

(12)特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年1月11日 (11.01.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/02012 A1

- (51) 国際特許分類⁷: A61K 45/00, 39/395, A61P 3/14, 5/18 (74) 代理人: 平木祐輔, 外(HIRAKI, Yusuke et al.); 〒105-0001 東京都港区虎ノ門一丁目17番1号 虎ノ門5森ビル3F Tokyo (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/04523
- (22) 国際出願日: 2000年7月6日 (06.07.2000) (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願平11/192270 1999年7月6日 (06.07.1999) JP (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒115-8543 東京都北区浮間五丁目5番1号 Tokyo (JP).

- (72) 発明者; および
(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 齋藤英美 (SAITO, Hidemi) [JP/JP], 恒成利明 (TSUNENARI, Toshiaki) [JP/JP], 小沼悦郎 (ONUMA, Etsuro) [JP/JP]; 〒412-8543 静岡県御殿場市駒門一丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP).

添付公開書類:
— 国際調査報告書

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: REMEDIES FOR DRUG-RESISTANT HYPERCALCEMIA

(54) 発明の名称: 薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤

(57) Abstract: Remedies for drug-resistant hypercalcemia which contain as the active ingredient a substance inhibiting the binding of a parathyroid hormone-related peptide to its receptor.

(57) 要約:

副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤。



WO 01/02012 A1

明 細 書

薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤

5 技術分野

本発明は副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone related protein (PTHrP)) とその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤に関する。

10 背景技術

HHM (悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症) の薬物療法では、補液・ループ利尿剤や骨吸収抑制剤 (ビスフォスフォネート製剤、カルシトニン製剤) の投与が行われる。現在汎用されている薬物治療としては、カルシトニン投与、ビスフォスフォネート投与などの単独投与のほか、カルシトニン+ビスフォスフォネート併用投与などの各方法がある。

カルシトニン投与による効果は極めて速効性であり、投与後数時間ですぐに効果は発現する。その効果は、主に骨吸収抑制作用に基づくものである。使用方法は、カルシトニン製剤 (40~80単位) を朝夕2回筋注又は静注する。

一方、ビスフォスフォネートは、非常に強力な骨吸収抑制作用に基づく薬剤であるが、効果発現まで3~4日を要する遅効性の薬剤である。従って、カルシトニン製剤と、速効性はないが強力な骨吸収抑制作用を有するビスフォスフォネート製剤との併用療法も行われている。

しかし、ビスフォスフォネート製剤及びカルシトニン製剤は以下の点で使用が制限される場合がある。

25 ①ビスフォスフォネート製剤：

- ・骨吸収は阻害するが、腎でのカルシウム排泄を改善しない。
- ・効果発現まで3~4日を要する遅効性である。
- ・血中PTHrP濃度の高い患者 (12pmol/L以上) では有効性が低く、効果の持続時

間も短い。

・連投により効果が減弱する。また、連投に当たっては初回投与による反応を確認するために最低1週間は投与間隔を空けることが必要である。

・低カルシウム血症が出現することがある。

5 ②カルシトニン製剤：

12～24時間でカルシウム値減少効果は最大に達するが、その後連続投与を行っても4～5日で再上昇を示す場合があり、いわゆる「エスケープ現象」として知られている。

従って、上記薬剤は、いずれも連投により効果が減弱する点、あるいは耐性が出現するなどの点で、臨床上の使用に制限がある。また、HHM患者のQOL改善効果について十分ではない。

発明の開示

本発明は、PTHrPとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、
15 薬剤抵抗性高カルシウム血症に対する治療剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、上記課題を解決するため鋭意研究を重ねた結果、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質により、骨吸収抑制剤等の既存の高カルシウム血症治療剤に対して抵抗性的高カルシウム血症が改善し得ることを見出し、本発明を完成するに至った。

20 すなわち、本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤である。薬剤抵抗性高カルシウム血症は、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質以外の高カルシウム血症治療薬に対して抵抗性を示す、高カルシウム血症であるとよい。また、上記物質としては、副甲状腺ホルモン関連
25 ペプチド受容体に対するアンタゴニスト、抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体（ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でもよいが、好ましくはモノクローナル抗体である。例えばヒト型化又はキメラ化されたモノクローナル抗体、ヒト抗体等）、該抗体の断片及び／又はその修飾物が挙げられる。ここで、ヒト型

化抗体としては、ヒト型化#23-57-137-1抗体が挙げられる。さらに、薬剤抵抗性高カルシウム血症としては、癌由来のものが挙げられる。

薬剤とは、高カルシウム血症に対して治療効果を示す薬剤であれば、いかなる薬剤でもよく、例えば、骨吸収抑制剤、カルシウム排泄促進剤、腸管からのカルシウム吸収抑制剤、またはループ利尿剤等が挙げられる。

薬剤抵抗性高カルシウム血症とは、高カルシウム血症に対して治療効果を示す薬剤を連続投与することにより、該薬剤に対して抵抗性を示す高カルシウム血症のことをいい、例えば、骨吸収抑制剤、カルシウム排泄促進剤、腸管からのカルシウム吸収抑制剤、ループ利尿剤または破骨細胞阻害剤等に対する抵抗性高カルシウム血症が挙げられ、好ましくは、骨吸収抑制剤抵抗性高カルシウム血症を示す。

ここで、骨吸収抑制剤としては、ビスフォスフォネート、カルシトニン等が挙げられる。ビスフォスフォネートとしては、例えば、アレンドロネート、パミドロネート、インカドロネート等が挙げられる。カルシトニンとしては、例えば、カルシトニン、エルカトニン、サケカルシトニン等が挙げられる。

カルシウム排泄促進剤としては、カルシトニンやループ利尿剤等が挙げられる。

腸管からのカルシウム吸収抑制剤としては、糖質コルチロイド、無機リン酸塩等が挙げられる。

ループ利尿剤としては、フロセミド等が挙げられる。

破骨細胞阻害剤としては、アクチノマイシンD、シスプラチン、ミスラマイシン等の抗癌剤等が挙げられる。

以下、本発明を詳細に説明する。

本明細書は、本願の優先権の基礎である日本国特許出願第11-192270号の明細書及び／又は図面に記載される内容を包含する。

本発明は、副甲状腺ホルモン関連ペプチド (Parathyroid hormone related protein: PTHrP) とその受容体 (PTHrP受容体) との結合を阻害する物質を有効成分として含む薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤である。

本明細書中で「PTHrP受容体」としては、例えば特表平6-506598号公報に記載

されているPTHrPと結合する受容体が挙げられ、標的器官上（例えば骨や腎臓）に存在するPTHrP受容体か否かを問わない。

また、「PTHrPとPTHrP受容体との結合を阻害する物質」とは、PTHrPに結合することにより、PTHrPがPTHrP受容体と結合することを阻害する物質（例えば抗PTHrP抗体）、およびPTHrP受容体に結合することにより、PTHrPがPTHrP受容体と結合することを阻害する物質（例えばPTHrP受容体に対するアンタゴニスト（PTHrPアンタゴニストともいう）、具体的にはPTHrPペプチドの少なくとも一つのアミノ酸を置換、欠失したものやPTHrPペプチドの部分配列などを指す）のいずれか一方又は両方を指す。

10 抗PTHrP抗体としては、例えばヒト型化抗体、ヒト抗体（W096/33735号公報）又はキメラ抗体（特開平4-228089号公報）などの抗体のほか、ハイブリドーマ#23-57-137-1によって産生される抗体（#23-57-137-1抗体）などが挙げられる。なお、抗体はポリクローナル抗体でもよいがモノクローナル抗体であることが好ましい。また、PTHrPアンタゴニストとしては、ポリペプチド又は低分子などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。例えばPTHrPに対して拮抗的にPTHrP受容体に結合する物質としては、PTHrP(7-34)、PTHrP(8-34)、PTHrP(9-34)、PTHrP(10-34)又はこれらの変異体（数個のアミノ酸が置換、欠損または付加されたもの）、或いはこれらのアミド体等が挙げられる。さらに、特開平7-165790号公報、特表平5-509098号公報又はPeptides (UNITED STATES) 1995, 16 (6) 103

15 1-1037、Biochemistry (UNITED STATES) Apr. 28 1992, 31 (16) 4026-4033に記載のPTHrPアンタゴニスト活性を有するポリペプチドが挙げられる。また、上記例示のポリペプチドのうち、少なくとも1個のアミノ酸が欠失、置換、付加、挿入されたポリペプチドであって、同等のPTHrPアンタゴニスト活性を有するものも本発明のPTHrPアンタゴニストに含まれる。

25 本発明では、「PTHrPとPTHrP受容体との結合を阻害する物質」として抗PTHrP抗体を例に説明する。

1. 抗PTHrP抗体

本発明で使用される抗PTHrP抗体は、薬剤抵抗性高カルシウム血症の治療効果

を有するものであれば、その由来、種類（モノクローナル、ポリクローナル）および形状を問うものではない。

本発明で使用される抗PTHrP抗体は、公知の手段を用いてポリクローナルまたはモノクローナル抗体として得ることができる。本発明で使用される抗PTHrP抗体として、特に哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好ましい。哺乳動物由来のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマに産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主に産生されるものを含む。この抗体はPTHrPと結合することにより、PTHrPがPTH/PTHrP受容体に結合するのを阻害してPTHrPのシグナル伝達を遮断し、PTHrPの生物学的活性を阻害する抗体である。

このような抗体としては、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1により産生される#23-57-137-1抗体が挙げられる。

なお、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日付で、FERM BP-5631としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

2. 抗体産生ハイブリドーマ

モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、以下のようにして作製できる。すなわち、PTHrPを感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

まず、抗体取得の感作抗原として使用されるヒトPTHrPを、Suva, L. J. et al., Science (1987) 237, 893に開示されたPTHrP遺伝子/アミノ酸配列を発現することによって得る。すなわち、PTHrPをコードする遺伝子配列を公知の発現ベクター系に挿入して適当な宿主細胞を形質転換させた後、その宿主細胞中または培養上清中から目的のPTHrPタンパク質を公知の方法で精製する。

次に、この精製PTHrPタンパク質を感作抗原として用いる。あるいは、PTHrPの

N末端の34個のペプチドについて、化学合成により作製することもでき、これを感作抗原として使用することもできる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与する。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することもできる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞を採取し、細胞融合に付されるが、好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞を用いる。このミエローマ細胞は、公知の種々の細胞株、例えば、P3 (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 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148, 313-323)、R210 (Galfre, G. et al., Nature (1979) 277, 131-133) 等が好適に使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合は、基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein, C., Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は、例えば細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

- 5 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定することができる。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI 1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することも
- 10 できる。

- 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37°C程度に加温したPEG溶液 (例えば平均分子量1000-6000程度) を通常30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) を形成する。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して
- 15 上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去する。

- このようにして得られたハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えばHAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。上記HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間 (通常、数日~数週間)
- 20 継続する。ついで、通常の実験希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングを行う。

- また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球を *in vitro* でPTHrPに感作し、感作リンパ球をヒト由来の永久分裂能を
- 25 有するミエローマ細胞と融合させ、PTHrPへの結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる (特公平1-59878号公報参照)。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるPTHrPを投与して抗PTHrP抗体産生細胞を取得し、これを不死化させた細胞からPTHrPに対する

ヒト抗体を取得してもよい（国際公開番号W0 94/25585 号公報、W0 93/12227 号公報、W0 92/03918 号公報、W0 94/02602 号公報参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存
5 することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。
10

3. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型のものを用いることができる（例えば、Vand
15 amme, A. M. et al., Eur. J. Biochem. (1990) 192, 767-775, 1990参照）。

具体的には、抗PTHrP抗体を産生するハイブリドーマから、抗PTHrP抗体の変
(V) 領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法（Chirgwin, J. M. et al., Biochemistry (1979) 18, 52
94-5299）、AGPC法（Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 15
20 6-159）等により行って全RNAを調製し、mRNA Purification Kit（Pharmacia
製）等を使用して目的のmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification
Kit（Pharmacia製）を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等を用いて行う。また、cDNAの合成および増幅を行うには、5'-Ampli
25 li FINDER RACE Kit（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002, Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932）等を使用することが

できる。

得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作製し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。そして、目的とするDNAの塩基配列を公
5 知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェーンターミネーション法により確認する。

目的とする抗PTHrP抗体のV領域をコードするDNAを得たのち、これを、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを含有する発現ベクターへ組み込む。

本発明で使用される抗PTHrP抗体を製造するには、抗体遺伝子を発現制御領域、
10 例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより、宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。

抗体遺伝子の発現は、抗体重鎖（H鎖）または軽鎖（L鎖）をコードするDNAを別々に発現ベクターに組み込んで宿主細胞を同時形質転換させてもよいし、ある
15 いはH鎖およびL鎖をコードするDNAを単一の発現ベクターに組み込んで宿主細胞を形質転換させてもよい（WO 94/11523 号公報参照）。

また、組換え型抗体の産生には上記宿主細胞だけではなく、トランスジェニック動物を使用することができる。例えば、抗体遺伝子を、乳汁中に固有に産生される蛋白質（ヤギβカゼインなど）をコードする遺伝子に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ
20 注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい（Ebert, K.M. e
25 t al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702）。

4. 改変抗体

本発明では、上記抗体のほかに、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ抗体、ヒト

型化 (Humanized) 抗体を使用できる。これらの改変抗体は、以下の方法を用いて製造することができる。

本発明に有用なキメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得ることができる。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、これは、ヒト以外の哺乳動物、例えばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号EP 125023号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

具体的には、マウス抗体のCDRとヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) とを連結するように設計したDNA配列を、CDR及びFR両方の末端領域にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCR法により増幅する。得られたDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることによりヒト型化抗体を得ることができる (EP 239400号公報、WO 96/02576 号公報参照)。

CDRを介して連結されるヒト抗体のフレームワーク領域は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように、抗体の可変領域におけるフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K.etal., Cancer Res. (1993) 53, 851-856)。

キメラ抗体及びヒト型化抗体のC領域には、ヒト抗体のものが使用され、例えばH鎖では、C γ 1、C γ 2、C γ 3、C γ 4を、L鎖ではC κ 、C λ を使用することができる。また、抗体またはその産生の安定性を改善するために、ヒト抗体C領域を修飾してもよい。

キメラ抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来の定常領域とからなる。一方、ヒト型化抗体は、ヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性

決定領域と、ヒト抗体由来のフレームワーク領域およびC領域とからなる。ヒト型化抗体はヒト体内における抗原性が低下されているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用できるヒト型化抗体としてはヒト型化#23-57-137-1抗体が挙げられる。ヒト型化#23-57-137-1抗体は、マウス由来の#23-57-137-1抗体の相補性決定領域を、L鎖についてはヒト抗体HSU03868 (GEN-BANK, Deftos Mら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994) 由来の3つのFR断片 (FR1、FR2およびFR3) 並びにヒト抗体S25755 (NBRF-PDB) 由来のFR断片 (FR4) に連結したものであり、H鎖についてはヒト抗体S31679 (NBRF-PDB、Cuisinier AMら, Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993) のフレームワーク領域と連結し、抗原結合活性を有するようにフレームワーク領域のアミノ酸残基を一部置換したものである。

なお、ヒト型化#23-57-137-1抗体のL鎖またはH鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成8年8月15日付で、H鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌であるEscherichia coli JM109 (hMBC1HcDNA/pUC19) についてはFERM BP-5629として、L鎖をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌であるEscherichia coli JM109 (hMBC1Lqλ/pUC19) についてはFERM BP-5630として、ブダペスト条約に基づきそれぞれ国際寄託されている。

5. 抗体修飾物

本発明で使用される抗体は、PTHrPに結合し、PTHrPの活性を阻害するかぎり、抗体の断片又はその修飾物であってよい。例えば、抗体の断片としては、Fab、F(ab')₂、Fv、またはH鎖若しくはL鎖のFvを適当なリンカーで連結させたシングルチェーンFv (scFv) が挙げられる。具体的には、抗体を酵素、例えばパパイン、ペプシンで処理し抗体断片を生成させるか、または、これら抗体断片をコードする遺伝子を構築し、これを発現ベクターに導入した後、適当な宿主細胞で発現させる (例えば、Co, M.S. et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976、Better, M. & Horwitz, A. H. Methods in Enzymology (1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Plueckthun, A. & Skerra, A. Methods in Enzymology

(1989) 178, 476-496, Academic Press, Inc., Lamoyi, E., Methods in Enzymology (1989) 121, 652-663, Rousseaux, J. et al., Methods in Enzymology (1989) 121, 663-669, Bird, R. E. et al., TIBTECH (1991) 9, 132-137 参照)。

- 5 scFvは、抗体のH鎖V領域とL鎖V領域とを連結することにより得られる。このscFvにおいて、H鎖V領域とL鎖V領域は、リンカー、好ましくはペプチドリンカーを介して連結される (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85, 5879-5883)。scFvにおけるH鎖V領域およびL鎖V領域は、本明細書に抗体として記載されたもののいずれの由来であってもよい。V領域を連結する
- 10 ペプチドリンカーとしては、例えばアミノ酸12-19残基からなる任意の一本鎖ペプチドが用いられる。

- scFvをコードするDNAは、前記抗体のH鎖またはH鎖V領域をコードするDNA、およびL鎖またはL鎖V領域をコードするDNAのうち、それらの配列のうちの全部又は
- 15 イマー対を用いてPCR法により増幅し、次いで、さらにペプチドリンカー部分をコードするDNA、およびその両端が各々H鎖、L鎖と連結されるように規定するプライマー対を組み合わせて増幅することにより得られる。

- また、一旦scFvをコードするDNAが作製されると、それらを含む発現ベクター、および該発現ベクターにより形質転換された宿主を常法に従って得ることが
- 20 でき、また、その宿主を用いることにより、常法に従ってscFvを得ることができる。

これら抗体の断片は、前記と同様にしてその遺伝子を取得し発現させ、宿主により産生させることができる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体の断片も包含される。

- 25 抗体の修飾物として、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合した抗PTHrP抗体を使用することもできる。本発明における「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物は、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。なお、抗体の修飾方法はこの分野にお

いてすでに確立されている。

6. 組換え型抗体または改変抗体の発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現させる抗体遺伝子、その3'側下流にポリAシグナルを機能的に結合させて発現させること
5 ができる。例えばプロモーター/エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター/エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げるることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター/エン
10 ハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター/エンハンサー、あるいはヒトエロンゲーションファクター1 α (HEF1 α) などの哺乳類細胞由来のプロモーター/エンハンサー等が挙げられる。

SV 40プロモーター/エンハンサーを使用する場合はMulliganらの方法 (Natu
15 re (1979) 277, 108) により、また、HEF1 α プロモーター/エンハンサーを使用する場合はMizushimaらの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) により、容易に遺伝子発現を行うことができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列及び発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて当該遺伝子を発現させること
20 ができる。プロモーターとしては、例えばlacZプロモーター、araBプロモーターを挙げるることができる。lacZプロモーターを使用する場合はWardらの方法 (Natu re (1098) 341, 544-546 ; FASEB J. (1992) 6, 2422-2427) により、あるいはaraBプロモーターを使用する場合はBetterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) により発現することができる。

25 抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。そして、ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切に組み直して (refold) 使用する。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシパピローマウイルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは、選択マーカーとしてアミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、
5 大腸菌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 (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の発現系、例えば真核細胞又は原核細胞系を使用することができる。真核細胞としては、例えば樹立された哺乳類細胞系、昆虫細胞系、真糸状菌細胞および酵母細胞などの動物細胞等が挙げられ、
10 原核細胞としては、例えば大腸菌細胞等の細菌細胞が挙げられる。

好ましくは、本発明で使用される抗体は、哺乳類細胞、例えばCHO、COS、ミエローマ、BHK、Vero、HeLa細胞中で発現される。

次に、形質転換された宿主細胞を *in vitro* または *in vivo* で培養して目的とする抗体を産生させる。宿主細胞の培養は公知の方法に従い行う。例えば、培養液
15 として、DMEM、MEM、RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

7. 抗体の分離、精製

前記のように発現、産生された抗体は、細胞、宿主動物から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークラムを用いて行うことができる。例えば、プロテインAカラムを用いたカラム
20 として、Hyper D、POROS、Sepharose F.F. (Pharmacia製) 等が挙げられる。その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークラム以外のクロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせることにより、抗体を分離、精製することができる (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 198
25 8)。

8. 抗体の活性の確認

本発明で使用される抗体の抗原結合活性 (Antibodies A Laboratory Manual. Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)、リガン ドレセプター結合阻害活性 (Harada, A. et al., International Immunology (1993) 5, 681-690) の測定には公知の手段を使用することができる。

- 5 本発明で使用される抗PTHrP抗体の抗原結合活性を測定する方法として、ELISA (酵素結合免疫吸着検定法)、EIA (酵素免疫測定法)、RIA (放射免疫測定法) あるいは蛍光抗体法を用いることができる。例えば、酵素免疫測定法を用いる場合、PTHrP (1-34) をコーティングしたプレートに、抗PTHrP抗体を含む試料、例えば、抗PTHrP抗体産生細胞の培養上清や精製抗体を加える。アルカリフォスファターゼ等の酵素で標識した二次抗体を添加し、プレートをインキュベートし、洗淨した後、p-ニトロフェニル燐酸などの酵素基質を加えて吸光度を測定することで抗原結合活性を評価することができる。

本発明で使用される抗体の活性を確認するには、抗PTHrP抗体の中和活性を測定する。

15 9. 投与方法および製剤

本発明の治療剤は、薬剤抵抗性高カルシウム血症に対する治療又は改善を目的として使用される。また、薬剤抵抗性高カルシウム血症の種類は癌由来のものであるか否かを問わない。例えば、癌由来のものとして、悪性腫瘍随伴性高カルシウム血症が挙げられる。

- 20 また、癌由来でないものとして、妊婦若しくは授乳婦に見られる周産期高カルシウム血症、又は新生児期高カルシウム血症などが挙げられる。

本発明の抗PTHrP抗体を有効成分として含有する治療剤は、経口、非経口投与のいずれでも可能であるが、好ましくは非経口投与であり、具体的には経肺剤型 (例えばネフライザーなどの器具を用いた経肺投与剤)、経鼻投与剤型、経皮投与剤型 (例えば軟膏、クリーム剤)、注射剤型等が挙げられる。注射剤型の例としては、例えば点滴等の静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射等により全身又は局部的に投与することができる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1kgあたり0.0

01mg~1000mg、好ましくは0.1mg~50mg、さらに好ましくは0.5mg~10mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり0.01~100000mg/body、好ましくは1~5000mg/body、さらに好ましくは10~500mg/bodyの投与量を選ぶことができる。しかしながら、本発明の抗PTHrP抗体を含有する治療剤はこれらの投与量に制限されるものではない。

また、投与時期としては、薬剤抵抗性高カルシウム血症が生ずる前後を問わず投与してもよく、あるいは体重減少が予測される時に投与してもよい。

本発明の抗PTHrP抗体を有効成分として含有する治療剤は、常法にしたがって製剤化することができ (Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, 米国)、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。

このような担体および医薬添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、寒天、ポリエチレングリコール、ジグリセリン、グリセリン、プロピレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン (HSA)、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面活性剤等が挙げられる。

実際の添加物は、本発明治療剤の剤型に応じて上記の中から単独で又は適宜組み合わせで選ばれるが、これらに限定するものではない。例えば、注射用製剤として使用する場合、精製された抗PTHrP抗体を溶剤、例えば生理食塩水、緩衝液、ブドウ糖溶液等に溶解し、これに吸着防止剤、例えばTween80、Tween 20、ゼラチン、ヒト血清アルブミン等を加えたものを使用することができる。あるいは、使用前に溶解再構成する剤形とするために凍結乾燥したものであってもよく、凍結乾燥のための賦形剤としては、例えば、マンニトール、ブドウ糖等の糖アルコールや糖類を使用することができる。

図面の簡単な説明

図1は、ビスフォスフォネート製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物での薬効試験結果を示す図である。

- 5 図2は、ビスフォスフォネート製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物での薬効試験結果を示す図である。

図3は、カルシトニン製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物での薬効試験結果を示す図である。

- 10 図4は、カルシトニン製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物での薬効試験結果を示す図である。

発明を実施するための最良の形態

以下、参考例および実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明は、これら実施例等にその技術的範囲を限定するものではない。

- 15 [実施例1] ビスフォスフォネート製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物での薬効試験

(1) 目的

- 20 ヒト腫瘍－ヌードラット移植系の高カルシウム血症モデル動物を用いて、ビスフォスフォネート製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物を作製し、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体の血中カルシウム濃度に対する治療効果を検討した。

(2) 方法

- 25 モデル動物としてヒト肺大細胞癌LC-6（（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードラットを用いた。ヒト肺大細胞癌LC-6を移植されたヌードラットは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少などの症状を発症する。高カルシウム血症を発症後ビスフォスフォネート製剤の一種であるアレンドロネートを連続的に投与し、その血中カルシウム濃度改善効果が認められなくなったモデル、すなわちビスフォスフォネート製剤に抵抗性を獲得したモデル

を作製した。なお、ヒト肺大細胞癌LC-6の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を用いてin vivoで行った。

ビスフォスフォネート抵抗性を獲得した高カルシウム血症の症状を有するラットに対して、ヒト型化モノクローナル抗体が改善することを、体重および血中カルシウム濃度を指標にして評価した。

薬効評価には、5週齢雄性F344/N Jcl-rnuヌードラット（日本クレア）を購入し、1週間の馴化の後6週齢の動物に腫瘍を移植し、血中カルシウム濃度が上昇しかつ体重減少している動物を高カルシウム血症モデル動物として使用した。

ビスフォスフォネート製剤抵抗性高カルシウム血症モデル動物の作製および群分けは、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト肺大細胞癌LC-6を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をラットの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植してから1ヶ月半程度後に、血中カルシウム濃度が上昇しかつ体重減少している動物を高カルシウム血症モデル動物とし、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けした。

高カルシウム血症モデル動物に、既に高カルシウム血症治療薬として処方されているアレンドロネート（アレンドロン酸ナトリウム水和物注射液，テイロック注，帝人株式会社）を2.5mg/kgの用量で尾静脈内に週2回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を尾静脈内に週2回投与した。アレンドロネートを5回（0日、3日、7日、10日、14日目）投与することにより血中カルシウム濃度改善効果が認められなくなった動物を、ビスフォスフォネート製剤抵抗性高カルシウム血症モデル動物とし、17日目に血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けした。

ビスフォスフォネート製剤抵抗性高カルシウム血症に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。上記で作製、群分けしたビスフォスフォネート製剤抵抗性高カルシウム血症モデル動物に、3mg/kgのPTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体、2.5mg/kgアレンドロネートを尾静脈内に投与した。対照群には続けてリン酸バッファー生理食塩水（PBS）を尾静脈内に投与した。

血中カルシウム濃度および体重の測定は、アレンドロネート、リン酸バッファ

一生理食塩水（PBS）を投与後、3日、7日、10日、14日、17日目に行った。17日目にアレンドロネート投与群に関して、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、ヒト型化モノクローナル抗体、アレンドロネート投与を行った。対照群には続けてPBS投与を行った。ヒト

5 型化モノクローナル抗体、アレンドロネート投与後、4日目、7日目に血中カルシウム濃度および体重を測定し、薬効評価を行った。

血中カルシウム濃度は、尾静脈よりヘマトクリット管で採血し、643自動Ca/pHアナライザー（CIBA-CORNING）を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。

10 (3) 結果

ビスフォスフォネート製剤を週2回、合計5回連続投与することにより、ビスフォスフォネート製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物を作製できた。ヒト型化モノクローナル抗体は、ビスフォスフォネート製剤抵抗性高カルシウム血症モデルにおける血中カルシウム濃度を改善した（図1）。抗体投与群では体重回復

15 も認められた（図2）。このことから、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体は、ビスフォスフォネート製剤に対して抵抗性を獲得した悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療薬として有用であることが示された。

〔実施例2〕カルシトニン製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物での薬効試験

20 (1) 目的

ヒト腫瘍-ヌードラット移植系の高カルシウム血症モデル動物を用いて、カルシトニン製剤抵抗性の高カルシウム血症モデル動物を作製し、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体の血中カルシウム濃度に対する治療効果を検討した。

(2) 方法

25 モデル動物としてヒト肺大細胞癌LC-6（（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードラットを用いた。ヒト肺大細胞癌LC-6を移植されたヌードラットは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少などの症状を発症する。高カルシウム血症を発症後カルシトニン製剤の一種であるエルカトニン

を連続的に投与し、その血中カルシウム改善効果が認められなくなったモデル、すなわちカルシトニン製剤に抵抗性を獲得したモデルを作製した。なお、ヒト肺大細胞癌LC-6の継代は、BALB/c-nu/nuヌードマウス（日本クレア）を用いて *in vivo*で行った。

- 5 カルシトニン製剤抵抗性を獲得した高カルシウム血症の症状を有するラットに対して、ヒト型化モノクローナル抗体が改善することを、体重および血中カルシウム濃度を指標にして評価した。

薬効評価には、5週齢雄性F344/N Jcl-rnuヌードラット（日本クレア）を購入し、1週間の馴化の後6週齢の動物に腫瘍を移植し、血中カルシウム濃度が上昇しかつ体重減少している動物を高カルシウム血症モデル動物として使用した。

カルシトニン製剤抵抗性高カルシウム血症モデル動物の作製および群分けは、以下のようにして行った。すなわち、継代しているヒト肺大細胞癌LC-6を摘出し、3mm角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をラットの脇腹皮下に1匹あたり1個ずつ移植した。腫瘍塊移植してから1ヶ月半程度後に、血中カルシウム濃度が上昇しかつ体重減少している動物を高カルシウム血症モデル動物とし、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けした。

高カルシウム血症モデル動物に、エルカトニン（エルシトニン注、旭化成工業株式会社）を10U/kgの用量で尾静脈内に1日2回（12時間ごと）投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を尾静脈内に週2回投与した。

20 エルカトニンを12回（0日、1日、2日、3日、4日、5日目で各日2回）投与することにより血中カルシウム濃度改善効果が認められなくなった動物を、エルカトニン製剤抵抗性高カルシウム血症モデル動物とし、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けした。

カルシトニン製剤抵抗性高カルシウム血症に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。上記で作製、群分けしたカルシトニン製剤抵抗性高カルシウム血症モデル動物に、3mg/kgのPTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を尾静脈内に投与した。対照群には続けてリン酸バッファー生理食塩水（PBS）を尾静脈内に投与した。

血中カルシウム濃度の測定は、エルカトニン、リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) を投与後、0.5日、1日、2日、3日、4日、5日、6日目に行った。体重の測定は0.5日、1日、1.5日、2日、2.5日、3日、3.5日、4日、4.5日、5日、5.5日、6日目に行った。6日目にエルカトニン投与群に関して、血中カルシウム濃度および体重を指標として各指標が平均化するように群分けし、ヒト型化モノクローナル抗体、リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) 投与を行った。対照群には続けてPBS投与を行った。ヒト型化モノクローナル抗体、リン酸バッファー生理食塩水 (PBS) 投与後、1日、3日目に血中カルシウム濃度および体重を測定し、薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、尾静脈よりヘマトクリット管で採血し、643自動Ca/pHアナライザー (CIBA-CORNING) を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。

(3) 結果

カルシトニン製剤を1日2回、合計12回連続投与することにより、カルシトニン製剤抵抗性高カルシウム血症モデル動物を作製できた。ヒト型化モノクローナル抗体は、カルシトニン抵抗性高カルシウム血症における血中カルシウム濃度を改善した(図3)。さらに抗体投与群では体重回復も認められた(図4)。このことから、PTHrPに対するヒト型化モノクローナル抗体は、カルシトニン製剤に対して抵抗性を獲得した悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症の治療薬として有用であることが示された。

〔参考例1〕

抗PTHrP(1-34)マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

ヒトPTHrP(1-34)に対するモノクローナル抗体産生ハイブリドーマ#23-57-154および#23-57-137-1は、以下の通り作製した (Sato, K. et al., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993)。なお、ヒトPTHrP(1-34)のアミノ酸配列を配列番号75に示す。

免疫原として使用するために、PTHrP(1-34) (Peninsula 製) とキャリアータンパクであるサイログロブリンをカルボジイミド (Dojinn) を用いて結合した。サイログロブリンと結合したPTHrP(1-34)を透析し、タンパク濃度として2mg/ml

となるように調製した後、フロイントアジュバント (Difco) と 1 : 1 で混合し、エマルジョン作製後、16匹の雌性BALB/Cマウスの背部皮下又は腹腔内に動物あたり100 μ gを11回免疫した。初回免疫は、フロイント完全アジュバントを用い、二回目以降の追加免疫にはフロイント不完全アジュバントを使用した。

5 免疫したマウスの血清中の抗体価の測定は、以下の方法で行った。すなわち、マウス尾静脈より採血し、血清分離後RIAバッファーで希釈した抗血清と125I標識PTHrP(1-34)を混合し、結合活性を測定した。抗体価の上昇したマウスの腹腔に、キャリアタンパクを結合していないPTHrP(1-34)を動物あたり50 μ gを最終免疫した。

10 最終免疫3日目にマウスを屠殺し、脾臓を摘出後、脾臓細胞とマウスミエローマ細胞株P3x63Ag8U.1を50%ポリエチレングリコール4000を用いる常法にしたがって細胞融合した。細胞融合した細胞を 2×10^4 /ウェルの細胞数で85枚の96穴プレートに蒔き込んだ。ハイブリドーマの選別はHAT培地を用いて行った。

ハイブリドーマのスクリーニングは、HAT培地中で生育の認められた穴の培養上清を固相化RIA法にてPTHrP認識抗体の有無を測定し選択することにより行った。抗体との結合能の認められた穴からハイブリドーマを回収し、15%FCSを含むRPMI-1640培地にOPI-supplement(Sigma)を添加した培地に懸濁し、限界希釈法にてハイブリドーマの単一化を実施した。PTHrP(1-34)との結合能の強いクローン#23-57-154 および#23-57-137-1を得た。

20 なお、ハイブリドーマクローン#23-57-137-1は、mouse-mouse hybridoma #23-57-137-1として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月15日に、FERM BP-5631としてブダベスト条約に基づき国際寄託されている。

[参考例2] ヒトPTHrP(1-34)に対するマウスモノクローナル抗体のV領域
25 をコードするDNAのクローニング

ヒトPTHrP(1-34)に対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1の可変領域をコードするDNAを次の様にしてクローニングした。

(1) mRNAの調製

ハイブリドーマ#23-57-137-1からのmRNAをQuick Prep mRNA Purification Kit(Pharmacia Biotech社)を用いて調製した。ハイブリドーマ#23-57-137-1の細胞を抽出バッファーで完全にホモジナイズし、キット添付の処方に従い、oligo (dT)-Cellulose Spun Column にてmRNAを精製し、エタノール沈殿をおこなった。

5 mRNA沈殿物を溶出バッファーに溶解した。

(2) マウスH鎖V領域をコードする遺伝子のcDNAの作製および増幅

(i) #23-57-137-1抗体H鎖V領域cDNAのクローニング

ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のH鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85, 8998-9002, 1988; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989) により行った。5'-RACE法には5'-Ampli FINDER RACE kit(CLONETECH社)を用い、操作はキット添付の処方にしたがって行った。cDNA合成に使用するプライマーは、マウスH鎖定常領域(C領域)とハイブリダイズするMHC2プライマー(配列番号1)を用いた。前記のようにして調製したmRNA約 15 2 μ gを鋳型としてMHC2プライマー10pmoleを加え、逆転写酵素と52°C、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。

6 N NaOH でRNAを加水分解(65°C、30分間)した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。T4DNAリガーゼで37°Cで6時間、室温で16時間反応することにより、合成したcDNAの5'末端にAmpli FINDER Anchor(配列番号42)を連結した。 20 これを鋳型としてPCRにより増幅するためのプライマーとしてAnchorプライマー(配列番号2)およびMHC-G1プライマー(配列番号3) (S.T.Jones, et al., Biotechnology, 9, 88, 1991)を使用した。

PCR溶液は、その50 μ l中に10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM MgCl₂、2.5 ユニットのTaKaRa Taq (宝酒 25 造)、10pmole のAnchorプライマー、並びにMHC-G1プライマー及びAmpli FINDER Anchor を連結したcDNAの反応混合物1 μ lを含有する。この溶液に50 μ lの鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Model 480J(Perkin Elmer)を用い、94°Cにて45秒間、60°Cにて45秒間、72°Cにて2分間の温度サイクルで30回行った。

(ii) #23-57-137-1 抗体L鎖V領域のcDNAのクローニング

ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体のL鎖V領域をコードする遺伝子のクローニングは、5'-RACE法 (Frohman, M. A. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8998-9002, 1988 ; Belyavsky, A. et al., Nucleic Acids Res. 17, 2919-2932, 1989)により行った。5'-RACE法には5'-Ampli Finder RACE Kit (Clonetechnology)を用い、操作は添付の処方に従った。cDNA合成に使用するプライマーは、oligo-dTプライマーを用いた。前記のように調製したmRNA約2 μ gを鋳型としてoligo-dTプライマーを加え、逆転写酵素と52 $^{\circ}$ C、30分間反応させることによりcDNAへの逆転写を行った。6N NaOHでRNAを加水分解(65 $^{\circ}$ C、30分間)した後、エタノール沈殿によりcDNAを精製した。合成したcDNAの5'末端に前記Ampli Finder Anchor をT4DNAリガーゼで37 $^{\circ}$ Cで6時間、室温で16時間反応させることにより連結した。

マウスL鎖L鎖定常領域の保存配列からPCRプライマーMLC(配列番号4)を設計し、394 DNA/RNA Synthesizer (ABI社)を用いて合成した。PCR溶液は、その100 μ l中に10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5mM MgCl₂、2.5ユニットのAmpli Taq (PERKIN ELMER)、50pmoleのAnchorプライマー(配列番号2)、並びにMLC(配列番号4)およびAmpli Finder Anchorを連結したcDNAの反応混合物1 μ lを含有する。この溶液に50 μ lの鉱油を上層した。PCRはThermal Cycler Model480J (Perkin Elmer)を用い、94 $^{\circ}$ Cにて45秒間、60 $^{\circ}$ Cにて45秒間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間の温度サイクルで35回行った。

(3) PCR生成物の精製および断片化

前記のようにしてPCR法により増幅したDNA断片を、3% Nu Sieve GTGアガロース (FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。H鎖V領域として約550bp長、L鎖V領域として約550bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 μ lに溶解した。得られたDNA溶液1 μ

1 を制限酵素XmaI (New England Biolabs)により37°Cで1時間消化し、次いで制限酵素EcoRI (宝酒造)により37°Cで1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

こうして、5'-末端にEcoRI 認識配列を有し、3'-末端にXmaI認識配列を有するマウスH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子を含むDNA断片を得た。

上記のようにして調製したマウスH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-XmaI DNA断片とEcoRI 及びXmaIで消化することにより調製したpUC19 ベクターをDNAライゲーションキットver.2 (宝酒造)を用い、添付の処方に従い16°Cで1時間反応させ連結した。次に10 μ lの上記連結混合物を大腸菌 JM109コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ lに加え、この細胞を氷上で15分間、42°Cにて1分間、さらに氷上で1分間静置した。次いで300 μ lのSOC培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)を加え37°Cにて30分間インキュベートした後、100 μ g/ml又は50 μ g/mlのアンピシリン、0.1mM のIPTG、20 μ g/mlのX-galを含むLB寒天培地または2xYT寒天培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)上にこの大腸菌をまき、37°Cにて一夜インキュベートして大腸菌形質転換体を得た。

この形質転換体を100 μ g/ml又は50 μ g/mlのアンピシリンを含有するLB培地または2xYT培地 2 mlで37°Cにて一夜培養し、菌体画分からプラスミド抽出機PI-100 Σ (クラボウ) 又はQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドDNAを調製し、塩基配列の決定を行った。

(4) マウス抗体V領域をコードする遺伝子の塩基配列決定

前記のプラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列をDye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer)を用い、DNA Sequencer 373A (ABI社Perkin-Elmer)により決定した。配列決定用プライマーとしてM13 Primer M4 (宝酒造) (配列番号5) 及びM13 Primer RV (宝酒造) (配列番号6)を用い、両方向の塩基配列を確認することにより配列を決定した。

こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをMBC1H04、L鎖V領域をコードする遺伝子を含有するプラスミドをMBC1L24と命名した。プラスミドMBC1H04およびMBC1L24に含まれるマウス#23-57-137-1抗体のH鎖V領域およびL鎖V領域をコードする遺伝子の塩基配列（対応するアミノ酸配列を含む）をそれぞれ配列番号57、65に示す。これらのアミノ酸配列を、H鎖V領域の断片については配列番号46、L鎖V領域の断片については配列番号45に示す。

なお、前記プラスミドMBC1H04およびMBC1L24を有する大腸菌は*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04) および*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24) として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、*Escherichia coli* JM109 (MBC1H04)についてはFERM BP-5628、*Escherichia coli* JM109 (MBC1L24)についてはFERM BP-5627としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

(5) ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体#23-57-137-1のCDRの決定

H鎖V領域およびL鎖V領域の全般の構造は、互いに類似性を有しており、それぞれ4つのフレームワーク部分が3つの超可変領域、すなわち相補性決定領域(CDR)により連結されている。フレームワークのアミノ酸配列は、比較的よく保存されているが、一方、CDR領域のアミノ酸配列の変異性は極めて高い(Kabat, E. A. et al., 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」 US Dept. Health and Human Services, 1983)。

このような事実に基づき、ヒトPTHrPに対するマウスモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列をKabatらにより作成された抗体のアミノ酸配列のデータベースにあてはめて、相同性を調べることによりCDR領域を表1に示すごとく決定した。

なお、L鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号59～61に示し、H鎖V領域のCDR1～3のアミノ酸配列についてはそれぞれ配列番号62～64に示した。

表 1

V領域	配列番号	CDR 1	CDR 2	CDR 3
H鎖V領域	5 7	31-35	50-66	99-107
L鎖V領域	6 5	23-34	50-60	93-105

〔参考例 3〕キメラ抗体の構築

(1) キメラ抗体H鎖の構築

(i) H鎖V領域の構築

- 5 ヒトH鎖C領域C γ 1のゲノムDNAを含む発現ベクターに連結するために、クローニングしたマウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1-S1（配列番号7）はV領域のリーダー配列の5'-側をコードするDNAにハイブリダイズし、且つKozak コンセンサス配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987）及び制限酵素Hind IIIの認識配列を有するように設計した。
- 10 前方プライマーMBC1-a（配列番号8）はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、スプライドナー配列及び制限酵素BamHIの認識配列を有するように設計した。PCRは、TaKaRa Ex Taq（宝酒造）を用い、50 μ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.07 μ gのプラスミドMBC1H04、プライマーとしてMBC1-aおよびMBC1-S1をそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのd
- 15 NTP含む条件で添付緩衝液を使用して50 μ lの鋳油を上層し、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース（FMC Bio. Products）を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

- 437bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit (BIO
- 20 101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 μ lに溶解した。得られたDNA溶液1 μ lを制限酵素BamHI、Hind III（宝酒造）により37 $^{\circ}$ C 1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。

- 25 上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むHind

III-BamHI DNA断片をHind IIIおよびBamHIで消化することにより調製したpUC19
ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するため
プライマーM13 Primer M4 およびM13 Primer RV をプライマーとして、Dye Te
rminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A
5 (Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリ
ドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含む、
5'-側にHind III認識配列及びKozak 配列、3'-側にBamHI認識配列を持つプラス
ミドをMBC1H/pUC19 と命名した。

(ii)cDNAタイプのマウス-ヒトキメラH鎖の作製のためのH鎖V領域の構築
10 ヒトH鎖C領域C γ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したマ
ウスH鎖V領域をPCR法により修飾した。H鎖V領域のための後方プライマーMBC
1HVS2 (配列番号9) はV領域のリーダー配列の最初をコードする配列の2番の
アスパラギンをグリシンに変換し、且つKozak コンセンサス配列 (Kozak, M. e
t al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)並びにHind IIIおよびEcoRI 認
15 識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2
(配列番号10) はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つ、
C領域の5'-側の配列をコードしApa I およびSma I認識配列を有するように設計
した。

PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、50 μ lの反応混合液に鋳型DNAとし
20 て0.6 μ gのプラスミドMBC1H/pUC19、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1H
VR2をそれぞれ50pmole、TaKaRa Ex Taq を2.5U、0.25mMのdNTPを含む条件で添
付の緩衝液を使用して50 μ lの鉱油を上層して94 $^{\circ}$ C 1分間、55 $^{\circ}$ C 1分間、72 $^{\circ}$ C 1
分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を1%Sea Kem
GTG アガロース (FMC Bio.Products) を用いたアガロースゲル電気泳動により
25 分離した。456bp 長のDNA断片を含むアガロース片を切り取り、GENECLEAN II
Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDN
Aをエタノール沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 μ lに
溶解した。

得られたDNA溶液 1 μ l を制限酵素EcoRI およびSmaI (宝酒造) により37°Cで1時間消化した。この消化混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、エタノール沈殿によりDNAを回収した。上記のようにして調製したマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含むEcoRI-SmaI DNA断片をEcoRI およびSmaIで消化することにより調製したpUC19 ベクターにサブクローニングした。このプラスミドの塩基配列を確認するため、プライマーM13 Primer M4 及びM13 Primer RV をプライマーとして、Dye Terminator Cycle Sequencing kit(Perkin-Elmer) を用い、DNA Sequencer 373A(Perkin-Elmer)により塩基配列を決定した。正しい塩基配列を有するハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含む、5'-側にEcoRI およびHind III認識配列並びにKozak配列、3'-側にApaIおよびSmaI認識配列を持つプラスミドをMBC1Hv/pUC19と命名した。

(iii) キメラ抗体H鎖の発現ベクターの構築

ヒト抗体H鎖C領域C γ 1を含むcDNAは、以下のようにして調製した。すなわち、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体H鎖C領域IgG1のゲノムDNA (N. Takahashi, et al., Cell 29, 671-679 1982) をコードする発現ベクターDHFR- Δ E-RVh-PM-1-f (W092/19759参照) と、ヒト型化PM1抗体L鎖V領域およびヒト抗体L鎖 κ 鎖C領域のゲノムDNAをコードする発現ベクターRV1-PM1a (W092/19759参照) とを導入したCHO細胞よりmRNAを調製し、RT-PCR法でヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAをクローニングし、pUC19のHind IIIとBamHI部位にサブクローニングした。塩基配列を確認した後、正しい配列を持つプラスミドをpRVh-PM1f-cDNAと命名した。

DHFR- Δ E-RVh-PM-1-f上のSV40プロモーターとDHFR遺伝子との間にあるHind III部位、およびEF-1 α プロモーターとヒト型化PM1抗体H鎖V領域との間にあるEcoRI 部位を欠失した発現ベクターを作製し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1を含むcDNAの発現ベクターの構築のために使用した。

pRVh-PM1f-cDNAをBamHIで消化した後、Klenowフラグメントで平滑化し、さらにHind IIIで消化し、Hind III-BamHI平滑化断片を調製した。このHind III-Ba

mHI平滑化断片を、上記のHind III部位およびEcoRI 部位が欠失したDHFR- Δ E-RVh-PM1-f をHind IIIおよびSmaIで消化することにより調製した発現ベクターに連結し、ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAを構築した。

- 5 ヒト型化PM1抗体H鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1をコードするcDNAを含む発現ベクターRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIで消化した後、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをMBC1HcDNA /pUC19 と命名した。このプラスミドはマウス抗体のH鎖V領域およびヒト抗体C領域C γ 1
- 10 をコードするcDNAを含み、5'-末端にEcoRI およびHind III認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。

プラスミドMBC1HcDNA/pUC19 をEcoRI およびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体のH鎖をコードする塩基配列を含むDNA断片を、EcoRI およびBamHIで消化することにより調製した発現ベクターpCOS1に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。なお、発現ベクターpCOS1は、HEF-PMh-g γ 1 (W092/19759参照) から、EcoRI およびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、EcoRI-NotI-BamHIアダプター (宝酒造) を連結することにより構築した。

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するため、プラスミドMBC1HcDNA/pUC19 をEcoRI およびBamHIで消化し、得られたキメラ抗体H鎖配列を含むDNA断片を、EcoRI およびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCH01に導入した。こうして得られたキメラ抗体の発現プラスミドをMBC1HcDNA/pCH01 と命名した。なお、発現ベクターpCH01は、DHFR- Δ E-rvH-PM1-f (W092/19759参照) から、EcoRI およびSmaI消化により抗体遺伝子を削除し、

25 EcoRI-NotI-BamHI Adaptor (宝酒造) を連結することにより構築した。

(2) ヒトL鎖定常領域の構築

(i) クローニングベクターの作製

ヒトL鎖定常領域を含むpUC19 ベクターを構築するために、Hind III部位欠

失pUC19 ベクターを作製した。pUC19 ベクター 2 μ g を 20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100 mM KCl、8 U の Hind III (宝酒造) を含有する反応混合液 20 μ l 中で 37°C にて 1 時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNA をエタノール沈殿により回収した。

5 回収した DNA を 50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM NaCl、0.5mM dNTP、6 U の Klenow フラグメント (GIBCO BRL) を含有する 50 μ l の反応混合液中で室温にて 20 分間反応させ、末端を平滑化させた。反応混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、ベクター DNA をエタノール沈殿により回収した。

10 回収したベクター DNA を 50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM MgCl₂、1mM ATP、1mM DTT、5% (v/v) ポリエチレングリコール-8000、0.5 U の T4 DNA リガーゼ (GIBCO BRL) を含有する反応混合液 10 μ l 中で 16°C で 2 時間反応させ、自己連結させた。反応混合液 5 μ l を大腸菌 JM109 コンピテント細胞 (ニッポンジーン) 100 μ l に加え、氷上で 30 分間静置した後、42°C にて 1 分間、さらに氷上で 1 分間静置した。SOC 培地 500 μ l を加えて、37°C で 1 時間インキュベーションした後、X-gal と IPTG を表面に塗布した 2 \times YT 寒天培地 (50 μ g/ml アンピシリン含有) (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) にまき、37°C で一夜培養して形質転換体を得た。

20 形質転換体を、50 μ g/ml アンピシリンを含有する 2 \times YT 培地 20ml で 37°C 一夜培養し、菌体画分から Plasmid Mini Kit (QIAGEN) を用いて、添付の処方に従ってプラスミド DNA を精製した。精製したプラスミドを Hind III で消化し、Hind III 部位が欠失していることを確認したプラスミドを pUC19 Δ Hind III と命名した。

(ii) ヒト L 鎖 λ 鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

25 ヒト抗体 L 鎖 λ 鎖 C 領域は、Mcg⁺ Ke⁺ Oz⁻、Mcg⁻ Ke⁻ Oz⁻、Mcg⁻ Ke⁻ Oz⁺、Mcg⁻ Ke⁺ Oz⁻ の少なくとも 4 種類のアイソタイプが知られている (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987)。#23-57-137-1 マウス L 鎖 λ 鎖 C 領域と相同性を有するヒト抗体 L 鎖 λ 鎖 C 領域を EMBL データ

ベースで検索した結果、アイソタイプがMcg+ Ke+ Oz- (accession No.X57819) (P. Dariavach, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 9074-9078, 1987)のヒト抗体L鎖λ鎖が最も高い相同性を示し、#23-57-137-1マウスL鎖λ鎖C領域との相同性はアミノ酸配列で64.4%、塩基配列で73.4%であった。

- 5 そこで、このヒト抗体L鎖λ鎖C領域をコードする遺伝子の構築をPCR法を用いて行った。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA synthesizer(ABI 社)を用いて行った。HLAMB1 (配列番号11) およびHLAMB3 (配列番号13) はセンスDNA配列を有し、HLAMB2 (配列番号12) およびHLAMB4 (配列番号14) はアンチセンスDNA配列を有し、それぞれのプライマーの両端に20から23bpの相補的配列を有する。
- 10 外部プライマーHLAMBS (配列番号15)、HLAMBR (配列番号16) はHLAMB1、HLAMB4とそれぞれ相同な配列を有しており、またHLAMBSはEcoRI、Hind III、BlnI 認識配列を、HLAMBRはEcoRI 認識配列をそれぞれ含んでいる。第一PCRでHLAMB1-HLAMB2 とHLAMB3-HLAMB4 の反応を行った。反応後、それらを等量混合し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを添加
- 15 し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

PCRはTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を使い、添付の処方に従って行った。第一PCRでは、5 pmole のHLAMB1および 0.5pmole のHLAMB2と5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する100 μl の反応混合液、あるいは0.5pmoleのHLAMB3および5 pmole のHLAMB4と5 UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する100 μl の反応混合液を用い、50 μl の鋳油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで5回行った。

第二PCR は、反応液を50 μl ずつ混合し、50 μl の鋳油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで3回行った。

第三PCRは、反応液に外部プライマーHLAMBSおよびHLAMBRを各50pmole ずつ添加し、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回

25 行った。

第三PCR産物のDNA断片を3%低融点アガロースゲル (NuSieve GTG Agarose, FMC) で電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101) を使い、添付の処方に従っ

てゲルから回収、精製した。

得られたDNA断片を50mM Tris-HCl(pH7.5)、10mM MgCl₂、1 mM DTT、100mM NaCl、8 UのEcoRI (宝酒造) を含有する20 μ l の反応混合液中で37°Cにて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1 mM EDTA 溶液 8 μ l に溶解した。

プラスミドpUC19 ΔHind III 0.8 μ g を同様にEcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収した。消化したプラスミドpUC19 ΔHind IIIを50 mM Tris-HCl (pH9.0)、1 mM MgCl₂、アルカリホスファターゼ(E. coli C75, 宝酒造) を含有する反応混合液50 μ l 中で37°C、30分間反応させ脱リン酸処理 (BAP処理) した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿により回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1 mM EDTA 溶液10 μ l に溶解した。

上記のBAP処理したプラスミドpUC19 ΔHind III 1 μ l と先のPCR産物 4 μ l をDNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造) を用いて連結し、大腸菌JM109 コンピテント細胞に形質転換した。得られた形質転換体を50 μ g/mlアンピシリンを含有する2×YT培地 2 mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

上記プラスミドについて、クローニングされたDNAの塩基配列の確認を行った。塩基配列の決定には373A DNA sequencer (ABI 社) を用い、プライマーにはM13 Primer M4 およびM13 Primer RV (宝酒造) を用いた。その結果、クローニングされたDNAの内部に12bpの欠失があることが判明した。このDNAを含むプラスミドをC λ Δ/pUC19 と命名した。そこで、その部分を補うためのプライマーHCLMS (配列番号17)、HCLMR (配列番号18) を新たに合成し、PCRで再度正しいDNAの構築を行った。

第一PCRで欠失DNAを含むプラスミドC λ Δ/pUC19 を鋳型とし、プライマーHLAMBSとHCLMR、HCLMS とHLAMB4で反応を行った。PCR産物をそれぞれ精製し、第二PCRでアセンブリを行った。さらに外部プライマーHLAMBSおよびHLAMB4を添

加し、第三PCRにより全長DNAを増幅させた。

第一PCRでは、鋳型としてCλΔ/pUC19 0.1μg、プライマーHLAMBSおよびHCLMR 各50pmole、あるいはHCLMS およびHLAMB4各50pmole、5UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する100 μlの反応混合液を用い、50μlの鋳油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。

PCR産物HLAMBS-HCLMR(236bp)、HCLMS-HLAMB4(147bp) をそれぞれ3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101) を用いてゲルから回収、精製した。第二PCRでは精製DNA断片各40ng、1UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する20μlの反応混合液を用い、25μlの鋳油を上層して94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルを5回行った。

第三PCRでは、第二PCR反応液2μl、外部プライマーHLAMBS、HLAMB4各50pmole、5UのTaKaRa Ex Taq (宝酒造) を含有する100 μlの反応混合液を用い、50μlの鋳油を上層した。PCRは、94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の温度サイクルで30回行った。第三PCR産物である357bpのDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101) を用いてゲルから回収、精製した。

得られたDNA断片0.1μgをEcoRIで消化した後、BAP処理したプラスミドpUC19ΔHind IIIにサブクローニングした。大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換し、50μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドについて塩基配列をM13 Primer M4、M13 Primer RV (宝酒造) を用い、373A DNasequencer (ABI社)にて決定した。欠失のない正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをCλ/pUC19とした。

(iii) ヒトL鎖κ鎖定常領域をコードする遺伝子の構築

プラスミドHEF-PM1k-gk (W092/19759) からL鎖κ鎖C領域をコードするDNA断片をPCR法を用いてクローニングした。394 DNA/RNA synthesizer(ABI社)を

用いて合成した前方プライマーHKAPS（配列番号19）はEcoRI、Hind III、Bln I認識配列を、後方プライマーHKAPA（配列番号20）はEcoRI 認識配列を有するように設計した。

5 鑄型となるプラスミドHEF-PM1k-gk 0.1 μ g、プライマーHKAPS、HKAPA 各50pmole、5 UのTaKaRaEx Taq（宝酒造）を含有する100 μ lの反応混合液を用い、50 μ lの鉱油を上層した。94℃にて1分間、60℃にて1分間、72℃にて1分間の反応を30サイクル行った。360bpのPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製した。

10 得られたDNA断片をEcoRIで消化した後、BAP処理したプラスミドpUC19 Δ Hind IIIにクローニングした。大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換し、50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

15 精製したプラスミドの塩基配列をM13 Primer M4、M13 Primer RV（宝酒造）を用い、373A DNA sequencer(ABI社)にて決定した。正しい塩基配列を有していることが確認されたプラスミドをC κ /pUC19とした。

(3) キメラ抗体L鎖発現ベクターの構築

20 キメラ#23-57-137-1抗体L鎖発現ベクターを構築した。プラスミドC λ /pUC19、C κ /pUC19のヒト抗体定常領域の直前にあるHind III、BlnI部位に、#23-57-137-1L鎖V領域をコードする遺伝子を連結することによって、それぞれキメラ#23-57-137-1抗体L鎖V領域およびL鎖 λ 鎖またはL鎖 κ 鎖定常領域をコードするpUC19ベクターを作製した。EcoRI消化によってキメラ抗体L鎖遺伝子を切り出し、HEF発現ベクターへサブクローニングを行った。

25 すなわち、プラスミドMBC1L24から#23-57-137-1抗体L鎖V領域をPCR法を用いてクローニングした。各プライマーの合成は、394 DNA/RNA synthesizer(ABI社)を用いて行った。後方プライマーMBCCHL1（配列番号21）はHind III認識配列とKozak配列（Kozak, M. et al., J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987）を、前方プライマーMBCCHL3（配列番号22）はBglIII、EcoRI 認識配列を有するように

設計した。

PCRは、10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、1.5mM MgCl₂、0.2mM dNTP、0.1 μgのMBC1L24、プライマーとしてMBCCHL1およびMBCCHL3を各50pmole、1 μlのAmpliTaq(PERKIN ELMER)を含有する100 μlの反応混合液を用い、50 μlの鋳油を上層して94℃にて45秒間、60℃にて45秒間、72℃にて2分間の温度サイクルで30回行った。

444bpのPCR産物を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEAN I kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液20 μlに溶解した。PCR産物1 μlをそれぞれ10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、50mM NaCl、8UのHind III(宝酒造)および8UのEcoRI(宝酒造)を含有する反応混合液20 μl中で37℃にて1時間消化した。消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液8 μlに溶解した。

プラスミドpUC19 1 μgを同様にHind IIIおよびEcoRIで消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿により回収し、アルカリホスファターゼ(E.coli C75, 宝酒造)でBAP処理した。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μlに溶解した。

BAP処理したプラスミドpUC19 1 μlと先のPCR産物4 μlをDNA Ligation Kit Ver.2(宝酒造)を用いて連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞(ニッポンジーン)に前述と同様に形質転換した。これを50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT寒天培地にまき、37℃で一夜培養した。得られた形質転換体を、50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで37℃で一夜培養した。菌体画分からQIA prep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。塩基配列を決定後、正しい塩基配列を有するプラスミドをCHL/pUC19とした。

プラスミドCλ/pUC19、Cκ/pUC19各1 μgをそれぞれ20mM Tris-HCl(pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、100mM KCl、8UのHind III(宝酒造)および2UのBlnI(宝酒造)を含有する反応混合液20 μl中で37℃にて1時間消化した。

消化混合液をフェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した後、37°Cで30分間BAP処理を行った。反応液をフェノールおよびクロロホルムで抽出し、DNAをエタノール沈殿で回収し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

- 5 #23-57-137-1L鎖V領域を含むプラスミドCHL/pUC19 から8 μ gを同様にHind IIIおよびBlnIで消化した。得られた409bp のDNA断片を3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GENECLEANII Kit(BI0101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

このL鎖V領域DNA 4 μ lをBAP処理したプラスミドC λ /pUC19 または
10 C κ /pUC19 各1 μ lにサブクロニングし、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地3mlで一夜培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。これらをそれぞれプラスミドMBC1L(λ)/pUC19、MBC1L(κ)/pUC19 とした。

- 15 プラスミドMBC1L(λ)/pUC19 およびMBC1L(κ)/pUC19 をそれぞれEcoRI で消化し、3%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、743bp のDNA断片をGENECLEANII Kit(BI0101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

20 発現ベクターとしてプラスミドHEF-PM1k-gk 2.7 μ gをEcoRI で消化し、フェノールおよびクロロホルムで抽出、DNAをエタノール沈殿で回収した。回収したDNA断片をBAP処理した後、1%低融点アガロースゲルで電気泳動し、6561bpのDNA断片をGENECLEANII Kit(BI0101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、1mM EDTA 溶液10 μ lに溶解した。

25 BAP処理したHEFベクター2 μ lを上記プラスミドMBC1L(λ) またはMBC1L(κ) EcoRI 断片各3 μ lと連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit (QIAGEN) を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを、20mM Tris-HCl (pH8.5)、10mM MgCl₂、1mM DTT、1

00mM KCl、8 UのHindIII (宝酒造) および2 UのPvuI (宝酒造) を含有する反応混合液20 μ l 中で37°Cにて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていけば5104/2195bp、逆方向に挿入されていけば4378/2926bpの消化断片が生じることより、正しい方向に挿入されていたプラスミドをそれぞれMBC1L(λ)/neo、MBC1L(κ)/neoとした。

(4) COS-7細胞のトランスフェクション

キメラ抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

すなわちキメラ抗体の一過性発現は、プラスミドMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L(λ)/neoまたはMBC1HcDNA/pCOS1とMBC1L(κ)/neoの組み合わせで、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10 μ gを加え、1,500V, 25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%の Ultra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培地(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

また、COS-7細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、AffiGel Protein A MASP IIキット(BioRad)を用いてキット添付の処方に従って行った。

(5) ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴プレート(Maxisorp, NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO₃、0.02% NaN₃)で1 μ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(TAG0)100 μ lで固相化し、200 μ lの希釈バッファー(50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN₃、1% 牛血清アルブミン(BSA)、pH7.2)でブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカ

リフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100 μ lを加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(BioRad)で測定した。濃度測定のスチンダードとして、Hu IgG1 λ Purified(The Binding Site)を用いた。

(ii)抗原結合能の測定

抗原結合測定のためのELISAプレートでは、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで1 μ g/mlの濃度に調製したヒトPTHrP(1-34)(ペプチド研究所)100 μ lで固相化した。200 μ lの希釈バッファーでブロッキングの後、キメラ抗体を発現させたCOS細胞の培養上清あるいは精製キメラ抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100 μ lを加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。

その結果、キメラ抗体は、ヒトPTHrP(1-34)に対する結合能を有しており、クローニングしたマウス抗体V領域の正しい構造を有することが示された。また、キメラ抗体においてL鎖C領域が λ 鎖あるいは κ 鎖のいずれであっても抗体のPTHrP(1-34)に対する結合能は変化しないことから、ヒト型化抗体のL鎖C領域は、ヒト型化抗体L鎖 λ 鎖を用いて構築した。

(6) CHO安定産生細胞株の樹立

キメラ抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。

すなわちキメラ抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドMBC1H cDNA/pCHO1とMBC1L(λ)/neoまたはMBC1HcDNA/pCHO1とMBC1L(κ)/neoの組み合わせで、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回

取してエレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10 μ gを加え、1,500V, 25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清(GIBCO)を添加したMEM- α 培地(GIBCO)に懸濁し、3枚の96穴プレート(Falcon)を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清(GIBCO)および500mg/mlのGENETICIN(G418Sulfate、GIBCO)添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM- α 培地(GIBCO)の選択培地を交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生量の多い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%のUltra Low IgGウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキリボヌクレオシド不含MEM培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 μ mのフィルター(Millipore)により細胞破片を除去した。

CHO細胞の培養上清からのキメラ抗体の精製は、POROSプロテインAカラム(PerSeptive Biosystems)を用いて、ConSep LC100 (Millipore)にて添付の処方に従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製キメラ抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

〔参考例4〕ヒト型化抗体の構築

(1) ヒト型化抗体H鎖の構築

(i) ヒト型化H鎖V領域の構築

ヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖を、PCR法によるCDR-グラフィティングにより作製した。ヒト抗体S31679(NBRF-PDB、Cuisinier A.M.ら、Eur. J. Immunol., 23, 110-118, 1993)由来のFRを有するヒト型化#23-57-137-1抗体H鎖(バージョン" a")の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。CDR-グラフィティングプライマーMBC1HGP1(配列番号23)及びMBC1HGP3(配列番号24)はセンスDNA配列を有

し、そしてCDRグラフティングプライマーMBC1HGP2(配列番号25)及びMBC1HGP4(配列番号26)はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1HVS1(配列番号27)及びMBC1HVR1(配列番号28)はCDRグラフティングプライマーMBC1HGP1及びMBC1HGP4とホモロジーを有する。

CDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し (Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出はcrush and soak法(Molecular Cloning:A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

すなわち、それぞれ1 nmoleのCDR-グラフティングプライマーを6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し20 μ lの10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液に溶解した。PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造)を用い、100 μ lの反応混合液に上記の様に調製したCDR-グラフティングプライマーMBC1HGP1、MBC1HGP2、MBC1HGP3およびMBC1HGP4をそれぞれ1 μ l、0.25 mMのdNTP、2.5UのTaKaRa Ex Taqを含む条件で添付緩衝液を使用して94°Cにて1分間、55°Cにて1分間、72°Cにて1分間の温度サイクルで5回行い、さらに50 pmoleの外部プライマーMBC1HVS1及びMBC1HVR1を加え、同じ温度サイクルを30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を4% Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio. Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切り取り、GENECLEAN II Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。正しい配列を有するプラスミドをhMBCHv/pUC19と命名した。

(ii) ヒト型化H鎖cDNAのためのH鎖V領域の構築

ヒトH鎖C領域C γ 1のcDNAと連結するために、上記のようにして構築したヒト型化H鎖V領域をPCR法により修飾した。後方プライマーMBC1HVS2はV領域のリーダ配列の5'-側をコードする配列とハイブリダイズし、且つKozakコンセンサス配列(Kozak, M, ら, J. Mol. Biol. 196, 947-950, 1987)、HindIIIおよびEcoRI認識配列を有するように設計した。H鎖V領域のための前方プライマーMBC1HVR2はJ領域の3'-側をコードするDNA配列にハイブリダイズし、且つC領域の5'-側の配列をコードしApaIおよびSmaI認識配列を有するように設計した。

PCRはTaKaRa Ex Taq(宝酒造)を用い、鋳型DNAとして0.4 μ gのhMBC1Hv/pUC19を用い、プライマーとしてMBC1HVS2およびMBC1HVR2をそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq、0.25mMのdNTPを含む条件で添付緩衝液を使用し、94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3% Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

456bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。精製したDNAをエタノールで沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。得られたPCR反応混合物をEcoRIおよびSmaIで消化することで調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたハイブリドーマ#23-57-137-1に由来するマウスH鎖V領域をコードする遺伝子を含有し、5'-側にEcoRIおよびHindIII認識配列及びKozak配列、3'-側にApaIおよびSmaI認識配列を持つプラスミドをhMBC1Hv/pUC19と命名した。

(2)ヒト型化抗体H鎖の発現ベクターの構築

hPM1抗体H鎖 cDNAの配列を含むプラスミドRVh-PM1f-cDNAをApaIおよびBamHIにて消化し、H鎖C領域を含むDNA断片を回収し、ApaIおよびBamHIで消化することにより調製したhMBC1Hv/pUC19に導入した。こうして作製したプラスミドをhMBC1HcDNA/pUC19と命名した。このプラスミドはヒト型化#23-57-137-1抗体のH鎖V領域及びヒトH鎖C領域C γ 1を含み、5'-末端にEcoRIおよびHindIII認識配列、3'-末端にBamHI認識配列を持つ。プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19に含まれるヒ

ト型化H鎖バージョン”a”の塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号58に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号56に示す。

hMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCOS1に
5 導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCOS1と命名した。

さらにCHO細胞での発現に用いるためのプラスミドを作製するためhMBC1HcDNA/pUC19をEcoRIおよびBamHIで消化し、得られたH鎖配列を含むDNA断片をEcoRIおよびBamHIで消化することにより調製した発現プラスミドpCH01に導入した。こう
10 して得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをhMBC1HcDNA/pCH01と命名した。

(3) L鎖ハイブリッド可変領域の構築

(i) FR1,2/FR3,4ハイブリッド抗体の作製

ヒト型化抗体とマウス（キメラ）抗体のFR領域を組み換えたL鎖遺伝子を構築し、ヒト型化のための各領域の評価を行った。CDR2内にある制限酵素AflIII切断
15 部位を利用することによって、FR1及び2はヒト抗体由来、FR3及び4はマウス抗体由来とするハイブリッド抗体を作製した。

プラスミドMBC1L(λ)/neo及びhMBC1L(λ)/neo各10 μ gを10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA, AflIII (宝酒造) 10Uを含有する反応混合液100 μ l中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間消化した。反応液を2%低融点
20 アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L(λ)/neoから6282bpの断片(c1とする)および1022bpの断片(c2とする)、プラスミドhMBC1L(λ)/neoから6282bpの断片(h1とする)および1022bpの断片(h2とする)を、GENECLEANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製した。

回収したc1、h1断片各1 μ gについてBAP処理を行った。DNAをフェノールおよびクロロホルムで抽出、エタノール沈殿で回収した後、10mM Tris-HCl
25 (pH7.4), 1mM EDTA溶液10 μ lに溶解した。

BAP処理したc1及びh1断片1 μ lをそれぞれh2、c2断片4 μ lに連結し(4 $^{\circ}$ C、一夜)、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlア

ンピシリンを含有する2×YT培地 2 mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製したプラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, ApaI I(宝酒造) 2 U、またはBamHI(宝酒造)8U, HindIII(宝酒造)8Uを含有する反
5 応混合液20 μl中で37°C、1時間消化した。c1-h2が正しく連結されていれば、
ApaIで5560/1246/498bp、BamHI/HindIIIで7134/269bpの消化断片が生じること
により、プラスミドの確認を行った。

これをヒトFR1,2/マウスFR3,4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクター
をh/mMBC1L(λ)/neoとした。一方、h1-c2のクローンが得られなかったので、p
10 UCベクター上で組換えてからHEFベクターにクローニングした。その際、アミノ
酸置換のないヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1Laλ/pUC19、及びF
R3内の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに
置換したヒト型化抗体L鎖V領域を含むプラスミドhMBC1Ldλ/pUC19を鋳型とし
て用いた。

15 プラスミドMBC1L(λ)/pUC19、hMBC1Laλ/pUC19及びhMBC1Ldλ/pUC19の各10 μg
を10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA,
HindIII 16U, AflIII 4Uを含有する反応混合液30 μl中で37°C、1時間消化した。
反応液を2%低融点アガロースゲルで電気泳動し、プラスミドMBC1L(λ)/pUC19
から215bp(c2')、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19およびhMBC1Ldλ/pUC19からそれぞ
20 れ3218bp(hal', hd1')のDNA断片をGENECLEANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回
収、精製した。

hal'、hd1'断片をそれぞれc2'断片に連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に
形質転換した。50 μg/mlアンピシリンを含有する2×YT培地2mlで培養し、菌体画
分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。こ
25 れらをそれぞれプラスミドm/hMBC1Laλ/pUC19、m/hMBC1Ldλ/pUC19とした。

得られたプラスミドm/hMBC1Laλ/pUC19、m/hMBC1Ldλ/pUC19をEcoRIで消化し
た。それぞれ743bpのDNA断片を2%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、GE
NECLEANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4),

1mM EDTA溶液20 μ lに溶解した。

各DNA断片4 μ lを前述のBAP処理したHEFベクター1 μ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製した各プラスミドを、20mM Tris-HCl(pH8.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KCl, HindIII(宝酒造)8U, PvuI(宝酒造)2Uを含有する反応混合液20 μ l中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間消化した。断片が正しい方向に挿入されていれば5104/2195bp、逆方向に挿入されていれば4378/2926bpの消化断片が生じることより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれマウスFR1,2/ヒトFR3,4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをm/hMBC1La λ /neo、m/hMBC1Ld λ /neoとした。

(ii) FR1/FR2ハイブリッド抗体の作製

CDR1内にあるSnaBI切断部位を利用することによって、同様にFR1とFR2のハイブリッド抗体を作製した。

15 プラスミドMBC1L(λ)/neo及びh/mMBC1L(λ)/neoの各10 μ gを10mM Tris-HCl(pH7.9), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 50mM NaCl, 0.01%(w/v)BSA, SnaBI(宝酒造)6Uを含有する反応混合液20 μ l中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間消化した。次に20mM Tris-HCl(pH8.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, 100mM KCl, 0.01%(w/v)BSA, PvuI 6Uを含有する反応混合液50 μ l中で37 $^{\circ}$ Cにて1時間消化した。

20 反応液を1.5%低融点アガロースゲルで電気泳動した後、プラスミドMBC1L(λ)/neoから4955bp(m1)および2349bp(m2)、プラスミドh/mMBC1L(λ)/neoから4955bp(hm1)および2349bp(hm2)の各DNA断片をGENECLEANII Kit(BI0101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液40 μ lに溶解した。

m1、hm1断片1 μ lをそれぞれhm2、m2断片4 μ lに連結し、大腸菌JM109コンピテント細胞に形質転換した。50 μ g/mlアンピシリンを含有する2 \times YT培地2mlで培養し、菌体画分からQIAprep Spin Plasmid Kit(QIAGEN)を用いてプラスミドを精製した。

精製した各プラスミドを、10mM Tris-HCl(pH7.5), 10mM MgCl₂, 1mM DTT, Ap

aI(宝酒造)8U、またはApaLI(宝酒造)2Uを含有する反応混合液20 μ l中で37°Cにて1時間消化した。

各断片が正しく連結されていれば、ApaIで7304bp、ApaLIで5560/1246/498bp(m1-hm2)、ApaIで6538/766bp、ApaLIで3535/2025/1246/498bp (hm1-m2)の消化断片が生じることにより、プラスミドの確認を行った。これらをそれぞれヒトFR1/マウスFR2, 3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをhmmMBC1L(λ)/neo、マウスFR1/ヒトFR2/マウスFR3, 4ハイブリッド抗体L鎖をコードする発現ベクターをmhmMBC1L(λ)/neoとした。

(4)ヒト型化抗体L鎖の構築

10 ヒト型化#23-57-137-1抗体L鎖を、PCR法によるCDR-グラフティングにより作製した。ヒト抗体HSU03868(GEN-BANK、Deftos Mら, Scand. J. Immunol., 39, 95-103, 1994)由来のFR1、FR2およびFR3、並びにヒト抗体S25755(NBRF-PDB)由来のFR4を有するヒト型化#23-57-137-1抗体L鎖(バージョン" a ")の作製のために6個のPCRプライマーを使用した。

15 CDR-グラフティングプライマーMBC1LGP1(配列番号29)及びMBC1LGP3(配列番号30)はセンスDNA配列を有し、そしてCDRグラフティングプライマーMBC1LGP2(配列番号31)及びMBC1LGP4(配列番号32)はアンチセンスDNA配列を有し、そしてそれぞれプライマーの両端に15から21bpの相補的配列を有する。外部プライマーMBC1LV S1(配列番号33)及びMBC1LVR1(配列番号34)はCDRグラフティングプライマーMBC1L GP1及びMBC1LGP4とホモロジーを有する。

25 CDR-グラフティングプライマーMBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3およびMBC1LGP4は尿素変性ポリアクリルアミドゲルを用いて分離し(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)、ゲルからの抽出はcrush and soak法(Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)にて行った。

すなわち、それぞれ1nmoleのCDR-グラフティングプライマーを6%変性ポリアクリルアミドゲルで分離し、目的の大きさのDNA断片の同定をシリカゲル薄層板上で紫外線を照射して行い、crush and soak法にてゲルから回収し20 μ lの10mM

Tris-HCl(pH7.4), 1mM EDTA溶液に溶解した。

PCRは、TaKaRa Ex Taq (宝酒造) を用い、100 μ lの反応混合液に上記の様に調製したCDR-グラフティングプライマーMBC1LGP1、MBC1LGP2、MBC1LGP3およびMBC1LGP4をそれぞれ1 μ l、0.25mMのdNTP、2.5UのTaKaRa Ex Taqを含む条件で添付

5 緩衝液を使用して94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間の温度サイクルで5回行い、この反応混合液に50pmoleの外部プライマーMBC1LVS1及びMBC1LVR1を加え、さらに同じ温度サイクルで30回反応させた。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

- 10 421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングし、塩基配列を決定した。こうして得られたプラスミドをhMBCL/pUC19と命名した。しかしながらCDR4の104位(Kabatの規定によるアミノ酸番号96位)のアミノ
- 15 酸がアルギニンになっていたため、これをチロシンに修正するための修正プライマーMBC1LGP10R(配列番号35)を設計し、合成した。PCRはTaKaRa Taq(宝酒造)を用い、100 μ lの反応混合液に鋳型DNAとして0.6 μ gのプラスミドhMBCL/pUC19、プライマーとしてMBC1LVS1及びMBC1LGP10Rをそれぞれ50pmole、2.5UのTaKaRa Ex Taq(宝酒造)0.25mMのdNTPを含む条件で添付の緩衝液を使用して50 μ lの鋳油を上
- 20 層して94 $^{\circ}$ Cにて1分間、55 $^{\circ}$ Cにて1分間、72 $^{\circ}$ Cにて1分間の温度サイクルで30回行った。PCR法により増幅したDNA断片を3%Nu Sieve GTGアガロース(FMC Bio.Products)を用いたアガロースゲル電気泳動により分離した。

421bp長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、GENECLEANII Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物

25 をBamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

M13 Primer M4プライマー及びM13 Primer RVプライマーを用いて塩基配列を決定した結果、正しい配列を得ることができたので、このプラスミドをHindIII

およびBlnIで消化し、416bpの断片を1%アガロースゲル電気泳動により分離した。GENECLEANII Kit(BI0101)を用い、キット添付の処方に従いDNA断片を精製した。得られたPCR反応混合物をHindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドCλ/pUC19に導入し、プラスミドhMBC1Laλ/pUC19と命名した。このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Laλ/pCOS1と命名した。ヒト型化L鎖バージョン”a”の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)を配列番号66に示す。また、バージョンaのアミノ酸配列を配列番号47に示す。

- 10 バージョン”b”をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン”b”では43位(Kabatの規定によるアミノ酸番号43位)のグリシンをプロリンに、49位(Kabatの規定によるアミノ酸番号49位)のリジンをアスパラギン酸に変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP5R(配列番号36)とプライマーMBC1LVS1によりプラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、pUC19のBamHI, HindIII部位にサブクローニングした。塩基配列決定後、制限酵素HindIIIおよびAflIIIで消化し、HindIIIおよびAflIIIで消化したhMBC1Laλ/pUC19と連結した。

- こうして得られたプラスミドをhMBC1Lbλ/pUC19とし、このプラスミドをEcoRIで消化し、ヒト型化L鎖をコードするDNAを含む断片をプラスミドpCOS1に導入し、EF1αプロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lbλ/pCOS1と命名した。

- バージョン”c”をPCR法による変異導入を用いて作製した。バージョン”c”では84位(Kabatの規定によるアミノ酸番号80位)のセリンをプロリンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP6S(配列番号37)とプライマーM13 Primer RVによりプラスミドhMBC1Laλ/pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。

塩基配列決定後、制限酵素BstPIおよびAor51HIで消化し、BstPIおよびAor51HI

で消化したhMBC1La λ /pUC19と連結した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lc λ /pUC19とし、このプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EFl α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られた

5 プラスミドをhMBC1Lc λ /pCOS1と命名した。

バージョン”d”、”e”及び”f”をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に”a”、”b”、”c”バージョンの91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位)のチロシンをイソロイシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP11R(配列番号38)とプライマーM-S1(配列番号44)により

10 それぞれhMBC1La λ /pCOS1、hMBC1Lb λ /pCOS1、hMBC1Lc λ /pCOS1を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をBamHIおよびHindIIIで消化し、BamHIおよびHindIIIで消化することにより調製したpUC19にサブクローニングした。塩基配列決定後、HindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することにより調製したC λ /pUC19と連結した。

15 こうして得られたプラスミドを順にhMBC1Ld λ /pUC19、hMBC1Le λ /pUC19、hMBC1Ll λ /pUC19とした。これらのプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EFl α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Ld λ /pCOS1、hMBC1Le λ /pCOS1、hMBC1Lf λ /pCOS

20 lと命名した。

バージョン”g”及び”h”をPCR法による変異導入を用いて作製した。各バージョンとも順に”a”、”d”バージョンの36位(Kabatの規定によるアミノ酸番号36位)のヒスチジンをチロシンに変更するように設計した。変異原プライマーMBC1LGP9R(配列番号39)およびM13 Primer RVをプライマーとして用いて、hMBC1

25 La λ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたPCR産物とM13 Primer M4をプライマーとして用いて、プラスミドhMBC1La λ /pUC19を鋳型としてさらにPCRを行った。得られたDNA断片をHindIIIおよびBlnIで消化し、HindIIIおよびBlnIで消化することで調製したプラスミドC λ /pUC19にサブクローニングした。このプラスミ

ドを鋳型として、プライマーMBC1LGP13R(配列番号40)とMBC1LVS1をプライマーとしたPCRを行った。得られたPCR断片をApaIおよびHindIIで消化し、ApaIおよびHindIIIで消化したプラスミドhMBC1La λ /pUC19およびhMBC1Ld λ /pUC19に導入した。塩基配列を決定し、正しい配列を含むプラスミドを順にhMBC1Lg λ /pUC19およびhMBC1Lh λ /pUC19とし、これらのプラスミドを制限酵素EcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをそれぞれ順にhMBC1Lg λ /pCOS1およびhMBC1Lh λ /pCOS1と命名した。

- 10 バージョン”i”、“j”、“k”、“l”、“m”、“n”および”o”をPCR法による変異導入を用いて作製した。変異原プライマーMBC1LGP14S(配列番号41)とプライマーVIRV(λ)(配列番号43)によりプラスミドhMBC1La λ /pUC19を鋳型としてPCRを行い、得られたDNA断片をApaIおよびBlnIで消化し、ApaIおよびBlnIで消化することにより調製したプラスミドhMBC1Lg λ /pUC19にサブクローニングした。
- 15 塩基配列決定を行い、それぞれのバージョンに対応した変異が導入されたクローンを選択した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lx λ /pUC19(x=i, j, k, l, m, n, o)とし、このプラスミドをEcoRI消化し、ヒト型化L鎖をコードする配列を含む配列をプラスミドpCOS1のEcoRI部位に導入し、EF1 α プロモーターの下流にヒト型化L鎖の開始コドンが位置するようにした。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lx λ /pCOS1(x=i, j, k, l, m, n, o)と命名した。バージョン”j”、“l”、“m”および”o”の塩基配列(対応するアミノ酸を含む)をそれぞれ配列番号67、68、69、70に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号48、49、50、51に示す。

バージョン”p”、“q”、“r”、“s”および”t”は、バージョン”i”、“j”、“m”、“l”または”o”のアミノ酸配列の87位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョンであり、FR3内にある制限酵素Aor51MI切断部位を利用して、バージョン”h”を、各バージョン”i”、“j”、“m”、“l”または”o”とつなぎ換えることにより作製したものである。すなわち、発現プラスミ

- ドhMBC1Lxλ /pCOS1 (x = i, j, m, l, o) 中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpを除き、ここに発現プラスミドhMBC1Lhλ /pCOS1中、CDR3並びにFR3の一部及びFR4を含むAor51HI断片514bpをつなぐことにより91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位) のチロシンがイソロイシンとなるようにした。
- 5 塩基配列決定を行い、各バージョン”i”、”j”、”m”、”l” および”o” の91位(Kabatの規定によるアミノ酸番号87位) のチロシンがイソロイシンに置換されたクローンを選択し、対応するバージョンをそれぞれ”p”、”q”、”s”、”r” および”t” とし、得られたプラスミドをhMBC1Lxλ /pCOS1 (x = p, q, s, r, t) と命名した。バージョン”q”、”r”、”s” および”t” の塩基
- 10 配列 (対応するアミノ酸を含む) をそれぞれ配列番号71、72、73、74に示す。また、これらの各バージョンのアミノ酸配列をそれぞれ配列番号52、53、54、55に示す。

- プラスミドhMBC1Lqλ /pCOS1をHindIIIおよびEcoRIで消化し、HindIIIおよびEcoRIで消化したプラスミドpUC19にサブクローニングし、プラスミドhMBC1Lqλ /pUC19と命名した。
- 15

ヒト型化L鎖の各バージョンにおける置換アミノ酸の位置を表2に示す。

表 2

バージョン	3 6	4 3	4 5	4 7	4 9	8 0	8 7
a							
b		P			D		
c						P	
d							I
e		P			D		I
f						P	I
g	Y						
h	Y						I
i	Y		K				
j	Y		K		D		
k	Y		K	V			
l	Y		K	V	D		
m	Y				D		
n	Y			V			
o	Y			V	D		
p	Y		K				I
q	Y		K		D		I
r	Y				D		I
s	Y		K	V	D		I
t	Y			V	D		I

表中、Yはチロシン、Pはプロリン、Kはリジン、Vはバリン、Dはアスパラギン酸、Iはイソロイシンを示す。

- 5 なお、前記プラスミドhMBC1HcDNA/pUC19およびhMBC1Lq λ /pUC19を有する大腸菌はEscherichia coli JM109(hMBC1HcDNA/pUC19)および Escherichia coli JM109(hMBC1Lq λ /pUC19)として、工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成8年8月15日に、Escherichia coliJM109 (hMBC1HcDNA/pUC19)についてはFERM BP-5629、Escherichia coli JM109 (hMBC1Lq λ /pUC19)についてはFERM BP-5630としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている。

(5)COS-7細胞へのトランスフェクション

ハイブリッド抗体およびヒト型化#23-57-137-1抗体の抗原結合活性および中和活性を評価するため、前記発現プラスミドをCOS-7細胞で一過性に発現させた。

- 15 すなわちL鎖ハイブリッド抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1とh/mMBC1L(λ)/neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とm/hMBC1La λ /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1

とm/hMBC1L λ /neo、hMBC1HcDNA/pCOS1とhmmMBC1L(λ)/neo、またはhMBC1HcDNA/pCOS1とmhmMBC1L(λ)/neoとの組み合わせを、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCOS-7細胞に同時形質導入した。PBS(-)中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCOS-7細胞0.8mlに、各プラスミドDNA
5 10 μ gを加え、1,500V、25 μ Fの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を2%のUltra Low IgGウシ胎児血清(GIBCO)を含有するDMEM培養液(GIBCO)に懸濁し、10cm培養皿を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。72時間の培養の後、培養上清を集め、遠心分離により細胞破片を除去し、ELISAの試料に供した。

- 10 ヒト型化#23-57-137-1抗体の一過性発現では、プラスミドhMBC1HcDNA/pCOS1とhMBC1Lx λ /pCOS1 (x = a ~ t) のいずれかの組み合わせをGene Pulser装置(Bio Rad)を用いて、前記ハイブリッド抗体の場合と同様の方法によりCOS-7細胞にトランスフェクションし、得られた培養上清をELISAに供した。

また、COS-7細胞の培養上清からのハイブリッド抗体またはヒト型化抗体の精
15 製は、AffiGel ProteinA MAPSIIキット(BioRad)を用いて、キット添付の処方に従って行った。

(6)ELISA

(i) 抗体濃度の測定

抗体濃度測定のためのELISAプレートを次のようにして調製した。ELISA用96穴
20 プレート(Maxisorp,NUNC)の各穴を固相化バッファー(0.1M NaHCO₃、0.02% NaN₃)で1 μ g/mlの濃度に調製したヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100 μ lで固相化し、200 μ lの希釈バッファー(50mM Tris-HCl、1mM MgCl₂、0.1M NaCl、0.05% Tween20、0.02% NaN₃、1%牛血清アルブミン(BSA)、pH7.2)でブロッキングの後、
25 ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO)100 μ lを加えた。1時間室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1mg/mlの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリ

ン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。濃度測定のスチンダードとして、Hu IgG1 λ Purified(The Binding Site)を用いた。

(ii)抗原結合能の測定

- 5 抗原結合測定のためのELISAプレートを、次のようにして調製した。ELISA用96穴プレートの各穴を固相化バッファーで1 μ g/mlの濃度に調製したヒトPTHrP(1-34) 100 μ lで固相化した。200 μ lの希釈バッファーでブロッキングの後、ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を発現させたCOS-7細胞の培養上清あるいは精製ハイブリッド抗体またはヒト型化抗体を段階希釈して各穴に加えた。室温にて
- 10 インキュベートしPBS-Tween20で洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトIgG抗体(TAGO) 100 μ lを加えた。室温にてインキュベートしPBS-Tween20で洗浄の後、1 mg/mlの基質溶液(Sigma104、p-ニトロフェニルリン酸、SIGMA)を加え、次に405nmでの吸光度をマイクロプレートリーダー(Bio Rad)で測定した。

(7)活性確認

- 15 (i) ヒト型化H鎖の評価

ヒト型化H鎖バージョン”a”とキメラL鎖を組み合わせた抗体は、キメラ抗体とPTHrP結合能が同等であった。この結果は、H鎖V領域のヒト型化はバージョン”a”で十分なことを示す。以下、ヒト型化H鎖バージョン”a”をヒト型化抗体のH鎖として供した。

- 20 (ii)ハイブリッド抗体の活性

(ii-a) FR1,2/FR3,4ハイブリッド抗体

- L鎖がh/mMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかったが、m/hMBC1La λ あるいはm/hMBC1Ld λ の場合はいずれもキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果は、FR3,4はヒト型化抗体として問題ないが、FR1,2内に
- 25 置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(ii-b) FR1/FR2ハイブリッド抗体

L鎖がmhmMBC1L(λ)の場合、活性は全く認められなかったが、hmmMBC1L(λ)の場合はキメラ#23-57-137-1抗体と同等の結合活性を示した。これらの結果は、FR

1, 2のうちFR1はヒト型化抗体として問題ないが、FR2内に置換すべきアミノ酸残基が存在することを示唆する。

(iii) ヒト型化抗体の活性

L鎖としてバージョン" a " から" t " の各々一つを用いたヒト型化抗体について、抗原結合活性を測定した。その結果、L鎖バージョン" j " 、" l " 、" m " 、" o " 、" q " 、" r " 、" s " 、" t " を有するヒト型化抗体はキメラ抗体と同等のP T H r P結合能を示した。

(8) CHO安定産生細胞株の樹立

ヒト型化抗体の安定産生細胞株を樹立するため、前記発現プラスミドをCHO細胞(DXB11)に導入した。

すなわちヒト型化抗体の安定産生細胞株樹立は、CHO細胞用発現プラスミドhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lmλ /pCOS1またはhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lqλ /pCOS1あるいはhMBC1HcDNA/pCHO1とhMBC1Lrλ /pCOS1の組み合わせで、Gene Pulser装置(Bio Rad)を用いてエレクトロポレーションによりCHO細胞に同時形質導入した。それぞれの発現ベクターを制限酵素PvuIで切断して直鎖DNAにし、フェノールおよびクロロホルム抽出後、エタノール沈殿でDNAを回収し、エレクトロポレーションに用いた。PBS(-)中に 1×10^7 細胞/mlの細胞濃度で懸濁されているCHO細胞0.8mlに、各プラスミドDNA 10μgを加え、1,500V, 25μFの静電容量にてパルスを与えた。室温にて10分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞を10%ウシ胎児血清(GIBCO)添加、MEM-α培地(GIBCO)に懸濁し、96穴プレート(Falcon)を用いてCO₂ インキュベーターにて培養した。培養開始翌日に、10%ウシ胎児血清(GIBCO)および500mg/mlのGENETICIN (G418 Sulfate, GIBCO) 添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオシド不含MEM-α培地(GIBCO)の選択培地に交換し、抗体遺伝子の導入された細胞を選択した。選択培地交換後、2週間前後に顕微鏡下で細胞を観察し、順調な細胞増殖が認められた後に、上記抗体濃度測定ELISAにて抗体産生量を測定し、抗体産生能の高い細胞を選別した。

樹立した抗体の安定産生細胞株の培養を拡大し、ローラーボトルにて2%のUltra Low IgGウシ胎児血清添加、リボヌクレオシドおよびデオキシリボヌクレオ

シド不含MEM- α 培地を用いて、大量培養を行った。培養3ないし4日目に培養上清を回収し、0.2 μ mのフィルター (Millipore) により細胞破片を除去した。C
H0細胞の培養上清からのヒト型化抗体の精製は、POROSプロテインAカラム (PerSeptive Biosystems) を用いて、ConSep LC100 (Millipore) にて添付の処方に
5 従って行い、中和活性の測定および高カルシウム血症モデル動物での薬効試験に供した。得られた精製ヒト型化抗体の濃度および抗原結合活性は、上記ELISA系にて測定した。

[参考例5] 中和活性の測定

マウス抗体、キメラ抗体およびヒト型化抗体の中和活性の測定は、ラット骨肉
10 腫細胞株ROS17/2.8-5細胞を用いて行った。すなわち、ROS17/2.8-5細胞を、10%牛胎児血清(GIBCO)を含むHam'S F-12培地(GIBCO) 中にて、CO₂ インキュベーターで培養した。ROS17/2.8-5細胞を96穴プレートに10⁴ 細胞/100 μ l/穴で蒔込み1日間培養し、4mMのHydrocortisoneと10%牛胎児血清を含むHam'S F-12培地(GIBCO)に交換する。さらに3ないし4日間培養した後、260 μ lのHam'S F-12培
15 地(GIBCO)にて洗浄し、1mMのイソブチル-1-メチルキサンチン(IBMx, SIGMA)および10%の牛胎児血清と10mMのHEPESを含む80 μ lのHam' sF-12を加え、30分間37°Cでインキュベートした。

中和活性を測定するマウス抗体、キメラ抗体またはヒト型化抗体を、あらかじめ10 μ g/ml、3.3 μ g/ml、1.1 μ g/mlおよび0.37 μ g/mlの群、10 μ g/ml、2 μ g/ml、
20 0.5 μ g/mlおよび0.01 μ g/mlの群、または10 μ g/ml、5 μ g/ml、1.25 μ g/ml、0.63 μ g/mlおよび0.31 μ g/mlの群に段階希釈し、4ng/mlに調製したPTHrP(1-34)と等量混合し、各抗体とPTHrP(1-34)の混合液80 μ lを各穴に添加した。各抗体の最終濃度は上記抗体濃度の4分の1になり、PTHrP(1-34)の濃度は1ng/mlになる。10分間室温にて処理した後、培養上清を捨て、PBSにて3回洗浄したした後、100 μ
25 lの0.3%塩酸95%エタノールにて細胞内のcAMPを抽出する。水流アスピレーターにて塩酸エタノールを蒸発させ、cAMP EIA kit(CAYMAN CHEMICAL'S)付属のEIAバッファ-120 μ lを添加しcAMPを抽出後、cAMP EIA kit(CAYMAN CHEMICAL'S)添付の処方に従ってcAMPを測定した。その結果、キメラ抗体と同等の抗原結合を有

するL鎖バージョンのうち、91位のチロシンをイソロイシンに置換したバージョン”q”、”r”、”s”、”t”を有するヒト型化抗体がキメラ抗体に近い中和能を示し、その中でも、バージョン”q”がもっとも強い中和能を示した。

5 配列表フリーテキスト

配列番号 1 : 合成DNA

配列番号 2 : 合成DNA

配列番号 3 : 合成DNA

配列番号 4 : 合成DNA

10 配列番号 5 : 合成DNA

配列番号 6 : 合成DNA

配列番号 7 : 合成DNA

配列番号 8 : 合成DNA

配列番号 9 : 合成DNA

15 配列番号 10 : 合成DNA

配列番号 11 : 合成DNA

配列番号 12 : 合成DNA

配列番号 13 : 合成DNA

配列番号 14 : 合成DNA

20 配列番号 15 : 合成DNA

配列番号 16 : 合成DNA

配列番号 17 : 合成DNA

配列番号 18 : 合成DNA

配列番号 19 : 合成DNA

25 配列番号 20 : 合成DNA

配列番号 21 : 合成DNA

配列番号 22 : 合成DNA

配列番号 23 : 合成DNA

配列番号 24 : 合成DNA

- 配列番号25：合成DNA
配列番号26：合成DNA
配列番号27：合成DNA
配列番号28：合成DNA
5 配列番号29：合成DNA
配列番号30：合成DNA
配列番号31：合成DNA
配列番号32：合成DNA
配列番号33：合成DNA
10 配列番号34：合成DNA
配列番号35：合成DNA
配列番号36：合成DNA
配列番号37：合成DNA
配列番号38：合成DNA
15 配列番号39：合成DNA
配列番号40：合成DNA
配列番号41：合成DNA
配列番号42：合成DNA
配列番号43：合成DNA
20 配列番号44：合成DNA

本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願をそのまま参考として本明細書に取り入れるものとする。

25 産業上の利用の可能性

本発明により、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含有する薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤が提供される。

上記物質の投与により、薬剤抵抗性高カルシウム血症モデルにおける血中カルシウム濃度の改善及び体重の回復が認められたことから、上記物質は薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤として有用である。

請 求 の 範 囲

1. 副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質を有効成分として含む、薬剤抵抗性高カルシウム血症治療剤。
- 5 2. 薬剤抵抗性高カルシウム血症が、副甲状腺ホルモン関連ペプチドとその受容体との結合を阻害する物質以外の高カルシウム血症治療薬に対して抵抗性を示す、高カルシウム血症である請求項1記載の治療剤。
3. 高カルシウム血症治療薬が、骨吸収抑制剤、カルシウム排泄促進剤、腸管からのカルシウム吸収抑制剤またはループ利尿剤である請求項1又は2記載の治療
- 10 剤。
4. 高カルシウム血症治療薬が、骨吸収抑制剤である請求項1又は2記載の治療剤。
5. 骨吸収抑制剤がビスフォスフォネート又はカルシトニンである請求項4記載の治療剤。
- 15 6. 物質が副甲状腺ホルモン関連ペプチド受容体に対するアンタゴニストである請求項1乃至5いずれか一項に記載の治療剤。
7. 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体である請求項1乃至5いずれか一項に記載の治療剤。
8. 物質が抗副甲状腺ホルモン関連ペプチド抗体断片及び／又はその修飾物である
- 20 請求項1乃至5いずれか一項に記載の治療剤。
9. 抗体がモノクローナル抗体である請求項7記載の治療剤。
10. 抗体がヒト抗体、又はヒト型化又はキメラ化されたものである請求項7記載の治療剤。
11. 抗体がヒト型化されたものである請求項7記載の治療剤。
- 25 12. ヒト型化抗体がヒト型化#23-57-137-1抗体である請求項11記載の治療剤。
13. 薬剤抵抗性高カルシウム血症が癌由来のものである請求項1乃至12のいずれか一項に記載の治療剤。

図 1

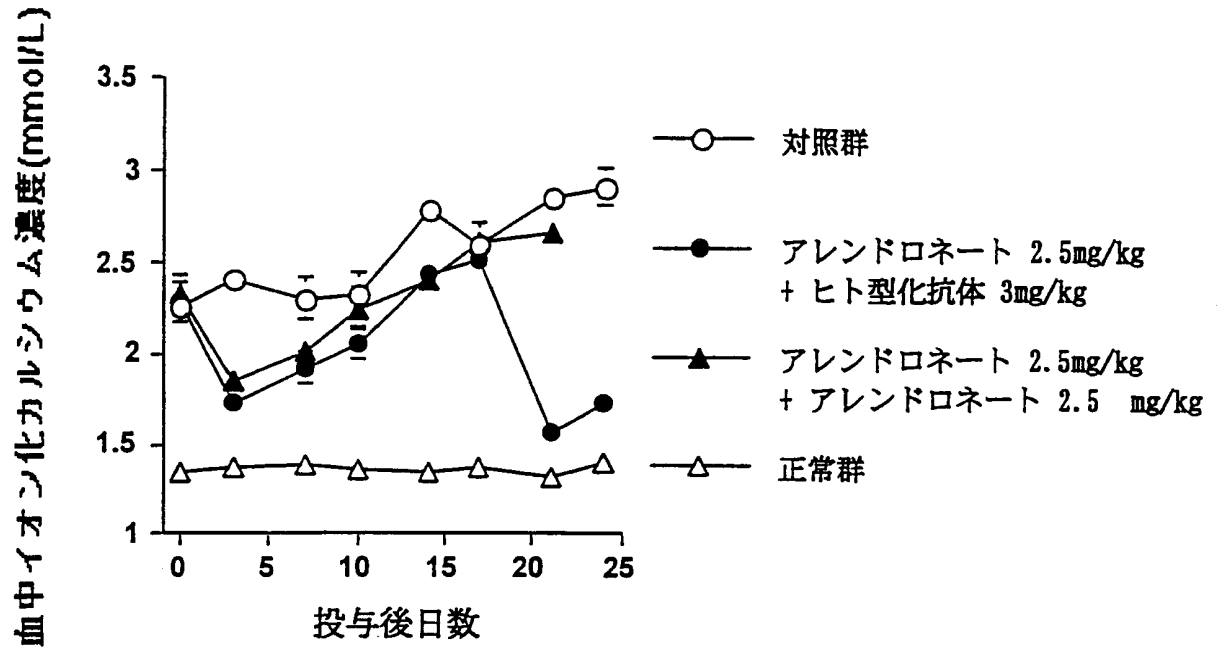


図 2

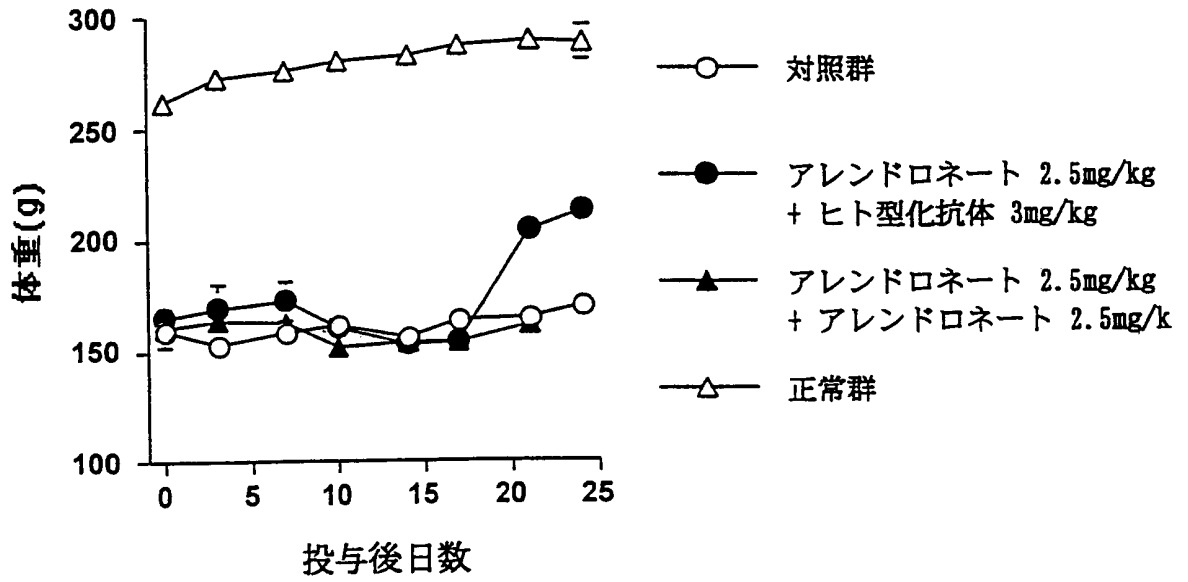


図 3

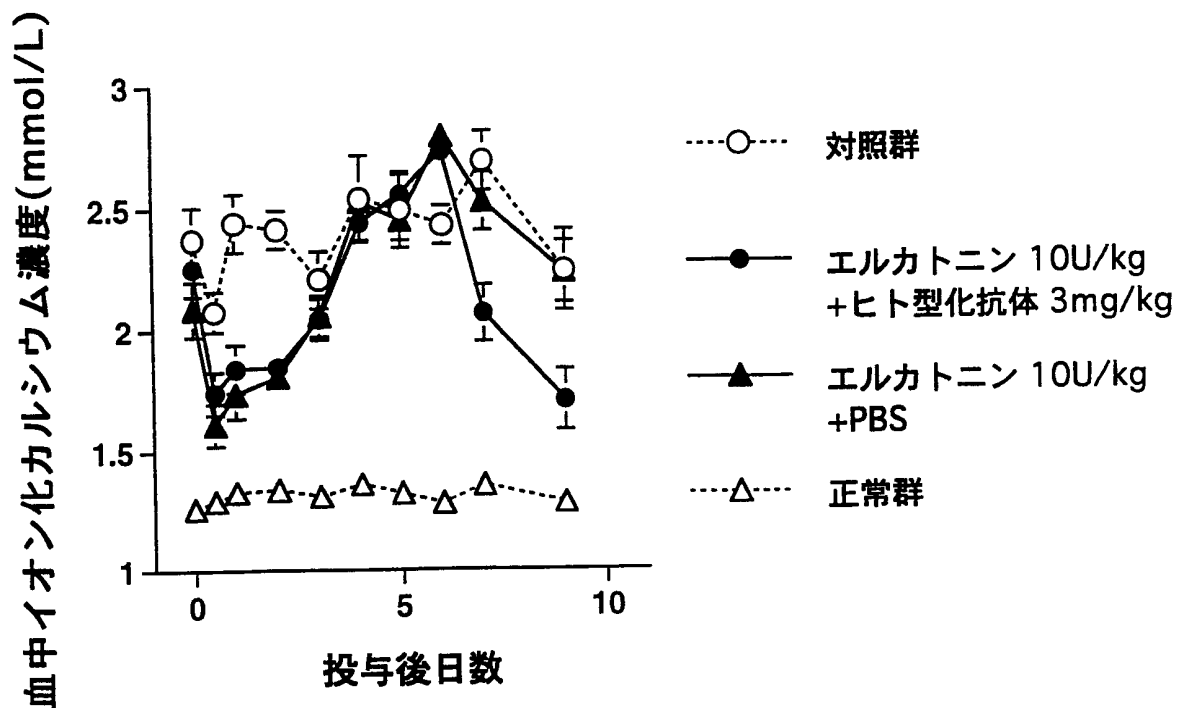
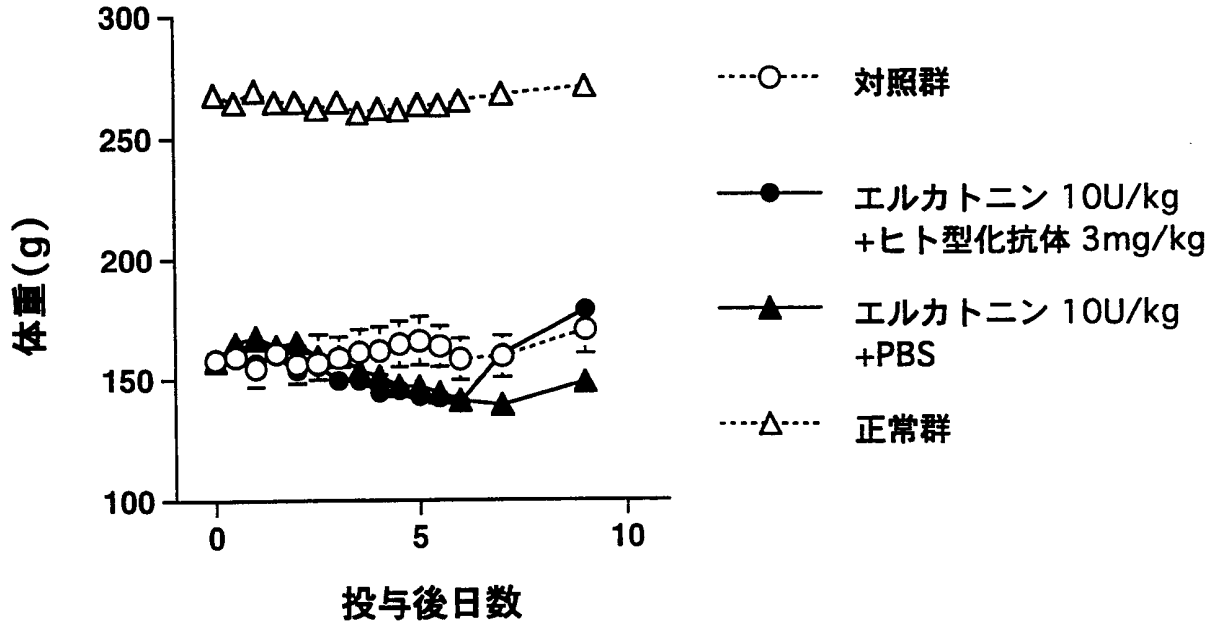


図 4



SEQUENCE LISTING

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Therapeutic agent for treating drug-resistant hypercalcemia

<130> PH-946-PCT

<150> JP 11-192270

<151> 1999-07-06

<160> 75

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 1

aaatagccct tgaccaggca

20

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 2

ctggttcggc ccacctctga aggttccaga atcgatag

38

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 3

ggatcccggg ccagtgata gacagatg

28

<210> 4

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 4

ggatcccggg tcagrggaag gtggraaca

29

<210> 5

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 5

gttttccag tcacgac

17

<210> 6

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 6

caggaaacag ctatgac

17

<210> 7

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 7

gtctaagctt ccacatgaa acttcgggct c

31

<210> 8

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 8

tgttggatcc ctgcagagac agtgaccaga

30

<210> 9

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 9

gtctgaattc aagcttccac catgggggttt gggctg

36

<210> 10

<211> 41

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 10

tttcccgggc ccttgggtgga ggctgaggag acggtgacca g

41

<210> 11

<211> 109

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 11

gtctgaattc aagcttagta cttggccagc ccaaggccaa ccccacggtc accctgttcc 60
cgccctcttc tgaggagctc caagccaaca aggccacact agtgtgtct 109

<210> 12

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 12

ggtttgggtg tctccactcc cgccttgacg gggctgcat ctgcctcca ggccactgtc 60
acagctcccg ggtagaagtc actgatcaga cacactagtg tggccttgtt 110

<210> 13

<211> 98

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 13

ggagtggaga ccaccaaacc ctccaaacag agcaacaaca agtacgcggc cagcagctac 60
ctgagcctga cgcccagca gtggaagtcc cacagaag 98

<210> 14

<211> 106

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 14

tgttgaattc ttactatgaa cattctgtag gggccactgt cttctccacg gtgctccctt 60
catgcgtgac ctggcagctg tagcttctgt gggacttcca ctgctc 106

<210> 15

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 15

gtctgaattc aagcttagta ctggccagc ccaaggccaa ccc

43

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 16

tgttgaattc ttactatgaa

20

<210> 17

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 17

caacaagtac gcggccagca gctacctgag cctgacgcc

39

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 18

gtagctgctg gccgcgtact igttgttgct ctgtttgga

39

<210> 19

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 19

gtctgaattc aagcttagtc ctaggtcgaa ctgtggctgc accatc

46

<210> 20

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 20

tgttgaattc ttactaacac tctcccctgt tgaa

34

<210> 21

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 21

gtctaagctt ccaccatggc ctggactcct ctctt

35

<210> 22

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 22

tgttgaattc agatctaact acttacctag gacagtgacc ttggtccc

48

<210> 23

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 23

```
gtctaagctt ccacatggg gtttgggctg agctggggtt tcctcgttc tctttaaga 60
gggtgccagt gtcaggtagca gctggtggag tctgggggag gcgtggtcca gcctgggagg 120
tcctgag 128
```

<210> 24

<211> 125

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 24

```
accattagta gtggtgtag ttacacctac tatccagaca gtgtgaagg gcgattcacc 60
atctccagag acaattccaa gaacacgctg tctctgcaaa tgaacagcct gagagctgag 120
gacac 125
```

<210> 25

<211> 132

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 25

ctaccaccac tactaatggt tgccaccac tccagcccct tgcctggagc ctggcggacc 60
caagacatgc catagctact gaaggtgaat ccagaggctg cacaggagag tctcaggac 120
ctcccaggct gg 132

<210> 26

<211> 110

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 26

tgttggatcc ctgaggagac gtgaccagg gttccctggc cccagtaagc aaagtaagtc 60
atagtagtct gtctgcaca gtaatacaca gccgtgtcct cagctctcag 110

<210> 27

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 27

gtctaagctt ccacatggg gtttgggctg

30

<210> 28

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 28

tgttggatcc ctgaggagac ggtgaccagg

30

<210> 29

<211> 133

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 29

acaaagcttc caccatggcc tggactcctc tcttcttctt ctttgttctt cattgctcag 60

gttctttctc ccagcttgtg ctgactcaat cgccctctgc ctctgectcc ctgggagcct 120

cggcaagct cac

133

<210> 30

<211> 118

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 30

agcaagatgg aagccacagc acagtgatg ggattcctga tcgcttctca ggctccagct 60
ctggggctga gcgtacctc accatctcca gcctccagtc tgaggatgag gctgacta 118

<210> 31

<211> 128

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 31

ctgtggcttc catcttgctt aagtttcatc aagtaccgag ggcccttctc tggctgctgc 60
tgatgccatt caatgggtga cgtactgtgc tgactactca aggtgcaggt gagcttgacc 120
gaggctcc 128

<210> 32

<211> 114

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 32

cttggatccg ggctgacctt ggacggtcag ttgggtccct cgcgcaaca cctcacaac 60
ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gtaatagtca gcctcatcct caga 114

<210> 33

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 33

acaaagcttc caccatg 17

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 34

cttggatccg ggctgacct 19

<210> 35

<211> 75

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 35

cttggatccg ggctgacctt ggacggctcag ttggtccct cgcgcaaca cgtacacaaa 60
ttgttcctta attgt 75

<210> 36

<211> 43

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 36

aaagatcct taagatccat caagtaccga gggggcttct ctg 43

<210> 37

<211> 46

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 37

acaaagctta gcgctacctc accatctcca gcctccagcc tgagga 46

<210> 38

<211> 111

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 38

cttggatccg ggctgacctt ggacggcag ttiggtccct ccgccgaaca cgtacacaaa 60
ttgttcctta attgtatcac ccacaccaca gatatagtcg gcctcatcct c 111

<210> 39

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 39

cttctctggc tgctgctgat accattcaat ggtgtacgta ct 42

<210> 40

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 40

cgagggcct tctctggctg ctgctg

26

<210> 41

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 41

gagaagggcc ctargtacst gatgrawctt aagca

35

<210> 42

<211> 35

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 42

cacgaattca ctatcgattc tggaaccttc agagg

35

<210> 43

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 43

ggcttggagc tcctcaga

18

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA

<400> 44

gacagtggtt caaagttttt

20

<210> 45

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 45

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser
 65 70 75 80
 Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 46

<211> 118

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 46

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly
 115

<210> 48

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 48

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 49

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 49

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 50

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 50

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 51

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 51

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met

35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 52

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 52

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

85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 53

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 53

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 54

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 54

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 55

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 55

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr Tyr Thr
 20 25 30
 Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met
 35 40 45
 Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser
 65 70 75 80
 Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp
 85 90 95
 Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 100 105 110
 Thr Val Leu Gly Gln Pro
 115

<210> 56

<211> 118

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57

<211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 57

atg aac ttc ggg ctc agc ttg att ttc ctt gcc ctc att tta aaa ggt 48
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys Gly
 -15 -10 -5
 gtc cag tgt gag gtg caa ctg gtg gag tct ggg gga gac tta gtg aag 96

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
 -1 1 5 10
 cct gga ggg tcc ctg aaa ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc 144
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 15 20 25
 agt agc tat ggc atg tct tgg att cgc cag act cca gac aag agg ctg 192
 Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu
 30 35 40 45
 gag tgg gtc gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat cca 240
 Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
 50 55 60
 gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac 288
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
 65 70 75
 acc cta tac ctg caa atg agc agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg 336
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
 80 85 90
 ttt tac tgt gca aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc 384
 Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly
 95 100 105
 caa ggg act ctg gtc act gtc tct gca 411
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 110 115

<210> 58

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 58

```

atg ggg ttt ggg ctg agc tgg gtt ttc ctc gtt gct ctt tta aga ggt 48
Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
          -15          -10          -5
gtc cag tgt cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag 96
Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
      -1  1          5          10
cct ggg agg tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc acc ttc 144
Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
      15          20          25
agt agc tat ggc atg tct tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg 192
Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
      30          35          40          45
gag tgg gtg gca acc att agt agt ggt ggt agt tac acc tac tat cca 240
Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro
          50          55          60
gac agt gtg aag ggg cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac 288
Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
          65          70          75
acg ctg tat ctg caa atg aac agc ctg aga gct gag gac acg gct gtg 336
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
    
```

80 85 90
 tat tac tgt gcg aga cag act act atg act tac ttt gct tac tgg ggc 384
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly
 95 100 105
 cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca 411
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 110 115

<210> 59

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 59

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 60

<211> 7

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 60

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 61

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 61

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

<210> 62

<211> 5

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 62

Pro Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 63

<211> 16

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 63

Ser Ile Phe Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser Gln Lys Phe Lys Gly

1 5 10 15

<210> 64

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 64

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 65

<211> 411

<212> DNA

<213> Mus musculus

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 65

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly

-15 -10 -5

tct ttc tcc caa ctt gtg ctc act cag tca tct tca gcc tct ttc tcc 96

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser

-1 1 5 10

ctg gga gcc tca gca aaa ctc acg tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser

15 20 25

acg tac acc att gaa tgg tat cag caa cag cca ctc aag cct cct aag 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys

30	35	40	45													
tat	gtg	atg	gat	ctt	aag	caa	gat	gga	agc	cac	agc	aca	ggt	gat	ggg	240
Tyr	Val	Met	Asp	Leu	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	His	Ser	Thr	Gly	Asp	Gly	
	50	55	60													
att	cct	gat	cgc	ttc	tct	gga	tcc	agc	tct	ggt	gct	gat	cgc	tac	ctt	288
Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Gly	Ala	Asp	Arg	Tyr	Leu	
	65	70	75													
agc	att	tcc	aac	atc	cag	cca	gaa	gat	gaa	gca	atg	tac	atc	tgt	ggt	336
Ser	Ile	Ser	Asn	Ile	Gln	Pro	Glu	Asp	Glu	Ala	Met	Tyr	Ile	Cys	Gly	
	80	85	90													
gtg	ggt	gat	aca	att	aag	gaa	caa	ttt	gtg	tat	ggt	ttc	ggc	ggt	ggg	384
Val	Gly	Asp	Thr	Ile	Lys	Glu	Gln	Phe	Val	Tyr	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	
	95	100	105													
acc	aag	gtc	act	gtc	cta	ggt	cag	ccc								411
Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Gln	Pro								
110	115															

<210> 66
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(411)

 <220>
 <221> mat_peptide
 <222> (58)..(411)

<400> 66

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt	48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly	
-15 -10 -5	
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tcg ccc tct gcc tct gcc tcc	96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser	
-1 1 5 10	
ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt	144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser	
15 20 25	
acg tac acc att gaa tgg cat cag cag cag cca gag aag ggc cct cgg	192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg	
30 35 40 45	
tac ttg atg aaa ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg	240
Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly	
50 55 60	
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc	288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu	
65 70 75	
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt	336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly	
80 85 90	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg	384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly	
95 100 105	
acc aaa ctg acc gtc cta ggt cag ccc	411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro	
110 115	

<210> 67

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 67

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
          -15          -10          -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
          -1  1          5          10

ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
          15          20          25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
          30          35          40          45

tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
    
```

50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 68

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 68

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48

Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
 -15 -10 -5
 tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
 30 35 40 45
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 69

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 69

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt	48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly	
-15 -10 -5	
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc	96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser	
-1 1 5 10	
ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt	144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser	
15 20 25	
acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg	192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg	
30 35 40 45	
tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg	240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly	
50 55 60	
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc	288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu	

65	70	75	
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt			336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly			
80	85	90	
gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg			384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly			
95	100	105	
acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc			411
Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro			
110	115		

<210> 70

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 70

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt	48	
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly		
-15	-10	-5
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc	96	

Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat tac tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 71

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 71

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
      -15          -10          -5
tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1  1          5          10
ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15          20          25
acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
      30          35          40          45
tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
      50          55          60
att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
      65          70          75
acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
    
```

80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 72
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(411)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (58)..(411)

<400> 72
 atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
 -15 -10 -5
 tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10
 ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144

Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192
 Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45
 tac ctg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 73

<211> 411

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(411)

<220>

<221> mat_peptide

<222> (58)..(411)

<400> 73

```

atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
      -15           -10           -5

tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96
Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
      -1  1           5           10

ctg gga gcc tgc gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
      15           20           25

acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct aag 192
Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Lys
      30           35           40           45

tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
      50           55           60

att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
      65           70           75

acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336
Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
      80           85           90

gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
    
```

95 100 105 411
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 74
 <211> 411
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(411)

<220>
 <221> mat_peptide
 <222> (58)..(411)

<400> 74
 atg gcc tgg act cct ctc ttc ttc ttc ttt gtt ctt cat tgc tca ggt 48
 Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser Gly
 -15 -10 -5
 tct ttc tcc cag ctt gtg ctg act caa tgc ccc tct gcc tct gcc tcc 96
 Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser
 -1 1 5 10
 ctg gga gcc tcg gtc aag ctc acc tgc acc ttg agt agt cag cac agt 144
 Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser
 15 20 25
 acg tac acc att gaa tgg tat cag cag cag cca gag aag ggc cct agg 192

Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
 30 35 40 45
 tac gtg atg gat ctt aag caa gat gga agc cac agc aca ggt gat ggg 240
 Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp Gly
 50 55 60
 att cct gat cgc ttc tca ggc tcc agc tct ggg gct gag cgc tac ctc 288
 Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg Tyr Leu
 65 70 75
 acc atc tcc agc ctc cag tct gag gat gag gct gac tat atc tgt ggt 336
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly
 80 85 90
 gtg ggt gat aca att aag gaa caa ttt gtg tac gtg ttc ggc gga ggg 384
 Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly
 95 100 105
 acc aaa ctg acc gtc cta ggc cag ccc 411
 Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
 110 115

<210> 75

<211> 34

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 75

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile Gln
 1 5 10 15
 Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu Ile His
 20 25 30
 Thr Ala

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP00/04523

<p>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl⁷ A61K45/00, 39/395, A61P3/14, 5/18</p> <p>According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC</p>																	
<p>B. FIELDS SEARCHED</p> <p>Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl⁷ A61K45/00, 39/395, A61P3/14, 5/18</p> <p>Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched</p> <p>Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN), BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS), WPI (DIALOG)</p>																	
<p>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>JP, 4-228089, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 18 August, 1992 (18.08.92), Claims; Par. Nos. [0008] to [0010] (Family: none)</td> <td>1-5,7-10,13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP, 2-207099, A (Toa Nenryo Kogyo K.K.), 16 August, 1990 (16.08.90), Claims; page 1, lower right column to page 2, lower right column, line 7 (Family: none)</td> <td>1-6,13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>JP, 7-165790, A (TONEN CORPORATION), 27 June, 1995 (27.06.95), Claims; Par. Nos. [0001], [0002], [0006], [0008] (Family: none)</td> <td>1-6,13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO, 98/13388, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 April, 1998 (02.04.98), Claims; page 3, lines 17 to 22; implementation example & JP, 11-92500, A & EP, 962467, A1 & ZA, 9708590, A & AU, 9743972, A & NO, 9901449, A & CN, 1237983, A</td> <td>1-8,10-13</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	JP, 4-228089, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 18 August, 1992 (18.08.92), Claims; Par. Nos. [0008] to [0010] (Family: none)	1-5,7-10,13	X	JP, 2-207099, A (Toa Nenryo Kogyo K.K.), 16 August, 1990 (16.08.90), Claims; page 1, lower right column to page 2, lower right column, line 7 (Family: none)	1-6,13	X	JP, 7-165790, A (TONEN CORPORATION), 27 June, 1995 (27.06.95), Claims; Par. Nos. [0001], [0002], [0006], [0008] (Family: none)	1-6,13	X	WO, 98/13388, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 April, 1998 (02.04.98), Claims; page 3, lines 17 to 22; implementation example & JP, 11-92500, A & EP, 962467, A1 & ZA, 9708590, A & AU, 9743972, A & NO, 9901449, A & CN, 1237983, A	1-8,10-13
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
X	JP, 4-228089, A (Kanegafuchi Chem. Ind. Co., Ltd.), 18 August, 1992 (18.08.92), Claims; Par. Nos. [0008] to [0010] (Family: none)	1-5,7-10,13															
X	JP, 2-207099, A (Toa Nenryo Kogyo K.K.), 16 August, 1990 (16.08.90), Claims; page 1, lower right column to page 2, lower right column, line 7 (Family: none)	1-6,13															
X	JP, 7-165790, A (TONEN CORPORATION), 27 June, 1995 (27.06.95), Claims; Par. Nos. [0001], [0002], [0006], [0008] (Family: none)	1-6,13															
X	WO, 98/13388, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 April, 1998 (02.04.98), Claims; page 3, lines 17 to 22; implementation example & JP, 11-92500, A & EP, 962467, A1 & ZA, 9708590, A & AU, 9743972, A & NO, 9901449, A & CN, 1237983, A	1-8,10-13															
<p><input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.</p>																	
<p>* Special categories of cited documents:</p> <table border="0"> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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	"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)	"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	"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed						
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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																
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"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																
"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)	"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																
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family																
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed																	
<p>Date of the actual completion of the international search 09 August, 2000 (09.08.00)</p>		<p>Date of mailing of the international search report 22 August, 2000 (22.08.00)</p>															
<p>Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office</p>		<p>Authorized officer</p>															
<p>Facsimile No.</p>		<p>Telephone No.</p>															

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04523

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 92/17602, A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS), 15 October, 1992 (15.10.92), Claims; page 40, line 14 to page 49, line 6 & JP, 6-506598, A Claims; page 13, upper left column to page 15, upper left column & EP, 579758, A & US, 5886148, A	1-7,9,13
X	WO, 96/03437, A1 (SANDOZ LTD.), 08 February, 1996 (08.02.96), Claims & JP, 10-502091, A Claims & AU, 9531670, A & EP, 7739958, A1 & FI, 9700168, A & NO, 9700356, A & ZA, 9506331, A & BR, 9508433, A & KR, 97704782, A & MX, 9700446, A1	1-6,13
X	US, 5849695, A (The Regents of the University of California), 15 December, 1998 (15.12.98), Claims; abstract (Family: none)	1-6,13
X	WO, 92/00753, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 23 January, 1992 (23.01.92), Claims; page 1, lines 10 to 22 & JP, 5-509098, A Claims; page 5, lower right column to page 6, upper left column & AU, 9182900, A & EP, 539491, A1	1-6,13
A	EP, 449405, A2 (MERCK & CO. INC.), 01 October, 1991 (01.10.91), Claims & JP, 4-211015, A Claims & CA, 2035179, A & US, 5356887, A	3-5,13
A	HARDMAN, J. G., et al., (ed.), "Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS - 9th ed", McGraw-Hill Companies(U.S.A.), pp.1523-4524	3-5,13
A	Kyouji IKEDA, "Fukukoujousen Hormone Kanren Peptide no Bunshi Seibutsugaku", Nihon Rinshou 53(4), 1995, pp.37-45, Hajimeni, IV. Akusei Shuyou to PTHRP	3-5,13
A	WO, 96/33735, A1 (Cell Genesys, Inc.). 31 October, 1996 (31.10.96) Claims; implementation example 7 & JP, 11-505523, A, Claims; implementation example 7 & EP, 822830, A1 & AU, 9656322, A & KR, 99008096, A & US, 6075181, A	10-13
A	JP, 11-80025, A (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 23 March, 1999 (23.03.99), Claims & WO, 98/51329, & EP, 1004313, A1 & AU, 9872369, A & NO, 9905558, A	10-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/04523

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	WO, 00/00219, A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 06 January, 2000 (06.01.00) Claims; page 2, the last line to page 3, the last line & AU, 9942899, A	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
 Int.Cl⁷ A61K45/00, 39/395, A61P3/14, 5/18

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.Cl⁷ A61K45/00, 39/395, A61P3/14, 5/18

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)
 CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), BIOSIS (STN),
 BIOTECHABS (STN), JICST (JOIS), WPI (DIALOG)

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
X	JP, 4-228089, A (鐘淵化学工業株式会社), 18. 8月. 1992 (18. 08. 92), 特許請求の範囲, 【0008】 - 【0010】 (ファミリーなし)	1-5, 7-10, 13
X	JP, 2-207099, A (東亜燃料工業株式会社), 16. 8月. 1990 (16. 08. 90), 特許請求の範囲, 第1頁右下欄-第2頁右下欄第7行(ファミリーなし)	1-6, 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。

- | | |
|--|---|
| <p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p> <p>「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの</p> <p>「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)</p> <p>「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</p> <p>「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</p> | <p>の日の後に公表された文献</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「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</p> <p>「&」 同一パテントファミリー文献</p> |
|--|---|

国際調査を完了した日 09. 08. 00

国際調査報告の発送日 22.08.00

国際調査機関の名称及びあて先
 日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号100-8915
 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)
 今村 玲 英 子 印
 4C 9736
 電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 7-165790, A (東燃株式会社), 27. 6月. 1995 (27. 06. 95), 特許請求の範囲, 【0001】, 【0002】, 【0006】, 【0008】 (ファミリーなし)	1-6, 13
X	WO, 98/13388, A1 (中外製薬株式会社), 2. 4月. 1998 (02. 04. 98), 特許請求の範囲, 第3頁第17-22行, 実施例, & JP, 11-92500, A, & EP, 962467, A1, & ZA, 9708590, A, & AU, 9743972, A, & NO, 9901449, A, & CN, 1237983, A	1-8, 10-13
X	WO, 92/17602, A1 (THE GENERAL HOSPITAL CORPORATION OFFICE OF TECHNOLOGY AFFAIRS), 15. 10月. 1992 (15. 10. 92), 特許請求の範囲, 第40頁第14行-第49頁第6行, & JP, 6-506598, A, 特許請求の範囲, 第13頁左上欄-第15頁左上 欄, & EP, 579758, A1, & US, 5886148, A	1-7, 9, 13
X	WO, 96/03437, A1 (SANDOZ LTD.), 8. 2月. 1996 (08. 02. 96), 特許請求の範囲, & JP, 10-502091, A, 特許請求の範囲, & AU, 9531670, A, & EP, 7739958, A1, & FI, 9700168, A, & NO, 9700356, A, & ZA, 9506331, A, & BR, 9508433, A, & KR, 97704782, A, & MX, 700446, A1	1-6, 13
X	US, 5849695, A (The Regents of the University of California), 15. 12. 1998 (15. 12. 98), 特許請求の範囲, 要約 (ファミリーなし)	1-6, 13
X	WO, 92/00753, A1 (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 23. 1月. 1992 (23. 01. 92), 特許請求の範囲, 第1頁第10-22行, & JP, 5-509098, A, 特許請求の範囲, 第5頁右下欄-第6頁左上欄, & AU, 9182900, A, & EP, 539491, A1	1-6, 13
A	EP, 449405, A2 (MERCK & CO. INC.), 1. 10月. 1991 (01. 10. 91), 特許請求の範囲, & JP, 4-211015, A, 特許請求の範囲, & CA, 2035179, A, & US, 5356887, A	3-5, 13
A	HARDMAN, J. G., <i>et al.</i> (ed.), "Goodman and Gilman's THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS - 9th ed", McGraw-Hill Companies (U. S. A.), pp. 1523-4524	3-5, 13

C (続き). 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	池田恭治, 「副甲状腺ホルモン関連ペプチドの分子生物学」, 日本臨床, 53(4), 1995, pp. 37-45, はじめに, IV. 悪性腫瘍とPTHrP	3-5, 13
A	WO, 96/33735, A1 (CELL GENESYS, INC.), 31. 10月. 1996 (31. 10. 96), 特許請求の範囲, 実施例7, & JP, 11-505523, A, 特許請求の範囲, 実施例7, & EP, 822830, A1, & AU, 9656322, A, & KR, 99008096, A, & US, 6075181, A	10-13
A	JP, 11-80025, A (中外製薬株式会社), 23. 3月. 1999 (23. 03. 99), 特許請求の範囲, & WO, 98/51329, & EP, 1004313, A1, & AU, 9872369, A, & NO, 9905558, A	10-13
PX	WO, 00/00219, A1 (中外製薬株式会社), 6. 1月. 2000 (06. 01. 00), 特許請求の範囲, 第2頁最下行-第3頁最下行, & AU, 9942899, A	1-13