社製）を０.３㎖加え、３７℃温水槽中で７分間静置して融合を行なつた。融合後細胞に毎分２㎖の割合でＭＥＭを添加し、合計１２㎖のＭＥＭを加えた後６００回転１５分間遠心して上清を除去した。この細胞沈殿物を１０％牛胎児血清を含有するＲＰＭＩ１６４０メディウム（ＲＰＭＩ１６４０－１０ＦＣＳ）にＰ３Ｕ１が１㎖当り2×10^{5}個になるよう浮遊し、２４穴マルチデイシユ（リンプロ社製）に１ウエル１㎖ずつ１４４ウエルに播種した。播種後、細胞を３７℃で５％炭酸ガスフラン器中培養した。２４時間後、ＨＡＴ（ヒポキサンチン１×10^{-4}Ｍ，アミノプテリン4×10^{-7}Ｍ，チミジン1.6×10^{-5}Ｍ）を含んだＰＲＭＩ１６４０－１０ＦＣＳ培地（ＨＡＴ培地）を１ウエル当り１㎖ずつ添加することにより、ＨＡＴ選択培養を開始した。ＨＡＴ選択培養は、培養開始３，５，７日後に旧液を１㎖捨てたあと、１㎖のＨＡＴ培地を添加することにより継続した。ハイブリドーマの増殖は、細胞融合後１０～１４日で認められ、培養液が黄変したとき（約1×10^{6}／㎖）、上清を採取し、ＥＩＡ法で、抗体の有無を検索した。このようにして、ハイブリドーマの増殖が認められた１４１ウエルの上清を調べたところ、２ウエル（ｒ２－１１，ｒ２－１００）に強い抗体活性，２ウエル（ｒ２－６２，ｒ２－７０）に弱い活性を認めた。

実施例７

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

1 クローニング

抗体活性が陽性を示した3ウエル（γ2－11，62，100）の各ハイブリドーマを、限界希釈法によつてクローニングを行なつた。即ちハイブリドーマが2個／mlになるようRPMI1640－20FCSに浮遊させ、96穴マイクロプレート（メンク社製）に1ウエル当り0.1mlずつ分注した。分注する際、フィーダー細胞としてBALB／Cマウスの胸腺細胞をウエル当り5×10^5個になるよう加えた。このようにして、約2週間後には細胞の増殖が認められるようになり、上清を採取して、抗体の有無を実施例4記載のEIA法で調べた。その結果、γ2－11では19クローン中8クローン，γ2－62では54クローン中3クローン，γ2－100では47クローン中5クローンに抗体活性を認めた（表2）。

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

表 2

クローン化されたハイブリドーマの抗ペプチド抗体活性

ハイブリドーマ No.	B／T （%）
r2-11	
1	68
2	31
3	63
6	68
7	67
9	69
12	42
18	60
r2-62	
14	20
16	21
34	16
r2-100	
2	69
3	70
16	56
25	80
46	33
過免疫マウス 血清	35

実施例8

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

モノクローナル抗体のＩＦＮ－γに対する結合能

モノクローナル抗体のＩＦＮ－γに対する結合能は、次の方法で検討した。即ち、ウサギ抗マウス IgG 抗体を結合させた３％セルロース懸液３００μℓに、γ２－１１，γ２－６２，γ２－１００由来のそれぞれ２～３種のクローン細胞の培養上清を各々３００μℓ 加え、室温で１８～２０時間反応させた。反応後セルロースを生理食塩水でよく洗浄し、５５０Ｕ／mℓの下記により得たＩＦＮ－γを加え、３～４時間反応させた。反応後、上清を採取し上清中のＩＦＮ－γ活性をマイクロプレートを用いた細胞変性効果（ＣＰＥ）リーデンダ法で測定した。（アプライド マイクロバイオロジー，１６巻，１７０６頁，１９６８年）。すなわち、９６穴マイクロプレート（ヌンク社製）全てのウエルに５０μℓ のＭＥＭを入れ、最初のウエルにＩＦＮサンプルを５０μℓ 加えて、連続的に２倍希釈を行なつた。このようにした各ウエルに、ＷＩＳＨ細胞を２０％ＦＣＳ含有ＭＥＭに１mℓ当り４×10^5 個になるよう調整した細胞浮遊液５０μℓ を加え、２４時間，３７℃，炭酸ガスフラン器で培養した。培養後、水泡性口内炎ウイルス（ニュージャージー株）を２０００ＴＣＩD_{50}（テイツシユーカルチユアインフエクテイングドーズ５０）になるようＭＥＭで調整し、その５０μℓ を各々のウエルに加え、３７℃，炭酸ガスフラン器内で培養した。約３５時間後、ＩＦＮサンプルを加えていないウエルの細胞が１００％ＣＰＥを起こした時点で、各ウエルのＣＰＥを顕微鏡で観察し、５０％のＣＰＥを起こしているウエルのＩＦＮ－サンプルの希釈数の逆数をもつてＩＦＮの力価とした。

ＩＦＮ－γサンプルとして用いたものは、ヒト末梢血リンパ球を、コンカナバリンＡ４０μg ／mℓと１２－Ｏ－テトラデカノイルホルボール－１３アセテート１５ng ／mℓで刺激して７２時間後に採取した上清で、

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

この培養上清1㎖中にはヒトＩＦＮ－γ（酸，ｐＨ処理に不安定）を４４００ユニット含有していた。もし、クローン細胞の培養上清中にＩＦＮ－γに対して結合能を持つ抗体が存在していれば、後で加えたＩＦＮ－γ活性は、セルロース上の抗体に結合し、上清中の活性は低減される筈である。結果は、γ２－１１のクローンの上清中に比較的強いＩＦＮ－γ結合能が認められ、加えたＩＦＮ－γ（５５０Ｕ／㎖）の５０～７５％が抗体に結合した（表３）。

表　3

モノクローナル抗体によるＩＦＮ－γ活性の吸収能

ハイブリドーマ培養上清液	残存IFN活性（U／㎖）	
	実験1	実験2
γ2－11．1	138	275
γ2－11．2	207	N．D．
γ2－11．6	N．D．	275
γ2－62．2	275	550
γ2－62．3	275	550
γ2－100．2	550	N．D．
γ2－100．3	550	N．D．
—	550	550

実施例9

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの腹水化

ＩＦＮ－γに対して結合能を示す抗体を産生するγ２－１１．１クローン 細胞1×10^{6} 個を、あらかじめ0.5㎖のミネラルオイルを腹腔内に投与しておいたＢＡＬＢ／Ｃマウスの腹腔内に接種することにより腹

BUREAU OMPI WIPO

水化を行つた。ハイブリドーマを腹腔に投与して10日後、腹水を採取して抗体価をEIA法で測定したところ、10^7 倍希釈まで抗体活性を示した。なお、当該クローン細胞の培養上清中の抗体活性は、10^4 倍希釈まで認められているが、腹水化することにより約1000倍程度抗体活性が上昇した。

実施例10

モノクローナル抗体の精製

実施例9で得られた腹水4mlを出発材料として、ステーリンら（ジャーナル オブ バイオロジカルケミストリー，256巻，9750頁，1981年）の方法に準じてモノクローナル抗体を精製した。まず腹水からフイブリン様物質を除去するため10,000回転15分間遠心した後、リン酸緩衝液－食塩水（PBS：8.1mM-NaH_2PO_4，1.5mM KH_2PO_4，2.7mM KCl，137mM NaCl，pH7.2）で280nmの紫外部吸収（A_{280}）が12～14の値を示す濃度に希釈した。希釈後サンプルに飽和硫酸アンモニウム溶液を47%の濃度になるように加え、4℃で撹拌しながら60分間塩析を行ない、その後遠心（10,000回転，15分間）を行なつて沈澱物を得た。沈澱物を50mM NaCl含有20mMトリス緩衝溶液（pH7.9）に溶解し、同溶液2lに対して透析を行なつた。2時間後、2lの新しい同じ透析液に換え、さらに15時間透析を行なつた。透析後、沈澱を除去するため10,000回転15分間遠心を行ない、上清をA_{280} の値が20～30の濃度になるように調整した。このサンプルを充分量の50mM－NaCl 含有トリス緩衝溶液で平衡化した8mlのDEAEセルロースカラム（ワットマンDE$_{52}$）にかけ、50mM NaCl含有トリス緩衝溶液を用いて1.5ml/分の流出速度で分画を行なつた。この条件下では、抗体活性は主として

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

1 素通り分画に認められた（図１）。抗体の確認にはラエムリらの方法（ネイチャー，第２２７巻，６８０頁，１９７０年）に準じてＳＤＳ－ポリアクリルアミドゲル電気泳動（ＳＤＳ－ＰＡＧＥ）法を用いた。すなわち、硫安塩析－ＤＥＡＥセルロースカラムで分画したいくつかのフラクションを、各々２－メルカプトエタノールで還元を行ない１７％ＳＤＳゲル,３０ボルト,２４時間泳動を行なつた。その結果、抗体活性に一致して、分子量約５５キロダルトン前後にＨ鎖、約２８キロダルトン前後にＬ鎖の２つのバンドが認められた（図２）。このように精製された抗体フラクション１７がＩＦＮ－γに対して、結合能を示すかどうかを実施例８の方法に従つてＩＦＮ－γ　２２００Ｕ／mlを加えて検索したところ、ＩＦＮ－γの約５０％が抗体に結合性を示すことが判明した（表４）。

表　４

サンプル	希釈	残存IFN-活性（U/ml）
γ2-11.1フラクション17	10^{-1}	１１００
	10^{-2}	１１００
	10^{-3}	２２００
	10^{-4}	２２００
抗IgEモノクローナル抗体	10^{-1}	２２００
	10^{-2}	２２００
	10^{-3}	２２００
	10^{-4}	２２００

実施例１１

モノクローナル抗体の属するサブクラス

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

本発明のモノクローナル抗体の属するIgGサブクラスは、実施例10の方法で精製したフラクション17を10倍に希釈し、ヤギ抗マウスIgG1，G2a，G2b，G3抗体（マイルス社）との寒天内沈降反応法（オクタロニー法：イムノロジカルメソッド ~~エンザイ~~ ゲルーデイフユージョン テクニック，ブラックウエル，オックスフオード，1964年）で検討した。結果は、モノクローナル抗体とヤギ抗マウスIgG2b抗体との間に著明な1つのバンドが認められ、他の抗抗体との間には、バンドの形成はみられなかつた。従つて、当該モノクローナル抗体は、IgG2bに属するものであることが判明した（表5）。

表 5

モノクローナル抗体の属するサブクラス

抗　原	抗　体	沈降線の有無
本発明のモノクローナル抗体（fr. 17）	抗IgG1	−
同	抗IgG2a	−
同	抗IgG2b	+
同	抗IgG3	−

産業上の利用可能性

本発明の新規ポリペプチドを使用してヒトγ型インターフエロンに結合するモノクローナル抗体を製造することができる。該モノクローナル抗体は、ヒトγ型インターフエロンの検出，精製に有用である。

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

請 求 の 範 囲

1. 式

H-X-(M)Lys Arg Ser Gln Met Leu Phe Arg(C) Gly-Y-OH

〔式中、Xは結合手または (M)Ile Gln Val Met Ala Glu Leu Ser Pro Ala Ala Lys Thr Gly Lys Arg(C) で示されるペプチド鎖のC末端から(において)そ アミノ酸数1～16個の(教えて) ペプチド(を有する)もしくはアミノ酸残基を示し、Yは(M)Arg Arg Ala Ser Gln(C) で示されるペプチド鎖のN末端から(において)そ アミノ酸数1～5個の(教えて) ペプチド(を有する)もしくはアミノ酸残基を示す〕で表わされるポリペプチド。

2. YがArg Arg Ala Ser Gln である請求の範囲第1項記載のポリペプチド。

3. XがLys Arg である請求の範囲第1項または第2項記載のポリペプチド。

4. 請求の範囲第1項～第3項記載のポリペプチドとキャリヤー蛋白とを化学結合させた複合体。

5. キャリヤー蛋白が牛サイログロブリンである請求の範囲第3項記載の複合体。

6. 請求の範囲第1項～第5項記載のポリペプチドまたはその蛋白複合体で免疫した哺乳動物の脾臓細胞と同種または異種のリンパ球様細胞とからなるクローン化されたハイブリドーマ。

7. 哺乳動物がマウスである請求の範囲第6項記載のハイブリドーマ。

8. リンパ球様細胞がミエローマである請求の範囲第6項記載のハイブリドーマ。

9. 請求の範囲第1項～第3項記載のポリペプチドに対するモノクローナル抗体。

BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

10. ヒトγ型インターフエロンと結合する請求の範囲第9項記載のモノクローナル抗体。

11. オクタロニー法による検定によりIgG2bのサブクラスに属する請求の範囲第9項記載のモノクローナル抗体。

12. 請求の範囲第6項記載のハイブリドーマを哺乳動物に接種し、モノクローナル抗体を生成蓄積せしめ、これを採取することを特徴とするモノクローナル抗体の製造法。

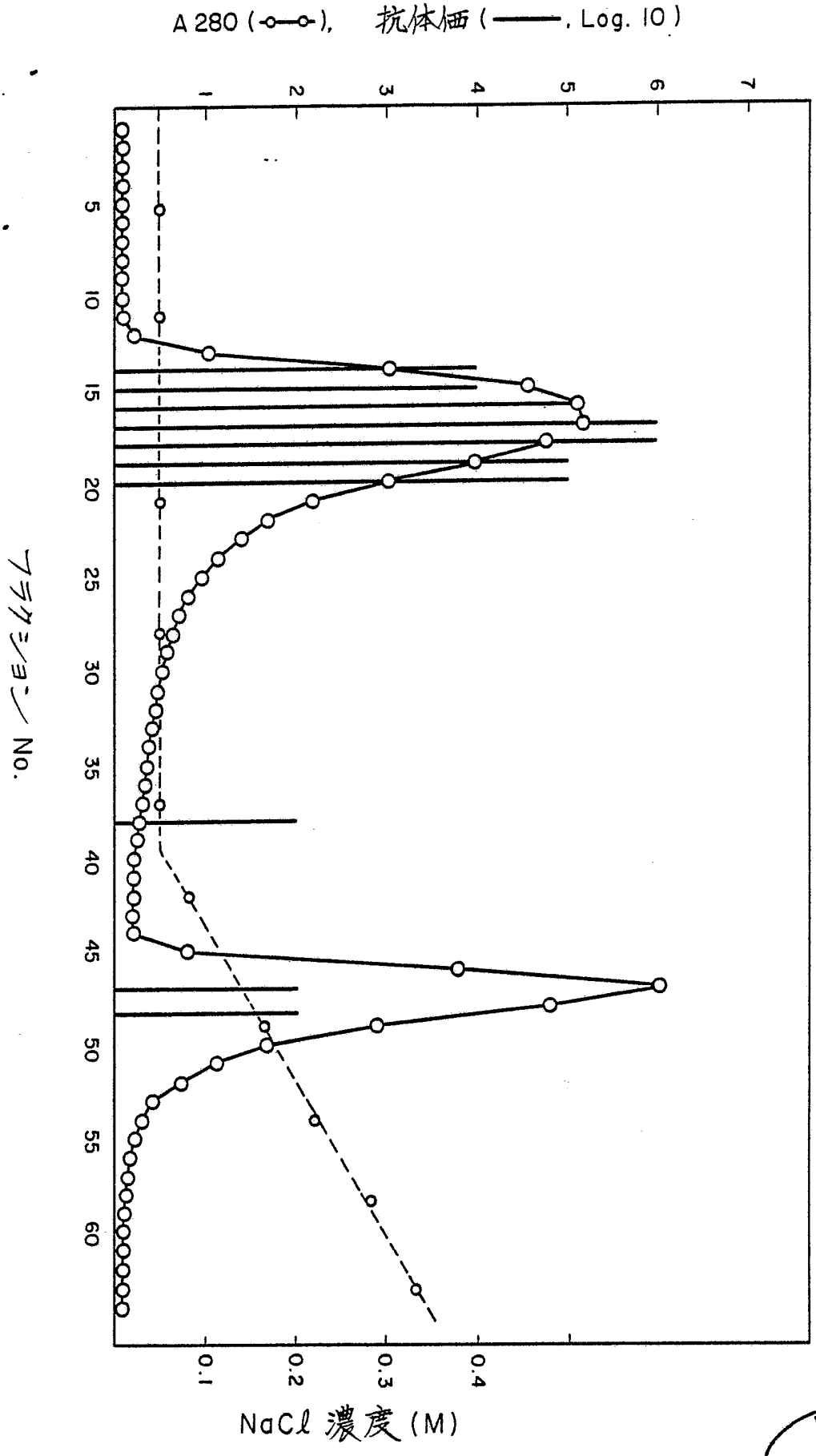
13. 哺乳動物がマウスである請求の範囲第12項記載の製造法。

14. 粗ヒトγ型インターフエロン含有物を、請求の範囲第9項～第11項記載のモノクローナル抗体を用いて作成した抗体カラムで処理することを特徴とするヒトγ型インターフエロンの精製法。

15. 抗体として請求の範囲第9項～第11項記載のモノクローナル抗体を用いることを特徴とするラジオイムノアッセイ法またはエンザイムイムノアッセイ法によるヒトγ型インターフエロンの検出法。

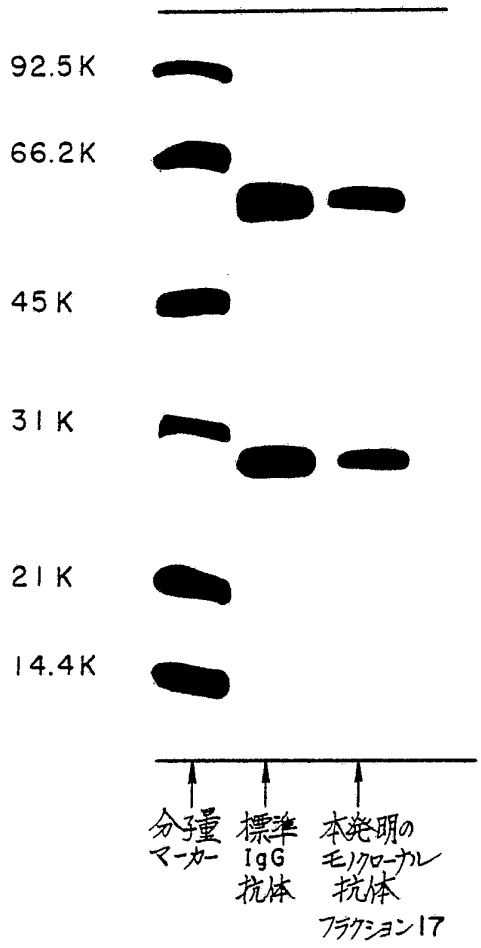
BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

図 1



BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

図 2



BUREAU OMPI WIPO INTERNATIONAL

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No. PCT/JP82/00381

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) [3]

According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC

Int. Cl.[3] C07C 103/52, C07G 7/00, A61K 39/00-39/44, 45/02, 37/00, 37/02, C12N 5/00, C12P 21/00, G01N 33/54

II. FIELDS SEARCHED

Minimum Documentation Searched [4]

Classification System	Classification Symbols
I P C	C07C 103/52, C07G 7/00 A61K 39/00-39/44, 45/02, 37/00, 37/02
	Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched [5]

III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT [14]

Category*	Citation of Document, [16] with indication, where appropriate, of the relevant passages [17]	Relevant to Claim No. [18]
A	Mikolos Boanszky et al. "Peptide Synthesis (Second Edition)" (1976) John Wiley & Sons, Inc. (New York)	1 - 5
A	Nature, Vol. 295, No. 11 11. February. 1982 (11. 02. 1982) P. 503-508	1 - 5

* Special categories of cited documents: [15]

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

IV. CERTIFICATION

Date of the Actual Completion of the International Search [2]	Date of Mailing of this International Search Report [2]
December 13, 1982 (13.12.82)	December 20, 1982 (20.12.82)
International Searching Authority [1]	**Signature of Authorized Officer** [20]
Japanese Patent Office	

国 際 調 査 報 告

国際出願番号PCT/JP 82 / 00381

Ⅰ. 発明の属する分野の分類

国際特許分類(IPC)

Int. Cl³ C07C 103/52, C07G 7/00, A61K 39/00 — 39/44, 45/02, 37/00, 37/02, C12N 5/00, C12P 21/00, G01N 33/54

Ⅱ. 国際調査を行った分野

調 査 を 行 っ た 最 小 限 資 料

分類体系	分類記号
IPC	C07C 103/52, C07G 7/00 A61K 39/00—39/44, 45/02, 37/00, 37/02

最小限資料以外の資料で調査を行ったもの

Ⅲ. 関連する技術に関する文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	Mikolos Boanszky他「Peptide Synthesis (第2版)」(1976) John Wiley & Sons, Inc. (New York)	1 — 5
A	Nature, 第295巻11号 11.2月. 1982(11.02. 1982) P.503—508	1 — 5

*引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「T」国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリーの文献

Ⅳ. 認 証

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
13.12.82	20.12.82

国際調査機関	権限のある職員
日本国特許庁 (ISA/JP)	4H 2104 特許庁審査官 松田一弘

第2ページから続く情報

V. ☐ 一部の請求の範囲について国際調査を行わないときの意見

次の請求の範囲については特許協力条約に基づく国際出願等に関する法律第8条第3項の規定によりこの国際調査報告を作成しない。その理由は、次のとおりである。

1. ☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿は、国際調査をすることを要しない事項を内容とするものである。

2. ☐ 請求の範囲＿＿＿＿＿は、有効な国際調査をすることができる程度にまで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。

VI. ☑ 発明の単一性の要件を満たしていないときの意見

次に述べるようにこの国際出願には二以上の発明が含まれている。

特許請求の範囲第1～5項はペプチドおよびその蛋白複合体、同第6～8項はハイブリドーマ、同第9～13項はモノクローナル抗体およびその製造法、同第14項はインターフエロンの精製法、同第15項はインターフエロンの検出法に関するものである。そして、これら5つの発明群が、単一の一般的発明概念を形成するよう連関する一群の発明であるとは認められない。

1. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されたので、この国際調査報告は、国際出願のすべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に一部分しか納付されなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付があった発明に係る次の請求の範囲について作成した。
   請求の範囲＿＿＿＿＿
3. ☑ 追加して納付すべき手数料が指定した期間内に納付されなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲に最初に記載された発明に係る次の請求の範囲について作成した。
   請求の範囲 **1－5**
4. ☐ 追加して納付すべき手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加して納付すべき手数料の納付を命じなかった。

追加手数料異議の申立てに関する注意

☐ 追加して納付すべき手数料の納付と同時に、追加手数料異議の申立てがされた。

☐ 追加して納付すべき手数料の納付に際し、追加手数料異議の申立てがされなかった。