



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 5 C12P 21/08, C12N 15/13, 15/62 // (C12P 21/08, C12R 1:91)		A1	(11) 国際公開番号 WO 94/02627
			(43) 国際公開日 1994年2月3日 (03.02.1994)
(21) 国際出願番号 PCT/JP93/00941		(74) 代理人 弁理士 有賀三幸, 外 (ARUGA, Mitsuyuki et al.) 〒103 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番6号 共同ビル Tokyo, (JP)	
(22) 国際出願日 1993年7月8日 (08. 07. 93)		(81) 指定国 AT (欧州特許), AU, BE (欧州特許), CA, CH (欧州特許), DE (欧州特許), DK (欧州特許), ES (欧州特許), FR (欧州特許), GB (欧州特許), GR (欧州特許), IE (欧州特許), IT (欧州特許), KR, LU (欧州特許), MC (欧州特許), NL (欧州特許), PT (欧州特許), SE (欧州特許), US.	
(30) 優先権データ 特願平4/189248 1992年7月16日 (16. 07. 92) JP		(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 平井嘉勝 (HIRAI, Yoshikatsu) [JP/JP] 〒565 大阪府吹田市清水6-1-403 Osaka, (JP) オウエンズ レイモンド ジョン (OWENS, Raymond John) [GB/GB] アールジー 9 1 エスエッチ オックスフォード州 ヘンリー・オン・テムズ ハミルトン アベニュー-23 Oxfordshire, (GB) 大本安一 (OMOTO, Yasukazu) [JP/JP] 〒771-02 徳島県板野郡松茂町篠木野字八下35-6 Tokushima, (JP) 西田 勉 (NISHIDA, Tsutomu) [JP/JP] 〒772 德島県鳴門市大津町大代245-1 Tokushima, (JP)	
		添付公開書類 国際調査報告書	

(54) Title : RECOMBINANT ANTIBODY AGAINST HUMAN INTERLEUKIN-1

(54) 発明の名称 ヒトインターロイキン-1に対する組換え抗体

(57) Abstract

A chimeric antibody against human IL-1, and other human-mouse chimeric and reshaped antibodies, wherein the L chain has the constant region of human antibody molecules and the variable region of mouse antihuman IL-1 antibody molecules having the amino acid sequence described in the sequence identification no. 1 and the H chain has the constant region of human antibody molecules and the variable region of mouse antihuman IL-1 antibody molecules having the amino acid sequence described in the sequence identification no. 2. This antibody is utilizable in treating various diseases accompanied by the abnormal production of IL-1 and conducting diagnostic imaging of IL-1 producing sites in the body.

(57) 要約

L鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：1に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子の可変部領域とを有し且つH鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：2に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子の可変部領域とを有するヒトIL-1に対するキメラ抗体、その他のヒト・マウスキメラ乃至リシェイプト抗体。

本発明抗体を利用することにより、特にIL-1の異常産生を伴う各種疾患の治療や体内IL-1産生部位等の画像診断を行なうことができる。

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	CS チェコスロバキア	KR 大韓民国	PL ポーランド
AU オーストラリア	CZ チェコ共和国	KZ カザフスタン	PT ポルトガル
BB バルバードス	DE ドイツ	LI リヒテンシュタイン	RO ルーマニア
BE ベルギー	DK デンマーク	LK スリランカ	RU ロシア連邦
BF ブルキナ・ファソ	ES スペイン	LU ルクセンブルグ	SD スーダン
BG ブルガリア	FI フィンランド	LV ラトヴィア	SE スウェーデン
BJ ベナン	FR フランス	MC モナコ	SI スロヴェニア
BR ブラジル	GA ガボン	MG マダガスカル	SK スロヴァキア共和国
BY ベラルーシ	GB イギリス	ML マリ	SN セネガル
CA カナダ	GN ギニア	MN モンゴル	TD チャーチード
CF 中央アフリカ共和国	GR ギリシャ	MR モーリタニア	TG トーゴ
CG コンゴー	HU ハンガリー	MW マラウイ	UA ウクライナ
CH スイス	IE アイルランド	NE ニジェール	US 米国
CI コート・ジボアール	IT イタリー	NL オランダ	UZ ウズベキスタン共和国
CM カメルーン	JP 日本	NO ノルウェー	VN ベトナム
CN 中国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NZ ニュージーランド	

明細書

ヒトインターロイキン-1に対する組換え抗体

技術分野

本発明はIL-1(インターロイキン-1)に対する抗体、殊にヒト・マウス組換え抗体に関する。

背景技術

IL-1は、1972年にゲリー(Gery)らによりヒト単球培養上清中に存在するマウス胸腺細胞増殖促進因子として報告された[Gery, I. et al., J. Exp. Med., 139, 128(1972)]。また該IL-1は単球やマクロファージをはじめケラチノサイト、NK細胞、T細胞、B細胞、血管内皮細胞、好中球など多くの細胞から産生され、多くの細胞に作用し、多種多様の生物活性を示し、免疫、炎症、造血、内分泌、脳神経、生体恒常性など生体における反応にかかわっていることが報告されている[Oppenheim, J. J. et al., Immunol. Today, 7, 45(1986)]。動物種を問わず、IL-1はアミノ酸270前後、分子量30KDの前駆体としてmRNAから翻訳され、該前駆体はアミノ酸110番台で切断されて最終的にはC末端側約150個のアミノ酸からなる17KDの成熟型となる。また、IL-1はその等電点の違いによって α 型($pI=5$)と β 型($pI=7\sim8$)の2つの型に分類されており、それらの一次構造も明らかにされ、さらにはそのポリペプチドもしくはその前駆体をコードする遺伝子の存在も報告されている[Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 7907-7911(1984); Nature, 315, 641(1985); J. Exp. Med., 164, 237(1986); Nuc. Acids Res., 13(16) 5869(1985)]。

上記報告によれば、ヒトIL-1 α は159個のアミノ酸からなり、ヒトIL-1 β は153個のアミノ酸からなると記されている。上記IL-1については、抗腫瘍剤や血小板減少改善剤などの医薬品としての応用が種々研究されている一方で、IL-1の異常産生を伴う各種疾患、例えば慢性関節リウマチ(RA)、甲状腺炎、肝炎、腎炎等の慢性炎症性疾患、動脈硬化、川崎病(MCLS)等の

血管炎、汎発性血管内凝固症候群（D I C）、血液ガン等において、その異常産生も報告されており、これらの各疾患においては、亢進した I L - 1 の生物活性を抑制乃至中和するための医薬としての抗 I L - 1 抗体の開発が望まれている。本出願人らも先に I L - 1 α 及び I L - 1 β のそれぞれに特異反応性を有するヒト I L - 1 に対するマウスモノクローナル抗体を開発し、該抗体に係わる発明を特許出願した〔特開昭 63 - 258595 号公報参照〕。

しかし、1975年にマウスの抗体産生細胞と骨髓腫細胞とを融合させた細胞の増殖法によるモノクローナル抗体の作製法が確立されて以来、今日までに上記出願にかかわる抗体に限らず、多くのモノクローナル抗体が作製されてきており [Kohler G. & Milstein C., Nature, 256, 495(1975)]、今日、特に医学の分野においてこれらのモノクローナル抗体は、インビオ診断、インビトロ診断、さらに治療への応用が試みられるようになってきている。しかるに、ヒトへの投与を考慮した場合、これらのマウス由来のモノクローナル抗体よりも、ヒト由来のモノクローナル抗体のほうが、抗体自体の抗原性や抗体の免疫活性の面から、当然に好ましいと考えられ、従って、近年ヒト型モノクローナル抗体の作製も試みられつつあるが、ヒト・ヒト融合細胞は、マウスにおける骨髓腫細胞株のような優れた融合のパートナーがないことや、人道的な面でおかなり多くの問題を有している。

そこで、これらの問題を解決するために、抗体の抗原結合活性を有する可変部（V）領域をマウスハイブリドーマ由来とし、且つ免疫活性を有する定常部（C）領域をヒト由来とした組換え抗体、所謂キメラ抗体の作製が遺伝子組換え技術を用いて試みられ、1984年のモリソン（Morrison）以来、さまざまな特異性をもつキメラ抗体が作製されてきた [Morrison S. L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851(1984) : Sharon J. et al., Nature, 309, 364(1984) : Neuberger, M. S. et al., Nature, 312, 604(1984) : Boulianne, G. L. et al., Nature, 312, 634(1984) 等参照]。

更に、上記キメラ抗体は、そのV領域がなおマウス 100%のままであり、抗原性が残っているため、該部分でのヒトへの抗原性をも低減させるために、最近、上記V領域の相補性決定領域（CDR）のみをマウス由来とした組換え抗体、即

リシェイプト抗体（Reshaped抗体）の作製も試みられている [Jones, P. T. et al., *Nature*, 321, 522(1986) : Riechmann L. et al., *Nature*, 332, 323 (1988)]。このような抗体を発現させるための遺伝子、即ちヒト抗体のDNA配列の一部をマウス抗体のDNA配列と置換させた組換え遺伝子の創製を以下「ヒト・マウスグラフト」といい、またかくして得られる組換え遺伝子を「リシェイプト遺伝子」という。

上記のようにキメラ抗体やリシェイプト抗体等の組換え抗体は従来報告されているが、ヒトIL-1に対するこれら組換え抗体についての報告は未だにない。

従って、本発明の目的は上記ヒトIL-1に対するキメラ抗体、リシェイプト抗体及びこれらの組合せ抗体（以下これらを総称して「組換え抗体」という）を提供することにある。

また本発明の目的はヒトIL-1の免疫学的測定法に利用できるヒトIL-1に対する組換え抗体を提供することにある。

また本発明の他の目的はIL-1の異常産生を伴う各種疾患において、該IL-1の作用を抑制乃至中和を目的として投与適用され得る医薬品としてのヒトIL-1に対する組換え抗体を提供することにある。

また本発明の他の目的はヒトに対する抗原性が低く、ヒトへの投与適用によって、体内におけるIL-1産生部位やその特定等の画像診断を行ない得る標識された上記組換え抗体を提供することにある。

更に本発明の他の目的は上記組換え抗体の製造技術を提供することにある。

発明の開示

本発明によれば、（1）L鎖がヒト抗体分子のC領域と配列番号：1に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のV領域とを有し、且つH鎖がヒト抗体分子のC領域と配列番号：2に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のV領域とを有するヒトIL-1に対する組換え抗体、（2）L鎖がヒト抗体分子のC領域と配列番号：3に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域とを有し、且つH鎖がヒト抗体分子のC領域と配列番号：2に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒト

IL-1抗体分子のV領域とを有するヒトIL-1に対する組換え抗体、(3) L鎖がヒト抗体分子のC領域と配列番号：1に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のV領域とを有し、且つH鎖がヒト抗体分子のC領域と配列番号：4に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域とを有するヒトIL-1に対する組換え抗体、及び(4)L鎖がヒト抗体分子のC領域と配列番号：3に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域とを有し、且つH鎖がヒト抗体分子のC領域と配列番号：4に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域とを有するヒトIL-1に対する組換え抗体が提供される。

本発明によれば、マウス抗ヒトIL-1抗体L鎖のV領域(V_L)をコードする配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNA、マウス抗ヒトIL-1抗体H鎖のV領域(V_H)をコードする配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNA、マウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフト抗体L鎖のV領域(V_L)をコードする配列番号：3で表わされる塩基配列を有するDNA、及びマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフト抗体H鎖のV領域(V_H)をコードする配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNAが提供される。

更に本発明によれば、ヒト抗体分子のC領域をコードするDNAと配列番号：1に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のV領域をコードするDNAとを有する組換え抗ヒトIL-1抗体L鎖発現ベクター、例えばpAC53、ヒト抗体分子のC領域をコードするDNAと配列番号：2に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のV領域をコードするDNAとを有する組換え抗ヒトIL-1抗体H鎖発現ベクター、例えばpAC52及びpAC77、ヒト抗体分子のC領域をコードするDNAと配列番号：3に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域をコードするDNAとを有する組換え抗ヒトIL-1抗体L鎖発現ベクター、例えばpAL31、及びヒト抗体分子のC領域をコードするDNAと配列番号：4に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体のCDR領域を含むヒト・マウ

スグラフトV領域をコードするDNAとを有する組換え抗ヒトIL-1抗体H鎖発現ベクター、例えばpAL34が提供される。

また本発明は、ヒト抗体分子のC領域と配列番号：3に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域とを有する組換え抗ヒトIL-1抗体L鎖をコードするDNA、及びヒト抗体分子のC領域と配列番号：4に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域とを有する組換え抗ヒトIL-1抗体H鎖をコードするDNAを有する組換え抗ヒトIL-1抗体発現ベクター、例えばpAC79をも提供するものである。

本発明組換え抗体は、ヒトIL-1に特異反応性を有するものであり、これはヒトIL-1を高感度、高精度でしかも簡便に測定可能な新しい免疫検定法（イムノアッセイ法）やアフィニティクロマトグラフィー等の手法によるヒトIL-1の特異的精製技術に有利に利用できる。

殊に、本発明組換え抗体は、上記特異性に加えて、ヒトに対する抗原性が低いという特徴を有しており、従ってこれはヒト体内への投与適用に適している。

また本発明組換え抗体には、ヒトIL-1の生物活性に対して中和活性を有するタイプの抗体が含まれ、かかる抗体は、IL-1の異常産生を伴う各種の疾患、例えば慢性関節リウマチ、甲状腺炎、肝炎、腎炎等の慢性炎症性疾患、動脈硬化、川崎病等の血管炎、汎発性血管内凝固症候群、血液ガン等において、その異常産生に基づく亢進されたIL-1の生物活性を抑制乃至中和するために有用であり、本発明はかかる各種疾患の治療上極めて価値ある医薬を提供することができる。

更に、本発明組換え抗体を標識して得られる標識組換え抗体は、これをヒト体内に投与適用することによって、体内におけるIL-1産生部位やその特定等の画像診断が可能であり、本発明によればかかる画像診断法をも提供することができる。

図面の簡単な説明

図1は、マウスH鎖cDNAクローンpIL068の概略図である。

図2は、マウスL鎖cDNAクローンpIL086の概略図である。

図3は、キメラH鎖IgG₄ANOC-301発現ベクターpAC52及びキメラH鎖IgG₁ANOC-301発現ベクターpAC77作製の概略図である。

図4は、プライマーR2391(フォワード・プライマー)及びR2390(リバース・プライマー)のDNA配列を示す。

図5は、ベクターpAC52の特徴及び制限酵素地図を示す。

図6は、キメラL鎖ANOC-301発現ベクターpAC53作製の概略図である。

図7は、プライマーR2429(フォワード・プライマー)及びR2430(リバース・プライマー)のDNA配列を示す。

図8は、発現ベクターpAC53の特徴及び制限酵素地図を示す。

図9は、CDR-グラフトL鎖ANOC-301発現ベクターpAL31作製の概略図である。

図10は、ヒト・マウスグラフトV_L遺伝子のDNA配列及び対応するアミノ酸配列を示す。

図11は、発現ベクターpAL31の特徴及び制限酵素地図を示す。

図12は、CDR-グラフトH鎖IgG₄ANOC-301発現ベクターpAL34作製の概略図である。

図13は、ヒト・マウスグラフトV_H遺伝子のDNA配列及び対応するアミノ酸配列を示す。

図14は、発現ベクターpAL34の特徴及び制限酵素地図を示す。

図15は、CDR-グラフトANOC-301発現ベクターpAC79作製の概略図である。

図16は、CDRグラフトL鎖遺伝子構築のためのオリゴヌクレオチドのDNA配列を示す。

図17は、CDRグラフトL鎖遺伝子のBstBI-SpI間のDNA配列及び対応アミノ酸配列を示す。

図18は、CDRグラフトL鎖遺伝子構築のためのオリゴヌクレオチドのDNA配列を示す。

図19は、CDRグラフトH鎖遺伝子構築のためのオリゴヌクレオチドのDNA配列を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明組換え抗体の製造法につき詳述する。

まずマウス抗ヒトIL-1モノクローナル抗体産生細胞由来の抗体を利用して、該抗体のcDNAライブラリーを構築し、そのH鎖（重鎖、heavy-chain）及びL鎖（軽鎖、light-chain）の各可変部領域（V領域）をコードするDNA配列をそれぞれ再配列させた遺伝子をクローニングし、プロモーター領域及びエンハンサー領域などを考慮して、これらをそれぞれヒト由来の抗体の定常部領域（C領域）をコードするDNA配列と結合させて組換え遺伝子（キメラ遺伝子）を作製するか、又は上記マウス抗ヒトIL-1モノクローナル抗体のH鎖及びL鎖をコードするDNA配列のV領域中の相補性決定領域（CDR）を含むようにヒト由来の抗体のV領域を修飾したDNA塩基配列を作製し、かくして得られるマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域をコードするDNA塩基配列を、ヒト由来の抗体のC領域をコードするDNA配列と結合させて組換え遺伝子（リシェイプト遺伝子）を作製する。

このようにして作製されたH鎖及びL鎖のそれぞれのキメラ乃至リシェイプト遺伝子を、単独で又は2種組合せて適当なベクターに組込んで、各遺伝子の発現ベクターを作製し、これらベクターを適当な細胞に導入して上記各遺伝子を発現させることにより、所望の本発明組換え抗体を得ることができる。

本発明に用いるマウス抗ヒトIL-1モノクローナル抗体産生細胞は、ヒトIL-1を免疫原として、或いは遺伝子組換え技術に従い製造される組換え型ヒトIL-1を免疫原として、通常のモノクローナル抗体の製造法に従い作製することができる。該マウス抗ヒトIL-1モノクローナル抗体産生細胞の具体例としては、例えば特開昭63-258595号公報に記載の、ヒトIL-1 α 及びヒトIL-1 β のそれぞれに対する抗体産生ハイブリドーマを例示できる。これらのハイブリドーマはいずれも工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託されている。即ち上記ヒトIL-1 α に対する抗体産生ハイブリドーマは、

KOCO301 (FBRM BP-1554) として、ヒトIL-1 β に対する抗体産生ハイブリドーマは、KOCO203 (FBRM BP-1551)、KOCO205 (FBRM BP-1552)、KOCO206 (FBRM BP-1553) として寄託されている。

これらのハイブリドーマは、以下の如き遺伝子調製を行なうことによって、本発明組換え抗体の製造に利用することができる。即ち、本発明抗体のV領域をコードする遺伝子断片としては、上記のようなマウス抗ヒトIL-1モノクローナル抗体産生細胞より分離され、解析された遺伝子配列を用いることができる。目的のマウス抗ヒトIL-1抗体に特異的なV領域をコードする遺伝子 (V_L 及び V_H) の単離及びクローニングは、主として2種の方法に従い実施することができる。

その一つとしては、抗体産生細胞の染色体DNAを適当な制限酵素により消化させた後、ショ糖密度勾配遠心法により分画し、ファージベクターームにライゲーションさせて、インピトロパッケージング法等に従って、染色体ライブラリーから、H鎖及びL鎖のそれぞれの3'末端側プローブを用いて、サザンハイブリダイゼーション法等を実施して、所望抗体のV領域遺伝子をクローニングする方法を挙げることができる。この方法はより詳しくは、例えばオイらの方法を参考して実施することができる [Vernon T. Oi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 80, 825(1983)参照]。

もう一つの方法としては、マウス抗ヒトIL-1抗体産生細胞から常法に従いmRNAを抽出し、cDNAライブラリーからスクリーニングする方法 [M. S. Neuberger, EMBO J., 2, 1373(1983)] を採用して、上記cDNAライブラリーからV領域遺伝子をクローニングするためのプローブを、すでに報告されているマウス免疫グロブリン遺伝子の塩基配列 [例えば、E. E. Max et al., J. Biol. Chem., 256, 5116(1981)] 等を参考にして、マウスの免疫グロブリン(Ig)のH鎖とL鎖のC領域に相補的な2つのスクリーニング用DNAプローブを合成し、スクリーニングする方法を例示できる。

該プローブは市販の自動オリゴヌクレオチド合成機により容易に合成でき、さらにT4ポリヌクレオチドキナーゼを用いて、[γ -³²P]ATP等を用いて、その5'末端を標識することができる。

この後者の方針におけるクローニングは、抗体産生細胞よりポリ(A)⁺RNAを得た後、グブラーとホフマン [Gubler, U. & Hoffman, B., Gene, 25, 263-268(1983)] の方法に従い、1本鎖cDNAを合成し、さらに二本鎖cDNAを合成した後、これをプラスミドベクターやファージベクター等に挿入し、コンピテントな状態にある大腸菌、例えばHB101株、LE392株、NM539株、Y1090株などを宿主として、形質転換させることにより実施でき、かくして所望のcDNAライブラリーを構築することができる。

上記プラスミドベクターを用いる場合は、例えばpSP64（国際公開WO89/01974号公報参照）等を有利に使用することができ、得られるcDNAライブラリーから合成したプローブを用いて、ハナハンら [Hanahan, R. A. et al., Gene, 10, 63(1980)] の方法によるコロニー・ハイブリダイゼーションにより、目的のV_L遺伝子及びV_H遺伝子のそれぞれを含む陽性クローンをクローニングすることができる。

またファージベクターを用いる場合、該ベクターとしては、例えばλgt10、λgt11などをを利用して、インビトロパッケージング法等によりcDNAライブラリーを構築し、このcDNAライブラリーから合成したプローブを用いて、ベントンとデービス [Benton, W. and Davis, R., Science, 196, 383-394(1977)] らの方法によるブラーク・ハイブリダイゼーションにより、目的のV_L遺伝子及びV_H遺伝子のそれぞれを含む陽性クローンをクローニングすることができる。

更に、上記クローニングの別法としては、例えばポリ(A)⁺RNAから得られた一本鎖cDNAより、目的とするV領域を含む領域のDNAをPCR [ポリメラーゼ・チェイン・リアクション；polymerase chain reaction, Rosaria, D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 86, 3833(1989)] により増幅し、増幅したDNA断片をベクターに組込む方法を採用することもでき、これにより所望のV_L遺伝子及びV_H遺伝子のクローニングが可能である。またプローブとハイブリダイズしたクローンについて、ベクター側プライマーを用いてPCRにより、そのcDNAの大きさを確認することができる。更に、上記増幅したV領域遺伝子（V_L遺伝子及びV_H遺伝子）をIg発現ベクターに組むことによって、本発明の組換え抗体を発現させることもできる。

尚、上記でクローニングした V_L 遺伝子及び V_H 遺伝子のクローンは、アガロースゲル電気泳動により単離・精製することができる。

上記で得られた V_L 遺伝子及び V_H 遺伝子のそれぞれのクローニングベクターへの導入は、一般的方法に従って、適当なベクター例えばpUC18、pBR322など及び適当な制限酵素、例えばEcoRIなどを用いて実施できる。得られる組換え体プラスミドの作製後、サンガーら [Sanger, F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 74, 5463(1977)] のデオキシ・チェーン・ターミネーション法などをを利用して、目的とする V_L 及び V_H 遺伝子のcDNA領域の塩基配列を決定することができる。

上記のごとくして得られる本発明組換え抗体作製用のマウス抗ヒトIL-1抗体の V_L 遺伝子及び V_H 遺伝子の各塩基配列は、配列番号：1及び配列番号：2として示した通りである。またこれら各遺伝子を含むプラスミドの具体例としては、それぞれ後述する実施例に示すプラスミドpIL068（マウス抗ヒトIL-1抗体のH鎖遺伝子を含む）及びプラスミドpIL086（マウス抗ヒトIL-1抗体のL鎖遺伝子を含む）を例示できる。

一方、本発明組換え抗体のL鎖C領域（ C_L ）及びH鎖C領域（ C_H ）としてはヒト抗体分子由来の各種のもの、例えば一般的なヒト免疫グロブリン由來のものを利用できる。該ヒト免疫グロブリンのC領域遺伝子、即ち C_L 遺伝子及び C_H 遺伝子は、例えばREI産生細胞株 [human myeloma protein : Bpp, D. et al., Bur. J. Biochem., 45, 513-524(1974)] のようなヒト抗体産生細胞から、前記と同様の方法により単離することができ、その際、目的遺伝子のクローニングのためのプローブとしては、すでに報告されているヒト免疫グロブリンの核酸塩基配列 [Ellison, J. W. et al., Nuc. Acids Res., 10, 4071(1982) : Heiter, P. A. et al., Cell, 22, 197(1980)等] を参照して合成したDNAプローブ等を利用することが可能である。

また上記ヒトC領域遺伝子としては、既に各種のものが知られており、各種のC領域遺伝子を有するプラスミドベクターが既に確立されている。従って、本発明では該遺伝子を特に上記のように抗体産生細胞より単離して調製せずとも、これらベクターの保有するものを利用するのが簡便であり有利である。かかる公知

のC領域遺伝子には、例えばH鎖の場合は、代表的には τ_1 ～ τ_4 鎖などの遺伝子が、またその他に μ 鎖、 α 鎖の各鎖の遺伝子が含まれ、L鎖の場合は、 κ 鎖、 λ 鎖などの遺伝子が含まれ、これらはいずれも本発明に利用できる。上記ヒト免疫グロブリンのC領域及びエンハンサーを含有するプラスミドベクターの具体例としては、例えばヒトIgG₄のH鎖C領域を有するpE1004〔pEE6(P. Stephens and M. Cockett, Nucl. Acids Res., 17, 7110(1989) : Prot. Eng., 1(6) 499-505(1987)に基づいて作製されたもの〕、ヒトIgG₁のH鎖C領域を有するpE1001（上記pE1004と同様にしてpEE6に基づいて作製されたもの）、ヒトIg κ のL鎖C領域を有するpE1081〔上記と同様にpEE6に基づいて作製されたもの〕等を例示できる。更にpSV2ΔHgp_t、pSV184ΔHneo〔Di, V. T. and Morrison S. L., Biotechnology, 4 (3), 214-221(1980)〕等も上記ヒト免疫グロブリンのC領域遺伝子を有するプラスミドベクターに包含される。

本発明のヒトIL-1に対するキメラ抗体の作製のための遺伝子は、上記した各種の遺伝子断片、即ちマウス由来のV_L遺伝子及びV_H遺伝子から選ばれる遺伝子と、ヒト由来のC_L遺伝子及びC_H遺伝子から選ばれる遺伝子とを、それぞれ結合させることにより構築される。

上記マウス由来のV_L遺伝子とヒト由来のC_L遺伝子とを結合させて得られる本発明の組換えヒトIL-1抗体L鎖発現ベクターの構築の概略は、例えば図6に示す通りであり、かくして得られる発現ベクターの具体例としてはpAC53を例示できる。これは、pIL086のBstBI及びSphI切斷断片をヒトIg κ のL鎖C領域をコードするDNA配列を持つプラスミドpE1081の同制限酵素切斷断片に挿入して構築されたものであり、その特徴は図8に示す通りである。

また、上記マウス由来のV_H遺伝子とヒト由来のC_H遺伝子とを結合させて得られる本発明の組換えヒトIL-1抗体H鎖発現ベクターの構築の概略は、例えば図3に示す通りであり、かくして得られる発現ベクターの具体例としてはpAC52及びpAC77を例示できる。これらは、pIL068の HindIII及びApaI切斷断片を、ヒトIgG₄のH鎖C領域をコードするDNA配列を持つ

プラスミド p E 1 0 0 4 及びヒト Ig G₁ の H 鎖 C 領域をコードする DNA 配列を持つプラスミド p E 1 0 0 1 の同制限酵素切斷断片にそれぞれ挿入して構築されたものであり、 p A C 5 2 の特徴は図 5 に示す通りである。

また、本発明のヒト IL-1 に対する抗体には、上記キメラ抗体の他に、リシェイプト抗体、即ち L 鎖及び H 鎖の少なくとも一方がマウス抗ヒト IL-1 抗体分子の CDR 領域を含むヒト・マウスグラフト V 領域を有する抗体が包含される。かかる本発明リシェイプト抗体の作製のための遺伝子（グラフトされたリシェイプト遺伝子、特にグラフト V_L 遺伝子及びグラフト V_H 遺伝子）としては、例えば上記のごとくして得られるマウス由来の V_L 遺伝子又は V_H 遺伝子の DNA 配列中の CDR 領域の DNA 配列を参照して、この配列部分を例えばヒト抗体分子の対応する V_L 遺伝子又は V_H 遺伝子と置換させた DNA 配列を有するものを利用する。かかるグラフト遺伝子は、上記設計された DNA 配列を参照して、その全遺伝子を自動オリゴヌクレオチド合成機により化学合成することもでき、また上記設計された DNA 配列の一部は、前述した各種遺伝子を利用して、 PCR 法に従って作製、増幅することもできる。

上記グラフト遺伝子の具体例としては、配列番号： 3 に示すグラフト V_L 遺伝子及び配列番号： 4 に示すグラフト V_H 遺伝子を例示できる。

グラフト V_L 遺伝子とヒト由来の C_L 遺伝子とを結合させて構築されるリシェイプト抗体 L 鎖の発現ベクターの構築の概略は図 9 に示す通りであり、かくして得られる発現ベクターの具体例としては p A L 3 1 を例示できる。これは、後記実施例に示した 2 段階法により得られる。即ち、配列番号： 3 のグラフト V_L 遺伝子の一部を含む DNA 配列（CDR 1～CDR 3 領域を除く BstBI 及び SphI 切斷断片、 PCR により増幅したもの）を、プラスミド p E 1 0 8 1 の同制限酵素切斷断片に挿入し（ステップ 1）、次いで得られるプラスミドの上記 BstBI-SphI 間に存在する BstEII-KpnI 間に、別途合成した CDR 1～CDR 3 領域の DNA 配列（BstEII 及び KpnI 切斷断片としたもの）を挿入（ステップ 2）して構築されたものであり、その特徴は図 11 に示す通りである。

またグラフト V_H 遺伝子とヒト由来の C_H 遺伝子とを結合させて構築されるリシ

エイプト抗体H鎖の発現ベクターの構築の概略は図12に示す通りであり、かくして得られる発現ベクターには、具体的にはpAL34が含まれる。これは、後記実施例に示した方法により得られる配列番号：4のグラフトV_H遺伝子を含むDNA配列 Hind III及びApa I切断断片（PCRにより増幅したもの）を、プラスミドpE1004の同制限酵素切断断片に挿入して構築されたものであり、その特徴は図14に示す通りである。

尚、上記各発現ベクターの構築の際には、一般に得られる各遺伝子の単離法に応じて、主として次の2つの結合の組合せ、即ち、染色体DNAから単離したV領域とC領域遺伝子の組合せ及びcDNAから単離したV領域とC領域の組合せに考慮をはらう必要がある。例えば、マウス染色体DNAから単離したV領域遺伝子をヒト染色体DNAから単離したC遺伝子と結合させる場合は、マウスV領域遺伝子には発現に必要なプロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を予め含ませておくのが好ましい。但し、プロモーターやエンハンサー等はマウス由来である必要がなくヒト由来であってもかまわない。上記プロモーターはV領域の5'上流域に位置し、エンハンサーはV領域遺伝子とC領域遺伝子の間に位置するのが好ましいが、エンハンサーについては必ずしもこの位置に限定されるものではない。他方、マウスcDNAから単離したV領域遺伝子をヒトcDNAから単離したC領域遺伝子と結合させる場合、その結合部分は適当な制限酵素サイトや、必要であれば適当なリンカーを用いて、V領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列とC領域遺伝子のコードしているアミノ酸配列がずれないように、またV領域アミノ酸配列とC領域アミノ酸配列が変化しないように結合しなければならず、さらに動物細胞中で発現を可能にするために適当なプロモーターやエンハンサー等の発現調節領域を遺伝子の5'上流域に付加してやる必要がある。これらの各操作は、いずれも常法に従い実施することができ、必要に応じて利用される発現調節領域、制限酵素サイト作製のためのリンカー等は公知のそれらを参照して適宜決定することができる。

このようにして作製された本発明のキメラ抗体遺伝子乃至リシェイプト抗体遺伝子を、例えば上記ベクタープラスミドpEE6、pE1001、pE1004、pE1081等やpSV2gpt [R. C. Mulligan et al., Proc. NAS. U.S.A.,

78, 2027(1981)]、pSV2-neo [P. J. Southern et al., J. Mol. Appl. Genet., 1, 327(1982)] 等の選択マーカーの付いた適当なベクタープラスミド或いは宿主細胞内でプラスミド状態で増殖できるウィルス遺伝子の一部 (パピローマウィルスなど) を持ったベクタープラスミドに H鎖遺伝子と L鎖遺伝子を別々に、あるいは同時に組み込むことにより、所望のキメラ抗体 L鎖発現プラスミド、キメラ抗体 H鎖発現プラスミド、リシェイプト抗体 L鎖発現プラスミド及びリシェイプト抗体 H鎖発現プラスミドを構築でき、また上記 L鎖と H鎖との組合せである本発明組換え抗体発現プラスミドを構築することができる。

殊に、上記 H鎖遺伝子と L鎖遺伝子とを別々に組込んだプラスミドは、その内の L鎖発現プラスミドと H鎖発現プラスミドとを用いて宿主細胞を形質転換させることにより、本発明の所望抗体発現形質転換体とすることができます。また上記 H鎖遺伝子と L鎖遺伝子と同時に組込んだプラスミドは、これを単独で用いて宿主細胞を形質転換させることによって、所望の本発明抗体発現形質転換体を取得できる。

上記本発明抗体発現形質転換体の作製のための H鎖遺伝子と L鎖遺伝子と同時に組込んだプラスミドの具体例としては、例えば後記実施例に詳述する方法により得られる pAC79 を例示できる。これはより詳しくは図 15 に示すように、一方で前記プラスミド pAL34 より、ヒト CMV プロモーターを含む H鎖 V 領域及び C 領域にポリ A を含む遺伝子を単離し、他方で pE1004 の SV40/gpt 遺伝子断片を単離し、之等を前記プラスミド pAL31 に適当に挿入することにより得られ、かくして得られるプラスミドは目的の H鎖遺伝子及び L鎖遺伝子と共に選択マーカーを保有しており、本発明組換え抗体の発現ベクターとして有用である。かくして得られるプラスミド pAC79 の特徴を図 15 に併記する。

本発明の抗ヒト IL-1 組換え抗体の製造は、上記のようにして調製された抗体遺伝子又はその H鎖もしくは L鎖遺伝子のそれぞれを含むプラスミドを用いて、宿主動物細胞を形質転換し、この形質転換体を培養することにより実施できる。この形質転換に使用される宿主動物細胞としては、COS 細胞 [Nuc. Acids Res., 12, 5707-5717(1988); ATCC CCL70; CV-1 細胞を SV40 ウィ

ルスで形質転換した細胞株]、CHO細胞 [chinese hamster ovary cell; ATCC CCL 61 : CHO-K1、WO 89/01783号公報]、BHK 細胞 [baby hamster kidney cell; ATCC CCL 10 : BHK-21 (C-13)、WO 89/01783号公報] やBリンパ系細胞株、例えば P3X63Ag8・653 (ATCC CRL 1580)、P3X63Ag8U・1 (ATCC CRL 1597)、P3/NS1/1-Ag4-1 (ATCC CRL 18) 等の形質転換細胞腫 [Riechmann, L. et al., Nature, 332, 323(1988) : 特開平2-2352号公報等参照] やハイブリドーマを例示できる。

DNAによる細胞の形質転換方法としては、DEAE-デキストラン法 [Neuberger, M. S., BMBO J., 2, 1317(1983)]、リン酸カルシウム共沈降法 [Chen, C. and Okayama H., Mol. Cell. Biol., 7, 2745-2752(1987)]、プロトプラス融合法 [Qi, V. T. and Morrison, S. L., Bio Techniques, 4(3), 214-221(1986)]、エレクトロポレーション法 [Potter, H. et al., Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 81, 7161-7163(1984)] 等の方法があり、いずれの方法でもよい。H鎖とL鎖のキメラ抗体遺伝子を同時に持つプラスミドで形質転換を行なう場合には、選択マーカーは一種類でよいが、H鎖及びL鎖を別々に形質転換させる場合には、2種類のマーカーが必要である。この場合においては、まず一つのプラスミドで形質転換を行なった後に、さらに他のプラスミドで形質転換を行なう二重形質転換法を用いるのが好ましい。

上記のようにして得られた形質転換細胞の培養、増殖は、通常の動物細胞やハイブリドーマを培養すると同じ適当な条件下で、適当な培地、常用の標準的な培地、例えばダルベッコ改良イーグル培地 (DMEM) 又は RPMI 1640 培地中で行なわれ、これは必要に応じ哺乳類の血清、例えばウシ胎児血清、又は微量要素及び増殖維持捕捉要素などを補充することもできる。また、抗体産生細胞が選択マーカーを保有している場合は、該培地は上記選択培地、例えばG418 又はキサンチン、ヒポキサンチン、チミジン及びミコフェノール酸を含有する培地で補充されるのが好ましい。上記のようにして細胞から通常のハイブリドーマの產生する抗体を同様にして、本発明の抗ヒトIL-1組換え抗体を分泌產生させ

することができる。これら組織培養条件下での哺乳類の細胞培地のための技術は、当業界において自明である。

かくして得られる細胞培養物の上清は、エンザイムイムノアッセイ (EIA) 、ドットアッセイ、FITCなどを用いる蛍光標識抗体法又はラジオイムノアッセイ (RIA) 、ラテックス凝集反応、血球凝集反応など、通常使用されるスクリーニング法を用いて、所望する抗ヒトIL-1組換えモノクローナル抗体についてスクリーニングすることができる。

かくして得られる所望の抗ヒトIL-1組換えモノクローナル抗体を産生する細胞は、上記した通常の培地で継代培養でき、また、液体窒素中で長期間保存可能である。

該抗体産生細胞からの本発明抗ヒトIL-1組換えモノクローナル抗体の採取は、該細胞を常法に従って培養し、その培養上清として、或いは該細胞をこれと適合性のある哺乳動物の腹腔内に投与して増殖させ、その腹水として得る方法等を採用できる。

該組換え抗体の単離には、培養上清中の免疫グロブリンを、例えば硫酸アンモニウムによる沈澱、PEGのような吸湿性物質に対する透析、選択膜を通す濾過等により、濃縮する。また、必要に応じ、又は所望により濃縮された該抗体を通常のクロマトグラフィー法、例えばゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE-セルロース上でのクロマトグラフィー又はプロティンAを用いるカラムクロマトグラフィー等の通常の精製手段により精製することができる。

かくして得られる本発明抗体は、これを利用して、例えば免疫沈降法、アフィニティクロマトグラフィー等の通常の精製手段により、ヒトIL-1を簡便且つ特異的に精製することが可能である。

上記の如くして得られる本発明抗体の利用によれば、検体中のヒトIL-1を免疫反応により、特異的に測定することができる。該方法としては、通常の競合法、サンドイッチ法によるラジオイムノアッセイ法 (RIA) 、酵素免疫測定法 (ELISA) 、凝集法等の通常免疫学的手法が挙げられ、これらの方法の操作、手順等は、常法と変わることろはない。より具体的には、例えば競合法を採用する場合、測定しようとする検体中のヒトIL-1と一定量の不溶化されたヒト

IL-1とを、標識剤で標識させた本発明の抗体の一定量と競合反応させ、次いで、不溶化ヒトIL-1と標識抗体との結合体及び非結合標識抗体を分離し、その何れか一方の標識活性を測定することにより、またサンドイッチ法を採用する場合は、測定物質と不溶化された本発明抗体とを反応させて、ヒトIL-1不溶化抗体複合体を形成させ、この複合体に標識抗体の一定量を反応させ、次いで複合体と標識抗体との結合体及び非結合標識抗体を分離し、その何れか一方の標識活性を測定することにより、それぞれ検体中のヒトIL-1を定量できる。上記検定法において検体として用いられる体液としては、例えば血液、細胞組織液等を例示でき、これらのうちでは血液、特に血清又は血漿が好ましい。

本発明抗体の標識物質としては、グルコアミラーゼ、パーオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトオキシダーゼ等の各種の酵素、 ^{125}I 、 ^{131}I 、トリチウム等の放射性物質等が挙げられる。該標識化法は、常法に従えばよい [Nature, 194, 495 (1962) : Acta Endocrinol. Suppl., 168, 206 (1972) 等参照]。

不溶化抗体は、ヒトIL-1又は本発明抗体を、不溶性担体に化学的又は物理的に結合させることにより製造される。不溶性担体としては、セルロース粉末、セファデックス、セファロース、ポリスチレン、濾紙、カルボキシメチルセルロース、イオン交換樹脂、デキストラン、プラスチックフィルム、プラスチックチューブ、ナイロン、ガラスピーズ、絹、ポリアミンーメチルビニルエーテルーマレイン酸共重合体、アミノ酸共重合物、エチレンーマレイン酸共重合物等が挙げられる。不溶化は、共有結合法としてのジアゾ法、ペプチド法、アルキル化法、架橋試薬による担体結合法（架橋試薬としてグルタルアルデヒド、ヘキサメチレンイソシアナート等を用いる）、Ug1反応による担体結合法等の化学反応；あるいはイオン交換樹脂のような担体を用いるイオン結合法；ガラスピーズ等の多孔性ガラスを担体として用いる物理的吸着法によって行なわれる。上記測定法において反応（免疫反応）は、通常45℃以下、好ましくは4～40℃の温度で、数時間～24時間程度で行なわれる。かくして、本発明抗体を用いれば、簡便に、高精度に、検体中のヒトIL-1を測定することができる。

また、本発明抗体はIL-1の作用を抑制乃至中和する作用を有するものであ

り、その利用によれば、ヒトIL-1の異常産生を伴う疾患、代表的には慢性関節リウマチ、甲状腺炎、腎炎等の慢性炎症性疾患、動脈硬化、川崎病等の血管炎、DIC、血液癌等の各種疾患の治療及び診断を行なうことが可能である。更に、本発明抗体は抗原性が低く、ヒト体内に投与することも可能であり、例えばこれを標識してヒト体内に投与することによって、ヒト体内のIL-1の異常産生を伴う組織部位等の画像診断にも利用することができる。

以上のように、本発明は組換え抗体のみならず、その製造方法、該方法に用いられるクロニーニングベクター、発現ベクター、トランスフェクトされた細胞系等や本発明抗体のヒトIL-1精製系、測定系への利用並びに該抗体を有効成分とする治療薬乃至診断薬及び之等の適用方法をも包含している。

かかる本発明抗体を利用した精製系、測定系の設定、治療乃至診断分野への適用、それらの改変乃至応用は当業者にとり自明である。

実施例

以下、本発明を更に詳しく説明するため、実施例を挙げる。

実施例 1

(1) ANOC-301産生ハイブリドーマの培養

マウス抗ヒトIL-1 α モノクローナル抗体であるANOC-301を産生するハイブリドーマ細胞 [KOCO301 (FBRM BP-1554)]。免疫原は組換えヒトIL-1 α であり、得られる抗体のイソタイプはIgG₁で、抗体の親和性は $0.8 \sim 2.0 \times 10^{-10} M/l$ である。特開昭63-258595号公報参照。]を、10%仔牛胎児血清（以下FCSと略す）（ハイブリマックス（Hybrimax），シグマ（Sigma）社製）、1mMグルタミン及び50ユニックット/mlペニシリナーストレプトマイシン（p/s，ギブコ（GIBCO）社製）を含む RPMI-1640 培地を用いて、5%CO₂/空気ガスを供給したローラボトルで37℃で培養した。

(2) mRNAの調製

上述した方法により培養したANOC-301産生ハイブリドーマ細胞 3×10^8 個（1l培養分）を遠心（2000 rpm, 15分）により集めた後、滅菌したPBS（リン酸塩緩衝生理食塩水（phosphate buffered saline））で一度

洗浄した。上記細胞を、5 Mグアニジン・チオシアネート、50 mMトリスー塩酸(pH 7.5)、10 mM EDTA及び8%β-メルカプトエタノールから成る20 mlの溶液に溶かした。この細胞溶解液を16 Gの注射針に5回、21 Gの注射針に20回通すことによりDNAを切断し、これに7倍容量の4 M塩化リチウムを加えた。4°Cで一晩放置後、遠心(10000 rpm, 60分, 4°C)により沈殿を回収した。沈殿を2 M塩化リチウム-4 M尿素溶液に再懸濁し、再び遠心(10000 rpm, 30分)した後、1 mM EDTA及び0.1% SDSを含む10 mMトリスー塩酸(pH 7.4)溶液に最小容量(約20 ml)で溶かした。この溶液を凍結・融解後、等量のフェノール：クロロホルム：イソアミルアルコール(24:24:1)混液で2回抽出し、さらにクロロホルムで抽出した。得られた水層に0.5容量の7.5 M酢酸アンモニウムと2容量のエタノールを加えて、全RNAを沈殿させた。得られた全RNAは1.8 mgであった。

オリゴ(dT)-セルロースを有するプレパックスパンカラムに基づいたファルマシア社製のmRNA精製キット(Cat. No. 27-9258-01)を用いて、ポリ(A)⁺RNAを調製した。得られたポリ(A)⁺RNAは、50 μgであった。

(3) cDNAライブラリーの調製

5 μgのポリ(A)⁺RNAよりアマーシャム社製cDNA合成キット(Cat. No. RPN1256Y)を用いてcDNAを合成した。cDNA(0.5ピコモル)に、内部にEcoRI部位を有するリン酸化したBstXIアダプター(125ピコモル)を連結し、アダプターの付いたcDNAを、ACA34カラムでゲル濾過を行なうことにより精製した。該アダプターの付いたcDNAを、BstXI部位を含むpSP64の修飾ベクター[ベクターCDM8(B. Seed, Nature, 329, 840(1987))]から単離したXbaIスタッフター断片(stuffer fragment)をpSP64(プロメガ社製(Promega Corporation, U.S.A.)製)のXbaI部位に挿入した修飾pSP64ベクターであり、XbaIスタッフター断片内に2ヶ所のBstXI部位を有する]に連結させ、大腸菌HB101の派生株であるLM1035細胞に形質転換した。

(4) オリゴヌクレオチドプローブ

表1に示すT4ポリヌクレオチドキナーゼで5'末端を [γ - 32 P] ATPを用いてラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを用いて、上記で得られたcDNAライブラリーより約12000コロニーについて、抗体のL鎖及びH鎖の各cDNAをスクリーニングした。

表1

目的cDNA	利用オリゴヌクレオチドプローブ
L鎖 (R498)	5' TCCAGATGTTAACTGCTCAC 3'
H鎖 (R627)	5' TGGAGTTAGTTGGGCAGC 3'

尚、上記R498は、マウスC κ 遺伝子配列 [Max et al., J. Biol. Chem., 256, 5116(1981)] の内の4658-4677の配列の相補鎖に相当し、R627は、マウスC τ 1遺伝子のC $_{H1}$ ドメイン [Honjo et al., Cell, 18, 559(1979)] の115-133の配列の相補鎖に相当する。

(5) ANOC-301のV領域のcDNAのクローニング

上記表1に示す5'末端をラベルしたオリゴヌクレオチドプローブを用いてスクリーニングを行なった。

プレハイブリダイゼーションは、6×SSC (1×SSC=0.15M NaCl-0.015Mクエン酸ナトリウム溶液)、5×Denhart's 溶液 (1×Denhart's 溶液=0.02%ボリビニルピロリドン-0.02%牛血清アルブミン (BSA)-0.02%フィコール)、0.1%SDS及び100 μ g/ml変性サケ精子DNAからなる溶液中で、46℃で3時間行なった。次に、このプレハイブリダイゼーション溶液と同組成の溶液中に 32 Pでラベルしたオリゴヌクレオチドを5ng/mlになるように加え、65℃にした後、室温にて16時間以上放置した。フィルターの洗浄は6×SSC-0.1%SDS溶液中で室温で2回行なった後、6×SSC-0.1%SDS溶液中で45℃で3回行なった。

その結果、プローブとハイブリダイゼーションしたクローンについて、ベクター側のプライマーを用いたPCR [ポリメラーゼチェインリアクション (polymerase chain reaction)] によりcDNAの大きさを分析した。

上記PCRの反応条件は以下の通りである。

テンプレートDNA 0.1 μg, 10×PCR緩衝液 [500mM KCl、100mMトリスー塩酸(pH8.3), 15mM MgCl₂, ゼラチン0.1% (w/v)] 5 μl, 2. 5mMdNTPs (N=A, G, C, T) 5 μl, オリゴR 883 10ピコモル, オリゴR 1767 10ピコモル及びTaqポリメラーゼ (1U/μl) 0.25 μl (水で反応液を50 μlとする)。

反応は94℃で1分間、55℃で1分間、72℃で1分間を20サイクル行なった。

尚、オリゴR 883及びR 1767の塩基配列を下記表2に示す。

表2

オリゴヌクレオチド	
R 883	5' GATTAGGTGACACTATAG 3'
R 1767	5' TTGTGTGGAATTGTGAGC 3'

その結果、H鎖cDNAについては8クローンが全長と考えられる1.9kbのcDNAを有しており、L鎖cDNAについては6クローンが全長と考えられる1.1kbのcDNAを有していた。

そこで上記2つのH鎖cDNAクローン (pIL068, pIL072) と2つのL鎖cDNAクローン (pIL086, pIL089) の各V領域について、塩基配列を調べた。尚、上記H鎖cDNAクローンpIL068の概略は図1に示す通りであり、またL鎖cDNAクローンpIL086の概略は図2に示す通りであり、各図において、SP6RNAPo1PはSP6RNAポリメラーゼのプロモーター領域を、Amp^Rはアンピシリン耐性遺伝子を示す。

その結果、pIL068及びpIL072の両クローンは共に、全長のマウスIgG₁H鎖遺伝子のcDNAを有していた。一方pIL086とpIL089のL鎖cDNAクローンは、V領域で異なっていた。pIL089は、ハイブリドーマの融合パートナーから由來した為L鎖遺伝子を有しており、pIL086がANOC-301のマウスカッパ鎖遺伝子を有していた。

H鎖cDNAクローンpIL068のV領域の塩基配列は配列番号：1として示した通りである。

L鎖cDNAクローンpIL086のV領域の塩基配列は配列番号：2として示した通りである。

上記pIL086は、リーダー配列の最初の3アミノ酸残基が欠けており、そのために発現ベクター作製時には、以下に示すように既知のカッパ鎖のリーダー配列に基づいてメチオニン、アルギニン及びバリンの配列(ATGAGGGTC)を付加した。

(6) キメラH鎖IgG₄ANOC-301の発現ベクターpAC52の作製

この発現ベクターpAC52の作製の概略は図3に示す通りである。尚、図中V_HはマウスH鎖V領域遺伝子を、G4はヒトIgG₄のC領域を、G1はヒトIgG₁のC領域を、hCMVはヒトサイトメガロウイルスのMIE(major immediate early)プロモーターを、gp tはキサンチングアミニンフォスホリボシルトランスフェラーゼ遺伝子を、pAはポリA付加シグナル配列を、SV_{ori}はSV40ウイルスの複製起源をそれぞれ示す。以下の図においても同様とする。

まずマウスH鎖V領域遺伝子(V_H)を含むpIL068より、図4に示す2種のプライマー(フォワード・プライマー(R2391)及びリバース・プライマー(R2390))を用いて、上記(5)で述べたと同様の条件でPCR法にて、上記V_H遺伝子を含むDNA断片を単離した。このものの塩基配列及び対応するアミノ酸配列は、配列番号：1として示す通りである。

次いで、上記PCR法により増幅させたV_H遺伝子を含むDNA断片を、制限酵素HindIIIとApalで切断し、これをヒトIgG₄のC領域を有するベクターpE1004[pEE6(P. Stephens and M. Cockett, Nucl. Acids Res., 17, 7110(1989))に基づいて作製した。]のHindIIIとApal間に挿入して、目的のpAC52を得た。得られたpAC52の特徴及び制限酵素地図を図5に示す。

(7) キメラH鎖IgG₁ANOC-301の発現ベクターpAC77の作製

この発現ベクターpAC77の作製の概略も図3に併記する通りであり、このものはヒトIgG₁のC領域を有するベクターpE1004に代えてヒトIgG₁

のC領域を有するベクターpE1001〔pE1004と同様にpEE6に基づいて作製した。〕を用いて、上記6と同様にして作製できるが、この例では、以下の如くして作製した。

即ち、上記(6)で作製したキメラH鎖IgG₄ANOC-301の発現ベクターpAC52より、制限酵素HindIIIとApaIでANOC-301のマウスH鎖V領域遺伝子を切り出し、これをベクターpE1001のHindIIIとApaI間に挿入した。かくして目的のpAC77を得た。

(8) キメラL鎖ANOC-301の発現ベクターpAC53の作製

この発現ベクターpAC53の作製の概略は図6に示す通りである。尚、図中V_LはANOC-301(マウス)のL鎖V領域遺伝子を、C_k(C_{κappa}又はC_κとも表示する)はヒトカッパ鎖C領域を示し、AmpR及びhCMVは前記に同じである。

即ち、まずマウスL鎖可変領域遺伝子(V_L)を含むpIL086より、図7に示す2種のプライマー(フォワード・プライマー(R2429)及びリバース・プライマー(R2430))。それぞれ自動オリゴヌクレオチド合成機により化学合成した。)を用いて、前記(5)で述べたと同様の条件でPCR法にて、上記V_L遺伝子を含むDNA断片を単離した。このものの塩基配列及び対応するアミノ酸配列は、配列番号:2として示す通りである。

次いで、上記PCR法により増幅させたV_L遺伝子を制限酵素BstBIとSphIで切断し、これをヒトカッパ鎖C領域を有するベクターpE1081〔pE1004の場合と同様にpEE6に基づいて作製した。〕のBstBIとSphI間に挿入して、pAC53を得た。かくして得られたpAC53の特徴及び制限酵素地図を図8に示す。

(9) CDR-グラフトL鎖ANOC-301発現ベクターpAL31の作製

この発現ベクターpAL31の作製の概略は図9に示す通りである。該ベクターは、ヒト抗体REI〔E. A. Kabat et al., (1987) in Sequences of Proteins of Immunological Interest., 4th edition, (US Department of Health and Human Services)〕のカッパ鎖V_Lドメイン内CDR領域のアミノ酸配列を、ANOC-301のV_Lドメイン内のCDR領域のアミノ酸配列で置換

させたものであり、以下の通り作製された。

即ちまず、ドウターティ (Daughterty) らの方法 (Nucl. Acids Res., 19, 2471(1991) によって述べられた方法に準じて、オリゴヌクレオチドを用いて、下記ステップ1及びステップ2に従い、CDR-グラフト V_L 遺伝子を得た。

(ステップ1)

ヒト抗体RE-Iのカッパ鎖のリーダー配列、フレームワーク1の部分及びフレームワーク4の部分をコードするユニバーサル V_L カセットを構築した。具体的には、図16に示すオリゴヌクレオチドを用いてPCR反応を行なった。反応液は $50 \mu l$ からなり各10ピコモルの3'及び5'ショート・オリゴヌクレオチド (BUNBW-20, L-RB1VEC 3)、各1ピコモルのインターナル・オリゴヌクレオチド (BUNBW-1, L-RB1VEC 1, L-RB1VEC 2)、10mMトリス-塩酸 (pH 8.3)、1.5 mM MgCl₂、0.01% (w/v) ゼラチン、50 mM KCl、0.25 mM dNTPs (N=A, G, T, C) 及び0.25ユニットのTaqポリメラーゼの組成を有し、94°Cで1分間、55°Cで1分間、72°Cで1分間の20サイクルを行なった。反応終了後、フェノール・クロロホルムで2回抽出し、エタノール沈澱を行ない、その後、水に溶解後、制限酵素BstBIとSphIで切断し、pE1081のBstBIとSphI間に挿入し、ユニバーサル V_L カセットpAL29を得た。このBstBIとSphI間の塩基配列は図17に示す通りである。

(ステップ2)

CDR-1～CDR-3の領域については、図18に示したオリゴヌクレオチドを用い、ステップ1と同様の方法でPCR反応を行ない、最終的にBstEIIとKpnI間のDNA断片を得た。これを、予め制限酵素BstEII及びKpnIで切断しておいた前記ステップ1で得られたユニバーサル V_L カセットpAL29のBstEIIとKpnI間に挿入して、pAL31を得た。

得られたCDR-グラフト V_L 遺伝子のDNA配列及び対応するアミノ酸配列は、配列番号：3として示す通りである。

BstBIとSphI断片 (図10) を挿入された目的のpAL31の特徴及び制限酵素地図を図11に示す。

(10) CDR-グラフトH鎖IgG₄ANOC-301発現ベクターpAL34の作製

この発現ベクターpAL34の作製の概略は図12に示す通りであり、該ベクターは、ヒト抗体KOL [E. A. Kabat et al., (1987) in Sequences of Proteins of Immunological Interest., 4th edition, (US Department of Health and Human Services)] のH鎖V_Hドメイン内の3ヶ所のCDR領域のアミノ酸配列及びフレームワーク内の12ヶ所のアミノ酸残基をANOC-301のV_Hドメイン内の対応するアミノ酸残基で置換したものであり、以下の通り作製された。

即ち、上記(9)で述べた方法と同様の方法で、オリゴヌクレオチド(図19)を用いたPCR法により一段階で、CDR-グラフトV_H鎖遺伝子(そのDNA配列は配列番号:4として示す)を得た。得られた遺伝子を制限酵素HindIIIとApaIで切断して、ヒト・マウスグラフトV_H遺伝子を含むDNA断片を得た。このものは図13に示すDNA配列及び対応アミノ酸配列を有している。

上記HindIII-ApaI断片を、ベクターpE1004のHindIIIとApaI間に挿入して、目的のpAL34を得た。かくして得られたpAL34の特徴及び制限酵素地図を図14に示す。

(11) CDR-グラフトANOC-301発現ベクターpAC79の作製

CDR-グラフト-H鎖IgG₄ANOC-301発現ベクターpAL34のhCMVプロモーターの5'末端のClaI部位に、BamHI認識部位を挿入して、hCMV/CDR IgG₄カセットを、BamHI DNA断片として単離した。

一方、pE1004からSV40/gpt遺伝子のカセットを、SalI DNA断片として単離し、これをCDR-グラフトL鎖ANOC-301発現ベクターpAL31のSalI部位に挿入した。さらに、得られたベクターのBamHI部位にhCMV/CDR IgG₄カセットを挿入して、目的の発現ベクターpAC79を作製した。その操作の概略は図15に示す通りである。

かくして得られたpAC79の特徴及び制限酵素地図を図15に併記する。

(12) CHOL 7 6 1 h 細胞を用いた組換え抗体の一過的発現

10% FCS、1 mMグルタミン及び50 U/m^lペニシリントレプトマイシンを含むダルベッコ修飾イーグル培地で培養されたCHOL 7 6 1 h 細胞 [M. I. Cockett et al., Nucl. Acids Res., 19, 319(1991)] を、ファルコンT175 フラスコに約2×10⁷細胞数で播き、この細胞に50 μgの各プラスミドDNAをリン酸カルシウム法によってトランスフェクションした。

用いたプラスミドDNAは、上記(6)～(11)で得られたもの又はそれらの組合せ、即ちキメラH鎖IgG₄ANOC-301の発現ベクターpAC52とキメラL鎖ANOC-301の発現ベクターpAC53との組合せ、キメラL鎖ANOC-301の発現ベクターpAC53とキメラH鎖IgG₁ANOC-301発現ベクターpAC77の組合せ、キメラL鎖ANOC-301の発現ベクターpAC53とCDR-グラフトH鎖IgG₄ANOC-103発現ベクターpAL34との組合せ、CDR-グラフトL鎖IgG₄ANOC-301発現ベクターpAL31とキメラH鎖IgG₄ANOC-301の発現ベクターpAC52との組合せ及びCDR-グラフトH鎖及びL鎖を組合わせた発現ベクターpAC79を用いた。

トランスフェクション後、72時間で培地を回収した。

発現される組換え抗体は以下の通りである。

- ・キメラIgG₄ANOC-301
- ・キメラIgG₁ANOC-301
- ・キメラL鎖／グラフトH鎖IgG₄ANOC-301
- ・グラフトL鎖／キメラH鎖IgG₄ANOC-301
- ・グラフトIgG₄ANOC-301

(13) 組換え抗体の精製

キメラIgG₁ANOC-301は、プロテインA・セファロース・ファースト・フロー(FF)(ファルマシア社製)を使用して培養上清から精製した。尚、プロテインA・セファロースカラム(22 mlベット容量)は、あらかじめ4.3 M·NaClを含む50 mMグリシン／グリシン酸ナトリウム緩衝液(pH 8.8)で平衡化した(5カラム容量、110 ml)。そして480 μgのキメラIgG₁

ANOC-301 (ELISAによる測定値) を含む2. 4 ℥の培養上清を上記カラムにかけた。培養上清をカラムに乗せ終わった後、マトリックスを平衡緩衝液で洗い (3カラム容量, 6.6 mL) 、その後50 mM酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) (3カラム容量, 6.6 mL) で培養上清中の牛IgGを溶出した。その後0.1Mグリシン塩酸 (pH 2.5) 溶液でキメラIgG₁ANOC-301を溶出し、溶出液を2Mトリス・塩酸 (pH 8.0) で直ちに中和した。キメラIgG₁ANOC-301を含む画分を、0.05%チメロザール含有リン酸緩衝食塩水にて透析し、-70°Cで保存した。得られたキメラIgG₁ANOC-301は357 μgであった。

キメラIgG₄ANOC-301、キメラL鎖/グラフトH鎖IgG₄ANOC-301、グラフトL鎖/キメラH鎖IgG₄ANOC-301及びグラフトIgG₄ANOC-301の精製も、上記キメラIgG₁ANOC-301と同様にして行なった。

その結果、キメラIgG₄ANOC-301は2.4 ℥の培養上清より325 μg、キメラL鎖/グラフトH鎖IgG₄ANOC-301は、2.1 ℥の培養上清より820 μg、グラフトL鎖/キメラH鎖IgG₄ANOC-301は、1.1 ℥の培養上清より94.5 μg、グラフトIgG₄ANOC-301は1.3 ℥の培養上清より1400 μgで得られた。

(1.4) ヒト組換えIL-1αの¹²⁵I標識体の作製

1. 5 mLのポリプロピレン製エッペンドルフ・タイプのチューブに20 μlのヨードゲン溶液 [ジクロロメタン或いはクロロホルムに溶かした0.2 mg/mLのヨードゲン (1, 3, 4, 6-テトラクロロ-3a, 6a-ジフェニルグリコールリル (1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril, Pierce Chemical Company, U.S.A.))] を加え、減圧下で溶媒を除いた。このようにして得られたヨードゲンをコーティングしたチューブに10 μlの0.25 Mリン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.5) と5 μl (18.5 MBq) の3.7 GBq/mL Na·¹²⁵I (アマーシャム社 (Amersham, code 1MS30) 製) を加え、さらに10 μlの0.1 mg/mLヒト・組換えIL-1α (0.05 Mリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.5に溶解) を加えた後、ピペットで反応液を混合し、氷上に3分間放置した。

0.05Mリン酸ナトリウム緩衝液(pH 7.5)を250 μl 加えた後、あらかじめ0.1%BSA(牛血清アルブミン(bovin serum albumin), シグマ社(Sigma)製)と0.05%メロザール(シグマ社製)を含むPBS(リン酸塩緩衝生理食塩水(phosphato buffered saline))で平衡化したプレパックPD-10(pre-packed PD-10)カラム(ファルマシア社製)にかけ、各分画(1mL/分画)についてカウントし、 $^{125}\text{I}\text{L}-1\alpha$ を含む画分を4°Cで保存した。

(15) $^{125}\text{I}\text{L}-1\alpha$ を用いた抗体の力価の測定

ANOC-301及び組換え抗体をそれぞれ3%正常ヤギ血清と0.05%メロザール(シグマ社製)を含むPBS(以後抗体希釈剤とする)で10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ から1.25ng/mLまで2倍ずつ段階希釈し、それぞれ100 μl ずつをアッセイチューブ(ガラスチューブ, 10mm×75mm, コーニング(Corning)社製)に入れ、さらに100 μl (10000cpm)の $^{125}\text{I}\text{L}-1\alpha$ と300 μl の抗体希釈液を加えて混合した後、4°Cで48時間放置した。500 μl の25%PEG(ポリエチレングリコール、和光純薬製)を加えて攪拌し、30分間、4°Cで放置した。遠心(3000rpm, 15分, 4°C)後、上清を除いて沈殿物のカウントをγ-カウンターで測定した。

その結果、50%B/T(B:結合したカウント, T:全カウント)を示す抗体の濃度を力価として、表3に示す。

表3

抗 体 名	50% B/T 濃度 (ng/mL)
キメラ IgG ₄ ANOC-301	57
キメラ IgG ₁ ANOC-301	63
キメラH鎖/グラフトL鎖IgG ₄ ANOC-301	777
グラフトH鎖/キメラL鎖IgG ₄ ANOC-301	181
CDR-グラフトANOC-301	2270
ANOC-301	246

(16) 抗体の親和性の測定

抗体の親和性を、競合法によるRIA（ラジオイムノアッセイ）により、以下の通り測定した。即ちヒト・組換えIL-1 α を抗体希釈液で10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ から2.5ng/mlまで2倍ずつ段階希釈し、それぞれ100 μl をアッセイチューブに入れ、ついで各抗体を抗体希釈液で50%B/Tを示す付近の濃度まで希釈した液を100 μl 、 $^{125}\text{I}-\text{IL}-1\alpha$ を100 μl (10000cpm)、抗体希釈液を200 μl 加え、全量を500 μl とし、4℃で48時間反応させた。その後、500 μl の25%PEG（ポリエチレングリコール、和光純薬社製）を加えて攪拌し、30分間、4℃で放置した後、遠心(3000rpm, 15分, 4℃)し、上清を除いて沈澱物のカウントを γ -カウンターで測定した。

その結果よりスカッチャードプロットを行ない、親和性を算出した。結果を表4に示す。

表4

抗 体 名	アフィニティ (M/L)
キメラ IgG ₄ ANOC-301	1. 03 × 10 ⁻¹⁰
キメラ IgG ₁ ANOC-301	0. 95 × 10 ⁻¹⁰
キメラH鎖／グラフトL鎖IgG ₄ ANOC-301	2. 09 × 10 ⁻⁹
グラフトH鎖／キメラL鎖IgG ₄ ANOC-301	4. 03 × 10 ⁻¹⁰
CDR-グラフトANOC-301	3. 69 × 10 ⁻⁹
ANOC-301	1. 62 × 10 ⁻¹⁰

産業上の利用可能性

本発明の抗ヒトIL-1組換え抗体を利用すれば、臨床サンプル等の低濃度のヒトIL-1を含有する検体中の該ヒトIL-1を正確に測定可能な免疫検定法による測定手法、IL-1の異常産生を伴う各種疾患に対する、IL-1の作用を抑制乃至中和を目的とする医薬品、ヒト体内IL-1の異常産生組織部位等の画像診断剤等が提供できる。

配列表

配列番号：1

配列の長さ：453

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：31, 453

特徴を決定した方法：E

配列：

GTTAGTCT TAGGCACCAC TTCTTAGACA TC ATG GCT TGG GTG TGG ACC TTG	51		
Met Ala Trp Val Trp Thr Leu			
-15			
CTA TTC CTG ATG GCA GCT GCC CAA AGT GCC CAA GCA CAG ATC CAG TTG	99		
Leu Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser Ala Gln Ala Gln Ile Gln Leu			
-10	-5	1	
GTG CAG TCT GGA CCT GAG TTG AAG AAG TCT GGA GAG ACA GTC AAG ATC	147		
Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Ser Gly Glu Thr Val Lys Ile			
5	10	15	20
TCC TGC AAG GCT TCT GGG TAT ACC TTC AGA AAC TAT GGA ATG AAC TGG	195		
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Arg Asn Tyr Gly Met Asn Trp			
25	30	35	
GTG AAG CAG GCT CCA GGA AAG GGT TTA AAG TGG ATG GGC TGG ATA AGT	243		
Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met Gly Trp Ile Ser			
40	45	50	
ACT TAC ACT GGA GAG CCA ACA TAT GCT GAT GAC TTC AAG GGA CGG TTT	291		
Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe			

55	60	65	
GCC TTC TCT TTG GAA ACC TCT GCC AGC ACT GCC TAT TTG CAG ATC AAC			339
Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Ile Asn			
70	75	80	
AAT TTC AAA AAT GAG GAC ACG GCT ACA TAT TTC TGT GCA AGA GGG CTC			387
Asn Phe Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Leu			
85	90	95	100
TAT TAC TTC GGT AGT AGC TAT GCT TTG GAC TAC TGG GGT CAA GGA ACC			435
Tyr Tyr Phe Gly Ser Ser Tyr Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr			
105	110	115	
TCA GTC ACC GTC TCC TCA			453
Ser Val Thr Val Ser Ser			
			120

配列番号：2

配列の長さ：372

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1, 372

特徴を決定した方法：E

配列：

TCT GCT CAG TTC CTT GGT CTC CTG TTG CTC TGT TTT CAA GGT ACC AGA	48	
Ser Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Leu Cys Phe Gln Gly Thr Arg		
-15	-10	-5
TGT GAT ATC CAG ATG ACA CAG ACT ACA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG	96	

Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Thr	Thr	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Leu	
1		5				10			10							
GGA	GAC	AGA	GTC	ACC	ATC	ACT	TGC	AGG	ACA	AGT	CAG	GAC	ATT	AAC	AAT	144
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Thr	Ser	Gln	Asp	Ile	Asn	Asn	
	15				20				25							
AAT	TTA	AAC	TGG	TTT	CAA	CAG	AAA	CCA	GAT	GGA	ACT	GTT	AAA	CTC	CTG	192
Asn	Leu	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gly	Thr	Val	Lys	Leu	Leu	
	30				35			40								
ATC	TAC	TAC	ACA	TCA	AGA	TTA	CAC	TCA	GGA	GTC	CCA	TCA	AGG	TTC	AGT	240
Ile	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	
	45			50			55									
GGC	AGT	GGG	TCT	GGA	ACA	GAT	TAT	TCT	CTC	ACC	ATT	AGC	AAC	CTG	GAA	288
Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Asn	Leu	Glu	
	60			65			70			75						
GAA	GAA	GAT	GCT	GCC	ACT	TAC	TTT	TGC	CAA	CAG	GGT	AAA	ACC	CTT	CCG	336
Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Gly	Lys	Thr	Leu	Pro	
	80			85			90									
TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	TTC	AAA					372
Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Phe	Lys					
	95			100												

配列番号：3

配列の長さ：394

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

配列の特徴：

特徴を表す記号：CDS

存在位置：1, 3 9 4

特徴を決定した方法：E

配列：

ATG TCT GTC CCC ACC CAA GTC CTC GGT CTC CTG CTG CTG TGG CTT ACA	48		
Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr			
-20	-15	-10	-5
GAT GCC AGA TGT GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC	96		
Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser			
1	5	10	
GCA TCT GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACA TGT AGA ACA TCT CAG GAC	144		
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp			
15	20	25	
ATC AAC AAC AAC CTG AAC TGG TAT CAG CAG ACA CCT GGA AAG GCT CCT	192		
Ile Asn Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro			
30	35	40	
AAG CTG CTG ATC TAC ACA TCT CGT CTG CAT TCT GGA GTC CCT TCT	250		
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser			
45	50	55	60
AGA TTC TCT GGT TCT GGC TCT GGA ACA GAC TAC ACA TTC ACA ATC TCT	298		
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser			
65	70	75	
TCT CTC CAA CCT GAG GAC ATC GCT ACA TAC TAC TGC CAA CAG GGA AAG	346		
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys			
80	85	90	
ACA CTG CCT TGG ACA TTC GGA CAG GGT ACC AAA TTG CAG ATC ACA CGT	394		
Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg			
95	100	105	

配列番号：4

配列の長さ：4 2 3

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：他の核酸

配列の特徴：

特徴を表す記号：C D S

存在位置：1, 4 2 3

特徴を決定した方法：E

配列：

ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACT ACA GGA	48		
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly			
-15	-10	-5	
GTC CAT TCT CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGA GTG GTG CAG	96		
Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln			
1	5	10	
CCT GGA AGA TCT CTG AGA CTG TCT TGT AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC	144		
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe			
15	20	25	
AGA AAC TAC GGC ATG AAT TGG GTG AAA CAG GCA CCT GGA AAG GGA CTC	192		
Arg Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu			
30	35	40	45
AAG TGG ATG GGA TGG ATT TCT ACA TAC ACA GGA GAG CCT ACG TAC GCA	240		
Lys Trp Met Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala			
50	55	60	
GAC GAC TTC AAG GGA AGA TTC ACA TTT TCT CTG GAC ACA TCT GCA TCT	288		
Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser			
65	70	75	
ACA GCT TTC CTG CAG ATG GAC TCT CTG AGA CCT GAG GAC ACA GGA GTG	336		
Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val			

80	85	90	
TAC TTC TGT GCA AGA GGA CTG TAC TAC TTC GGA TCT TCT TAC GCA CTG			384
Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Leu Tyr Tyr Phe Gly Ser Ser Tyr Ala Leu			
95	100	105	
GAC TAC TGG GGA CAG GGA ACA CCT GTG ACA GTG TCT TCT			423
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser			
110	115	120	

請 求 の 範 囲

1. L鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：1に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子の可変部領域とを有し且つH鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：2に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子の可変部領域とを有することを特徴とするヒトIL-1に対する組換え抗体。
2. L鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：3に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフト可変部領域とを有し且つH鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：2に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子の可変部領域とを有することを特徴とするヒトIL-1に対する組換え抗体。
3. L鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：1に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子の可変部領域とを有し且つH鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：4に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフト可変部領域とを有することを特徴とする組換え抗体。
4. L鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：3に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフト可変部領域とを有し且つH鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：4に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフト可変部領域とを有することを特徴とするヒトIL-1に対する組換え抗体。
5. マウス抗ヒトIL-1抗体L鎖のV領域をコードする配列番号：1で表わされる塩基配列を有するDNA。
6. マウス抗ヒトIL-1抗体H鎖のV領域をコードする配列番号：2で表わされる塩基配列を有するDNA。
7. マウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフト抗体L鎖のV領域をコードする配列番号：3で表わされる塩基配列を有する

DNA。

8. マウス抗ヒトIL-1抗体分子のCDR領域を含むヒト・マウスグラフト抗体H鎖のV領域をコードする配列番号：4で表わされる塩基配列を有するDNA。
9. ヒト抗体分子のC領域をコードするDNAと、配列番号：1に記載のアミノ酸配列を有するマウス抗ヒトIL-1抗体分子のV領域をコードするDNAとを有する組換え抗ヒトIL-1抗体L鎖発現ベクター。
10. ヒト抗体分子のC領域をコードするDNAと、配列番号：2に記載のアミノ酸配列を有するマウス抗ヒトIL-1抗体分子のV領域をコードするDNAとを有する組換え抗ヒトIL-1抗体H鎖発現ベクター。
11. ヒト抗体分子のC領域をコードするDNAと、配列番号：3に記載のアミノ酸配列を有するマウス抗ヒトIL-1抗体のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域をコードするDNAとを有する組換え抗ヒトIL-1抗体L鎖発現ベクター。
12. ヒト抗体分子のC領域をコードするDNAと、配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有するマウス抗ヒトIL-1抗体のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域をコードするDNAとを有する組換え抗ヒトIL-1抗体H鎖発現ベクター。
13. ヒト抗体分子のC領域と、配列番号：3に記載のアミノ酸配列を有するマウス抗ヒトIL-1抗体のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域とを有する組換え抗ヒトIL-1抗体L鎖をコードするDNA、及びヒト抗体分子のC領域と、配列番号：4に記載のアミノ酸配列を有するマウス抗ヒトIL-1抗体のCDR領域を含むヒト・マウスグラフトV領域とを有する組換え抗ヒトIL-1抗体H鎖をコードするDNAを有する組換え抗ヒトIL-1抗体発現ベクター。

要 約 書

L鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：1に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子の可変部領域とを有し且つH鎖がヒト抗体分子の定常部領域と配列番号：2に記載のアミノ酸配列のマウス抗ヒトIL-1抗体分子の可変部領域とを有するヒトIL-1に対するキメラ抗体、その他のヒト・マウスキメラ乃至リシェイプト抗体。

本発明抗体を利用することにより、特にIL-1の異常産生を伴う各種疾患の治療や体内IL-1産生部位等の画像診断を行なうことができる。

図 1

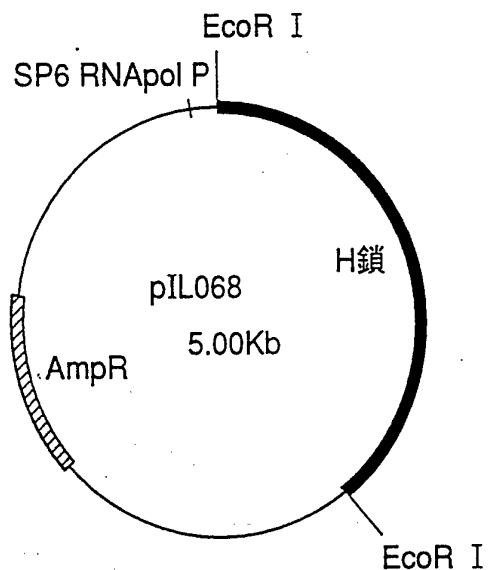


図 2

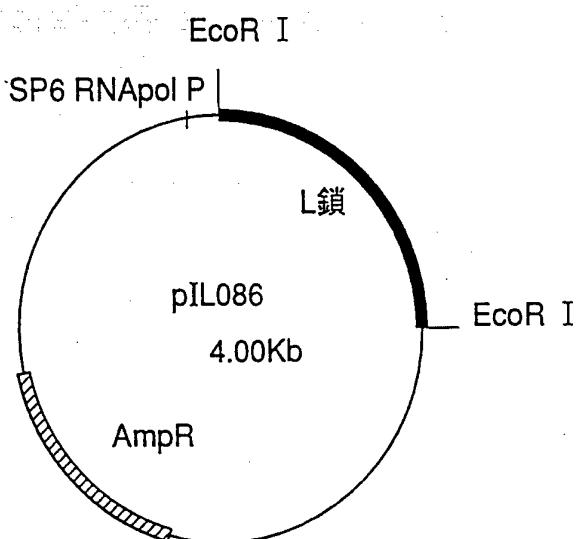


図 3

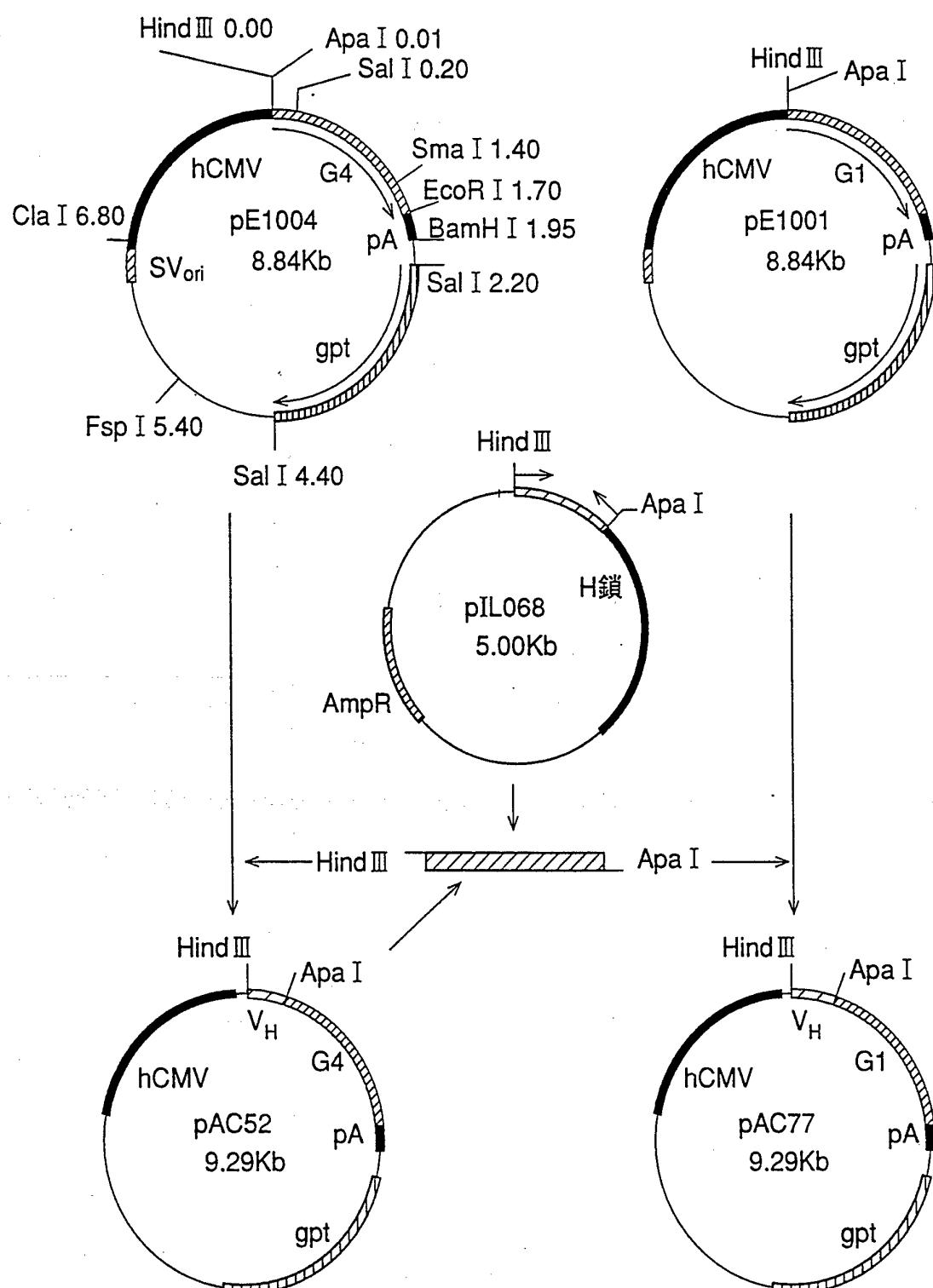


図 4

フォワード・プライマー (R 2391) :

5' GGGGAAGCTTGCCGCCACCATGGCTTGGGTGTGGACCTTGCTAT 3'
Hind III

リバース・プライマー (R 2390) :

5' CAGATGGGCCCTTCGTTGAGGCTGAGGAGACGGTGA 3'
Apa I

図 5

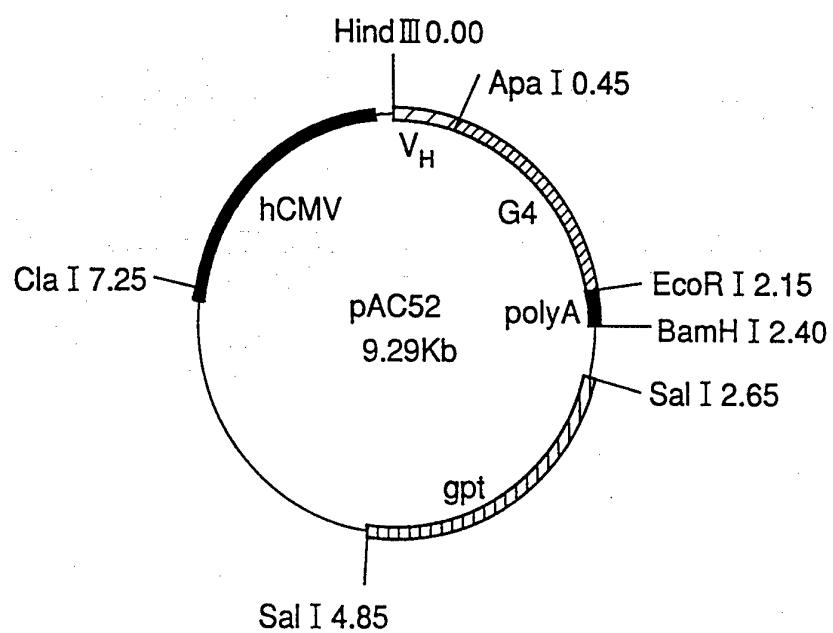


図 6

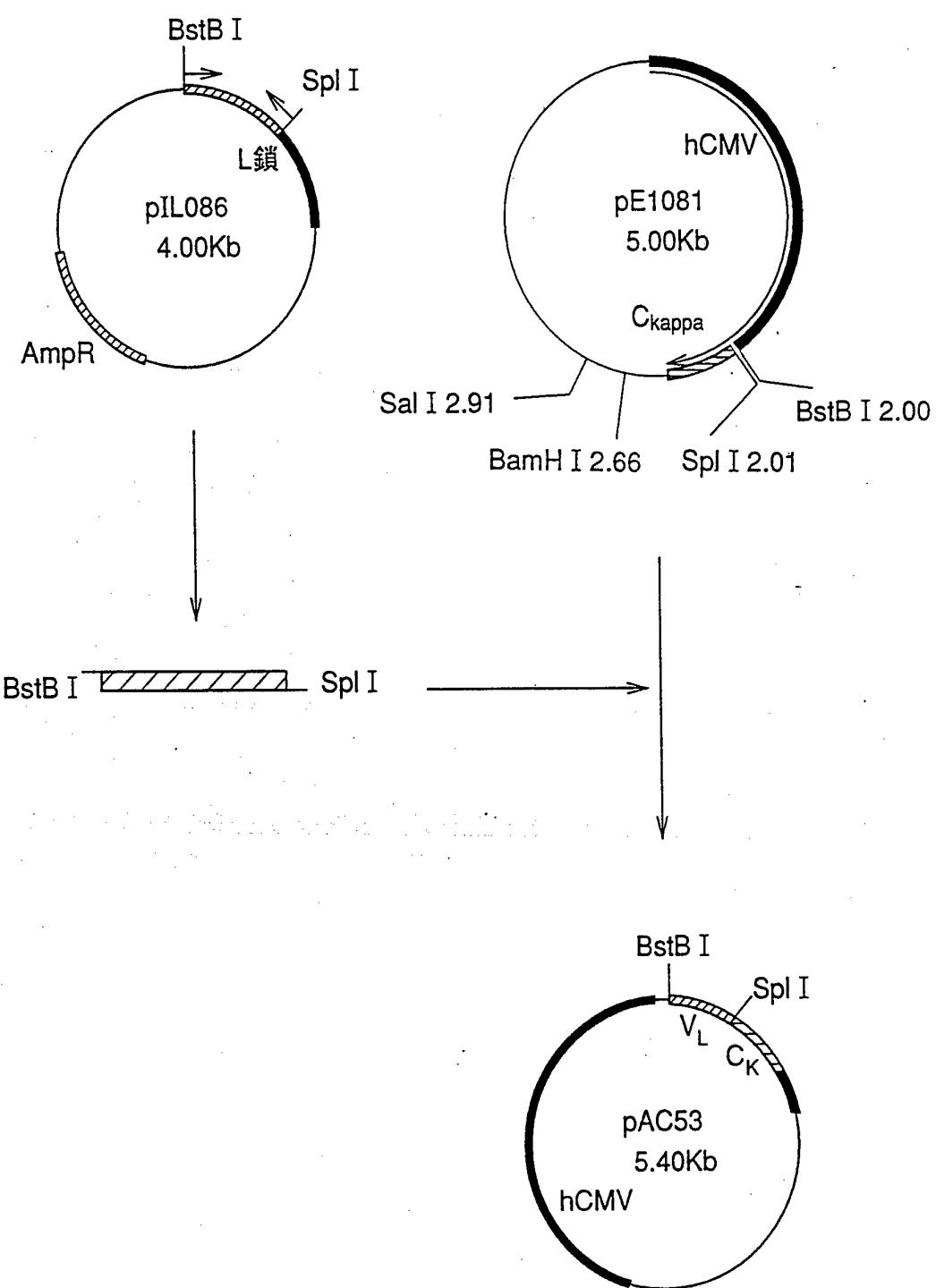


図 7

フォワード・プライマー (R 2429) :

5' AAGCTATTCGAAGCCGCCACCATGAGGGTCTCTGCT 3'
Bst BI

リバース・プライマー (R 2430) :

5' TTCAAACGTACGGTAGCGGCC 3'
Sph I

図 8

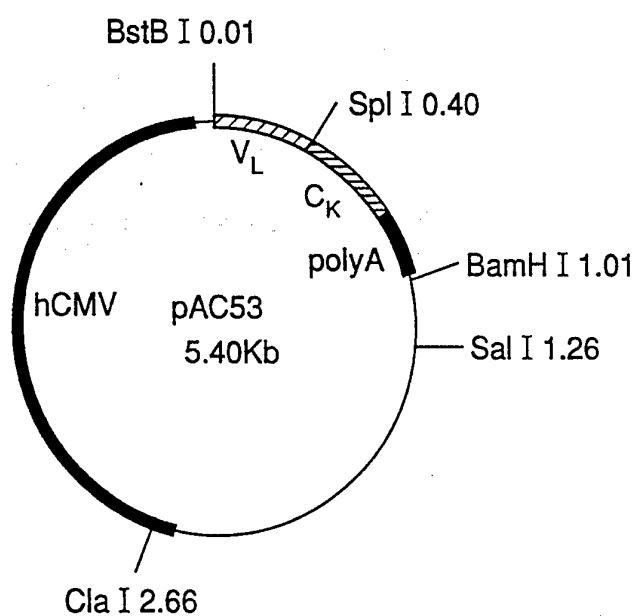
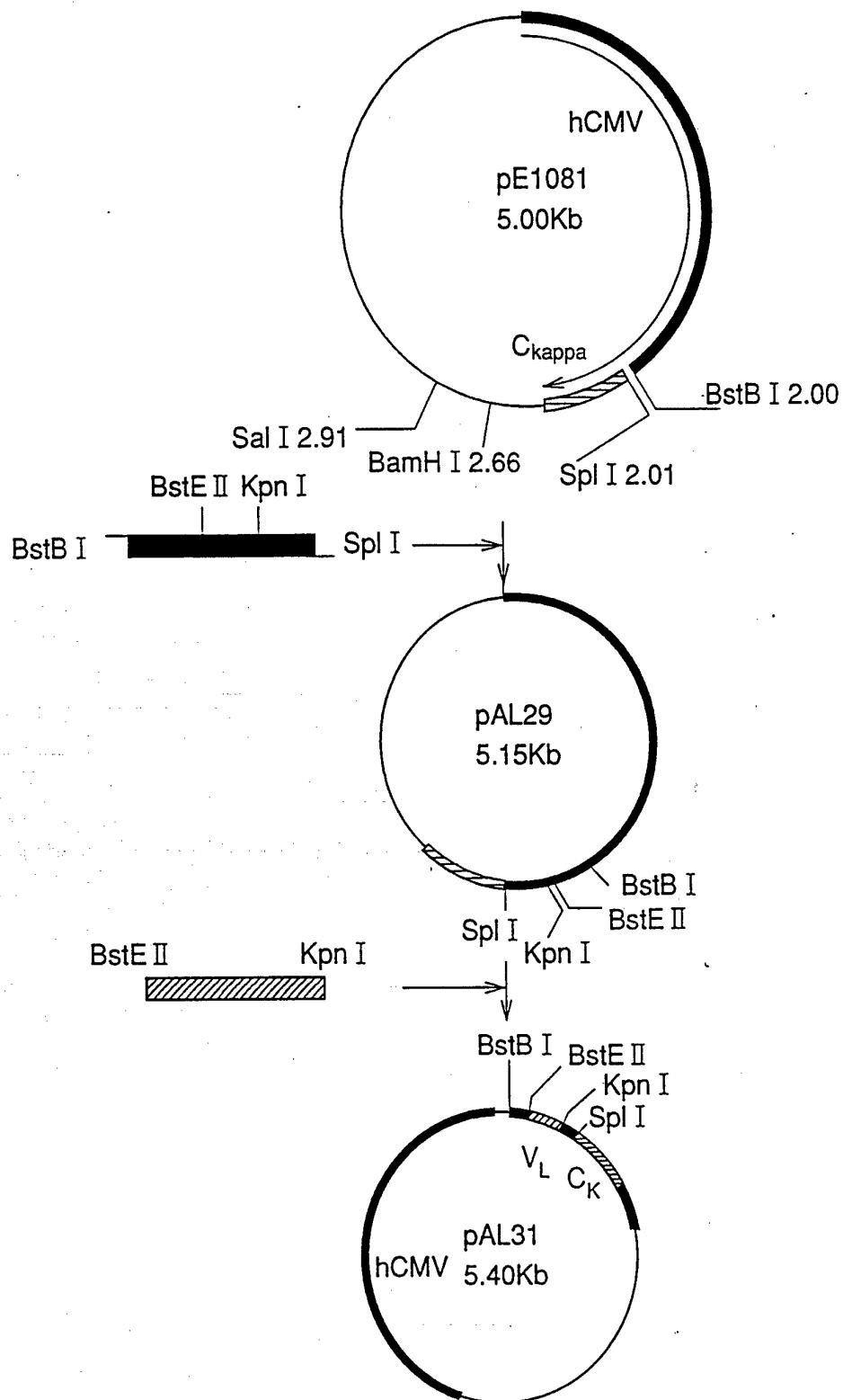


図 9



10

TTCGAAGCCGCCACC
AAGC~~T~~TTCGGCGGTGG
Bst BI

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
ATG TCT GTC CCC ACC CAA GTC CTC GGT CTC CTG CTG CTG TGG CTT ACA
TAC AGA CAG GGG TGG GTT CAG GAG CCA GAC GAC GAC ACC GAA TGT

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
GAT GCC AGA TGT GAC ATT CAA ATG ACC CAG AGC CCA TCC AGC CTG AGC
CTA CGG TCT ACA CTG TAA GTT TAC TGG GTC TCG GGT AGG TCG GAC TCG

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asp
GCA TCT GTA GGA GAC CGG GTC ACC ATC ACA TGT AGA ACA TCT CAG GAC
CGT AGA CAT CCT CTG GCC CAG TGG TAG TGT ACA TCT TGT AGA GTC CTG

Ile Asn Asn Asn Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro
ATC AAC AAC AAC CTG AAC TGG TAT CAG CAG ACA CCT GGA AAG GCT CCT
TAG TTG TTG TTG GAC TTG ACC ATA GTC GTC TGT GGA CCT TTC CGA GGA

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser
AAG CTG CTG ATC TAC TAC ACA TCT CGT CTG CAT TCT GGA GTC CCT TCT
TTC GAC GAC TAG ATG ATG TGT AGA GCA GAC GTA AGA CCT CAG GGA AGA

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser
AGA TTC TCT GGT TCT GGC TCT GGA ACA GAC TAC ACA TTC ACA ATC TCT
TCT AAG AGA CCA AGA CCG AGA CCT TGT CTG ATG TGT AAG TGT TAG AGA

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Lys
TCT CTC CAA CCT GAG GAC ATC GCT ACA TAC TAC TGC CAA CAG GGA AAG
AGA GAG GTT GGA CTC CTG TAG CGA TGT ATG ATG ACG GTT GTC CCT TTC

Thr Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr Arg
ACA CTG CCT TGG ACA TTC GGA CAG GGT ACC AAA TTG CAG ATC ACA CGT
TGT GAC GGA ACC TGT AAG CCT GTC CCA TGG TTT AAC GTC TAG TGT GCA

Thr
ACG
TGC
Spl I

図 11

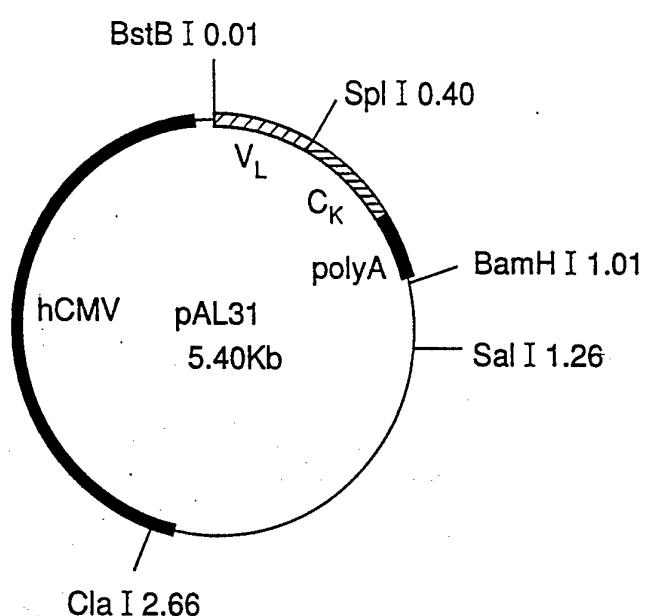
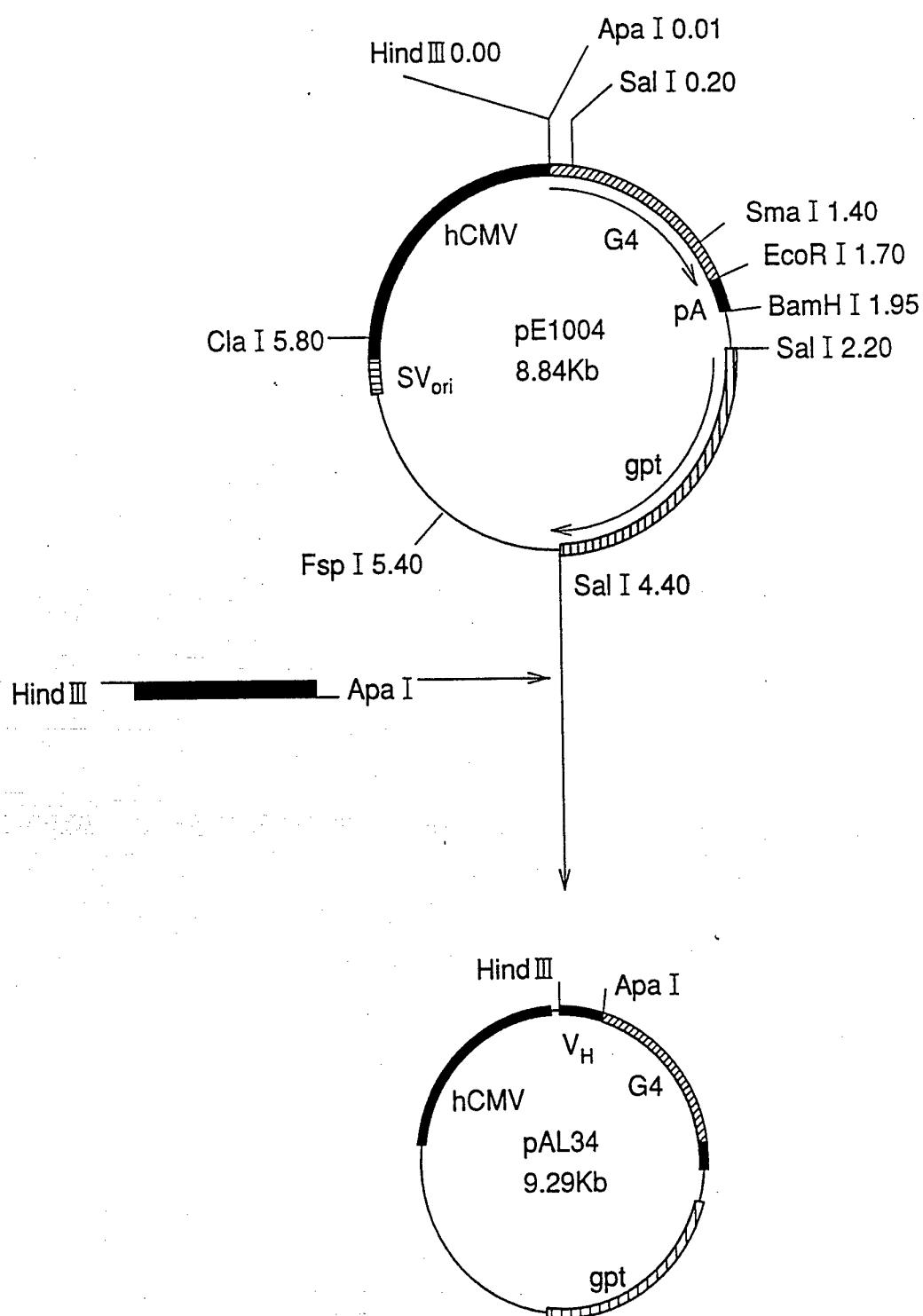


图 12



☒ 13

AAGCTTGC~~C~~CCACC
TTCGA~~A~~CGGCGGTGG
Hind III

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
ATG GAA TGG AGC TGG GTC TTT CTC TTC TTC CTG TCA GTA ACT ACA GGA
TAC CTT ACC TCG ACC CAG AAA GAG AAG GAC AGT CAT TGA TGT CCT

Val His Ser Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
GTC CAT TCT CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGA GGA GGA GTG GTG CAG
CAG GTA AGA GTC CAC GTC GAC CAC CTC AGA CCT CCT CAC CAC GTC

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
CCT GGA AGA TCT CTG AGA CTG TCT TGT AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC
GGA CCT TCT AGA GAC TCT GAC AGA ACA TTC CGT AGA CCT ATG TGG AAG

Arg Asn Tyr Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
AGA AAC TAC GGC ATG AAT TGG GTG AAA CAG GCA CCT GGA AAG GGA CTC
TCT TTG ATG CCG TAC TTA ACC CAC TTT GTC CGT GGA CCT TTC CCT GAG

Lys Trp Met Gly Trp Ile Ser Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala
AAG TGG ATG GGA TGG ATT TCT ACA TAC ACA GGA GAG CCT ACG TAC GCA
TTC ACC TAC CCT ACC TAA AGA TGT ATG TGT CCT CTC GGA TGC ATG CGT

Asp Asp Phe Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ala Ser
GAC GAC TTC AAG GGA AGA TTC ACA TTT TCT CTG GAC ACA TCT GCA TCT
CTG CTG AAG TTC CCT TCT AAG TGT AAA AGA GAC CTG TGT AGA CGT AGA
Spl I

Thr Ala Phe Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Gly Val
ACA GCT TTC CTG CAG ATG GAC TCT CTG AGA CCT GAG GAC ACA GGA GTG
TGT CGA AAG GAC GTC TAC CTG AGA GAC TCT GGA CTC CTG TGT CCT CAC

Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Leu Tyr Tyr Phe Gly Ser Ser Tyr Ala Leu
TAC TTC TGT GCA AGA GGA CTG TAC TAC TTC GGA TCT TCT TAC GCA CTG
ATG AAG ACA CGT TCT CCT GAC ATG ATG AAG CCT AGA AGA ATG CGT GAC

Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Pro Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
GAC TAC TGG GGA CAG GGA ACA CCT GTG ACA GTG TCT TCT GCC TCA ACG
CTG ATG ACC CCT GTC CCT TGT GGA CAC TGT CAC AGA AGA CGG AGT TGC

Lys Gly Pro
AAG GGC CCG
TTC CCG GGC
Apa I

図 14

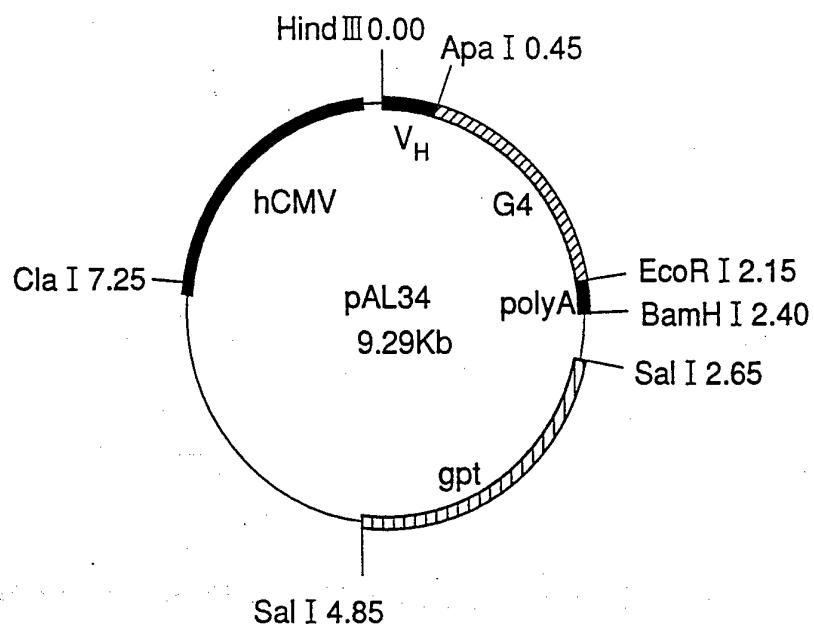


図 15

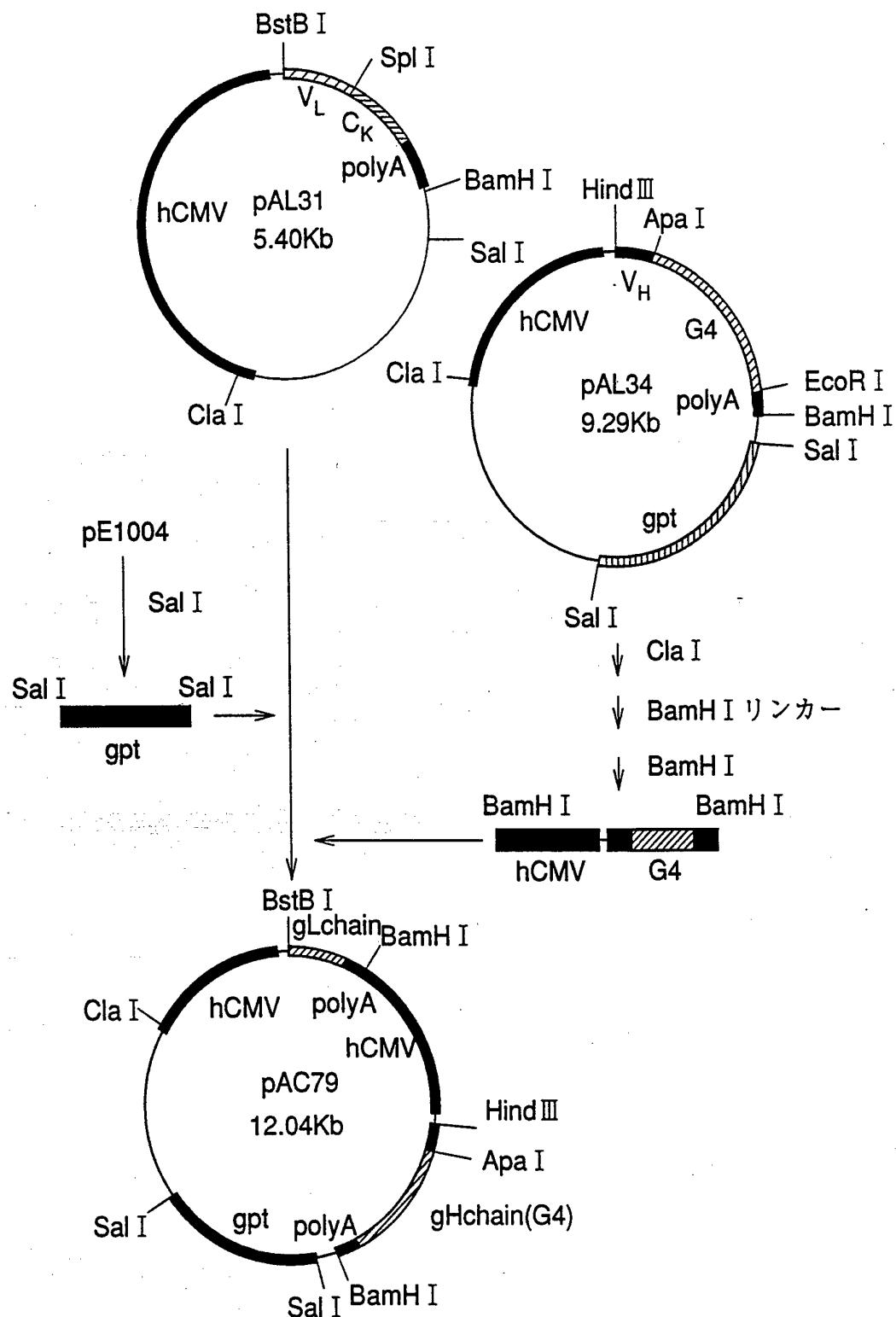


図 16

オリゴヌクレオチド	塩基配列	塩基数
EUNEW-2 0	5' GGCGGGTGAAGGCCACATG 3'	24
EUNEW-1	5' GGCGGGTGAAGGCCACATGCTGCCCCAACAAAGTCCTGGTCTCTGCTGGCTTA Bst <u>B</u> I	69
L-REI VEC 1	L L W L T D I Q M T Q S P S S L S A S V G 3' AGGAGACGACACUCAATGTAATGTTACACTGAAGTTACTGGTCTGGTAGGTAGCTGGTACAGCATCT 5'	80
L-REI VEC 2	L S A S V G D R V T xxxxxxxx G T K L Q I T R T 5' GCCTGAGGCATCTGTAGGAGACGGGTACCGCAGCTGAGGGTACCAATTGCAAGTCACACGTACGGGCGGG 3' Bst <u>E</u> II <u>Kpn</u> I	75
L-REI VEC 3	3' CGCTAGTGTGCAATGCCGGGCC 5' Spt <u>T</u>	22

但し、xに對応するDNA配列はアミノ酸をコードするものではない。

図 17

M S V P T Q V L G L L L W L T D A R C D I Q M
 GGCGGGTT[CGAAGCCGCCACCATGCTGTCCCCACCAAGTCCCTCGGTCTCCTGCTGCTGTGGCTTACAGATGCCAGATGTGACATTCAAATG
 CGGGCCAAGG[GTCGGGGTGTACAGACAGGGGTCAAGAGGGAGCCAGGACACCGAACCCGAATGTCTACACTGAAGTTAC

Bst BI

T Q S P S S L S A S V G D R [V T xxxxxxxxxG T] K L Q I T R T
 ACCCAGAGCCCATTCCAGGCCATCTGTAGGGAGCCGGTCACTGCAGCTGAGGTACAAATTGAGATCACAC[GTA]CGGGCGG
 TGGGTCTCGGGTAGGTGGACTCGCGTAGACATCCTCTGGCCCA[GTC]GCGTCGACGTCC[GATGTTAACGCTAGTGTGCATGCCGGCC
 Bst B II Kpn I Sph I

但し、x に対応する DNA 配列はアミノ酸をコードするものではない。

図 18

L 鎌ブライマー-1 (21)
GACAGGGTCAACCACATCATGT

D R V T I T C R T S Q * Y I L 1 - L 1 (81)
GACCGGGTCAACCACATCATGTAGAACATCTCAGGACATCAACAAACCTGAACACTGAACTGGTATCAGGAGACACACTGGAAAGGCTCCATAAGCTGCTG
CTGCCCACTGGTAGTGACATCTTGAGAGTCCTGTAGTTGGACTTGACCATAGTCGTCTGTGACCTTCCGAGGATTGACGAC
* Y I L 1 - L 2 (81)

Bst E II

I Y Y T S R L H S G V P * Y I L 1 - L 3 (90)
ATCTACTACACATCTCGTCTGCATTCTGGAGTCCTCTAGATCTCTGGCTCTGGAAACAGACTACACATTCAAATCTCTCTCTC
TAGGATGATGTTAGGGAAAGACCTCAGGAGACGTAAAGACCTGAAAGACATQTAAGAGACCAAGACCGAGACCTGTTAGTGTGTAAGTGTGTTAGAGAAGAG
* Y I L 1 - L 4 (75)

Xba I

Q P E D I A T Y Y C Q Q G K T L P W T F G Q G T K L
CAACCTGAGGACATCTGCTACTACATACTGCTGAAAGACACTGGACATTGGACAGGGTACCAAGCTG
GTTGGACTCCTGTAGCGATGTATGACGGTGTCTGCCTTTCTGTGACGGAAACCTGTTAGCCTGTCGAC
AAGCCTGTCCTCATGCTGTTGCGAC
L 鎌ブライマー-2(21)

Kpn I

図 19

† Ⅳ ɔ' I L - 1 / H 1 M E W S W V F L F F L S V T T G V H S Q V Q L V
GGCGCAAGCTGCCACCATGGAATGGAGCTGGTCTTCTCTTCAGTAACTACAGGAGTCATTCTCAGGGTGCAGCTGGTG
CGCGCGTTGAAACGGGGTGGTACCTTAACCTCGACCCAGAAAGAGAAGAAAGAAAGAAGAAAGTCCACGTGACAC
Hind III

† Ⅳ ɔ' I L - 1 / H 5

B S G G V V P G R S L R L S C K A S G Y T F R N Y G M N W
GAGTCTGGAGGAGGAGTGGTGCAGGCCACTGAGACTCTGTCTGAGACTCTGTCTGAGACTCTAGAGACTCTAGAGACT
CTCAGACCTCCTCACCACTGGACCTTCTAGAGACTCTGACAGAACATCCGTAGACAGAACATTCGGTAGACCT
† Ⅳ ɔ' I L - 1 / H 9

V K Q A P G K G L K W M G W I S T Y T G E P T Y A D D F K G R
GTGAAACAGGCCACCTGGAAGGGACTCAAGTGGATGGGATGGATTCTACATAACAGGAGACCTACTACGCGAGACGACT
CACCTTGTCTGGACTTCCCTGAGTTACCTACCTAACCTAACCTAACCTAACCTAACCTAACCTAACCTAACCTAAC
† Ⅳ ɔ' I L - 1 / H 11

SpI I
† Ⅳ ɔ' I L - 1 / H 10

F T F S L D T S A S T A F L Q M D S L R P B D T G V Y F C A R
TTCACATTCTCTGGACACATCTGCATCTACAGCTTCCCTGCAAGATGGACTCTCTGAGACCTGAGAGACTCTGGACT
AAGTGTAAAAGAGACCTGTAGACGTAGATGTCTGAGACTCTACCTGAGAGACTCTGGACTCTGGACTCTGGACT
† Ⅳ ɔ' I L - 1 / H 7

† Ⅳ ɔ' I L - 1 / H 4
G L Y F G S S Y A L D Y W G Q G T P V S S A S T K G P
GGACTGTACTACTCGGATCTCTTACGGCACTGGACTACTGGGACAGGGAACACCTGTGACAGTGTCTTCTGCCTAAC
CCTGACATGATGAAAGCCTAGAAGAATGCGTAGCTGATGACCCCTGTCCCTGTGAGACTGTACAGAAAGACGGAGT
Apal

† Ⅳ ɔ' I L - 1 / H 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP93/00941

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C12P21/08, C12N15/13, 15/62// (C12P21/08, C12R1:91)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12P21/02, 21/08, C12N15/13, 15/62

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 63-258595 (Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd.), October 26, 1988 (26. 10. 88), & EP, A2, 267611 & KR, B, 9004420	1-13
A	JP, A, 62-296890 (Gregory Poll Winter), December 24, 1987 (24. 12. 87), & EP, A2, 239400 & GB, A, 2188638	1-13

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier 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 when the document is taken alone

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

October 1, 1993 (01. 10. 93)

Date of mailing of the international search report

October 19, 1993 (19. 10. 93)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP 93/00941

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. Cl⁶ C 12 P 21/08, C 12 N 15/13, 15/62//
 (C 12 P 21/08, C 12 R 1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. Cl⁶ C 12 P 21/02, 21/08, C 12 N 15/13, 15/62

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P, A, 63-258595 (大塚製薬株式会社), 26. 10月. 1988 (26. 10. 88) & EP, A2, 267611 & KR, B, 9004420	1-13
A	J P, A, 62-296890 (グレゴリー ポール ウィンタ ー), 24. 12月. 1987 (24. 12. 87) & EP, A2, 239400 & GB, A, 2188638	1-13

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 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文献

国際調査を完了した日 01.10.93	国際調査報告の発送日 19.10.93
名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号100 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官(権限のある職員) 内田俊生 ㊞ 4 B 8 2 1 4 電話番号 03-3581-1101 内線 3449