明 細 書

悪液質治療剤

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悪液質治療剤に関する。

背景技術

末期癌患者にみられる悪液質は、悪性腫瘍の随伴性症候群の一つであり、食欲不振、体重減少、貧血、水電解質の異常、免疫異常などを主症状とする全身状態の不良をきたす。癌患者にとって、悪液質の発症は、生命を脅かす終末期症状をもたらすのみならず、患者の QOL (Quality of life) を著しく損ない、患者自身はもちろん、家族や周囲の人に強い精神的、身体的、社会的影響を及ぼす。

近年、癌悪液質の原因物質であると考えられていたカケクチンが、腫瘍壊死因子（TNF）と同一因子であることが明らかになった。その後、インターロイキン１（IL-1）や IL-6、LIF、IFN などのサイトカインにも同様の作用が明らかになり、癌悪液質は、複数の因子による複合的に作用する病態であることが明らかになってきた。

ヒト口腔底癌由来 OCC-1 細胞株は、このような癌悪液質に関連する種々の液性因子を産生することが知られており、OCC-1 細胞をヌードマウスに移植すると、悪液質などの諸症状を発症させる（Kajimura N. et al., Cancer Chemother. Pharmacol., 1996, 38 Suppl. pS48-52、Tanaka R. et al., Jpn. J. Clin. Oncology Apr.1996, 26 (2) p88-94）。これは、ヌードマウスに移植された OCC-1 細胞株が、増殖と共に種々のサイトカイン（G-CSF、IL-6、LIF、IL-11、PTHrP など）を産生し、これらの因子が複合的に作用して、上記諸症状を発症させると考えられる。

このように、OCC-1 細胞株を移植したヌードマウスの症状は、ヒト末期癌患者の症状ときわめて共通性が高いと考えられる。しかしながら、現在に至るまでこのような悪液質に対する薬剤についての報告は知られていない。

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、悪液質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、かかる治療剤を提供すべく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、目的が達成されることを見出し、本発明を完成するに至った。

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悪液質治療剤である。

上記悪液質としては癌由来のものが挙げられる。

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悪液質治療剤である。

本明細書中で「PTHrP 受容体」とは、例えば特表平 6-506598 号公報に記載されている PTHrP と結合する受容体を指し、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。

抗 PTHrP 抗体としては、例えばヒト型化抗体、ヒト抗体（WO96/33735 号公報）又はキメラ抗体（特開平 4-228089 号公報）などの公知の抗体のほか、本発明における抗体（#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、ポリペプチドや低分子を含むが、例えば PTHrP に対して拮抗的に PTHrP 受容体に結合す

る物質、例えば特開平 7-165790 号公報、Peptides (UNITED STATES) 1995, 16 (6) 1031-1037、Biochemistry (UNITED STATES) Apr.281992, 31 (16) 4026-4033、特表平 5-509098 号公報に記載の 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、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。

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、悪液質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日に、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、基本的には公知技術を使用し、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。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。

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. Immnol. (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)、FO (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。

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 RPMI1640 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℃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、通常の選択培養液、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) 継続する。ついで、通常の限界希釈法を実施し、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（国際特許出願公開番号 WO 94/25585 号公報、WO 93/12227 号公報、WO 92/03918 号公報、WO 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。

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、Vandamme, 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 抗体の可変 (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, 5294-5299)、AGPC 法 (Chomczynski, P. et al., Anal. Biochem. (1987) 162, 156-159) 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 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の塩基配列を公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェイ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、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の途中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. et 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、既知の方法を用いて製造することができる。

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られる。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

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法により合成する。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が得られる（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.et al., 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、Cγ1、Cγ2、Cγ3、Cγ4を、L鎖ではCκ、Cλ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 日に、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イン 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）。

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所望のアミノ酸配列をコードする DNA 部分を鋳型とし、その両端を規定するプライマー対を用いて 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ライマー対を組み合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、それらを含有する発現ベクター、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。

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 1α（HEF1α）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（Nature (1979) 277, 108）により、また、HEF1α 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（Nature (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。

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、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (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、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、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カ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カ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, 1988）。

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。

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、洗浄した後、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。

9．投与方法および製剤

本発明の治療剤は、悪液質に対する治療又は改善を目的として使用される。また、悪液質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、J. Urol. (UNITED STATES) Mar 1995, 153 (3 Pt 1) p854-857、Langenbecks Arch. Chir. Suppl II Verh Dtsch Ges Chir (GERMANY) 1990, p261-265、Oncology (SWITZERLAND) 1990, 47 (1) p87-91、Int. J. Pancreatol. (UNITED STATES) Aug-Nov 1990, 7 (1-3) p141-150、J. Natl. Cancer Inst. (UNITED STATES) Dec 19, 1990, 82 (24) p1922-1926 などに記載の悪液質が挙げられる。

また、癌由来でないものとして、JPEN J. Parenter. Enteral Nutr. (UNITEDSTATES) Nov-Dec 1990, 14 (6) p605-609、Chest (UNITED STATES) Nov 1990,

98 (5) p1091-1094、Bone Marrow Transplant. (ENGLAND) Jul 1990, 6 (1) p53-57 などに記載の悪液質が挙げられる。

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 0.001mg から 1000mg の範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり 0.01～100000mg/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、悪液質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、キサンタンガム、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て選ばれるが、もちろん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、抗 PTHrP 抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

図２は、抗 PTHrP 抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

図３は、抗 PTHrP 抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

図４は、抗 PTHrP 抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

図５は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。

図６は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。

図７は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。

図８は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。

図９は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。

図１０は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。

図１１は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。

図１２は、抗体結合活性の測定結果を示す図である。

図１３は、ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。

図１４は、ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。

図１５は、ヒト型化抗体の中和活性を示す図である。

図１６は、ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

図１７は、ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

図１８は、ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

図１９は、ヒト型化抗体の悪液質に対する治療効果を示す図である。

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。

〔実施例１〕悪液質モデル動物での薬効試験

ヒト腫瘍－ヌードマウス移植系の悪液質モデル動物を用いて、PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体の悪液質に対する治療効果を検討した。

モデル動物としてヒト口腔底癌 OCC-1（（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードマウスを用いた。ヒト口腔底癌 OCC-1 を移植されたヌードマウスは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの悪液質症状を発症する。ヒト口腔底癌 OCC-1 によって引き起こされる悪液質症状を、マウスモノクローナル抗体が改善することを、血中カルシウム濃度、体重および延命効果を指標にして評価した。

ヒト口腔底癌 OCC-1 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。薬効評価には、6 週齢雄性 BALB/c-nu/nu ヌードマウス（日本クレア）を購入し、１週間の馴化の後、7 週齢の動物を使用した。

悪液質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、継代しているヒト口腔底癌 OCC-1 を摘出し、３ｍｍ角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に１匹あたり１個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、10 日目に腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、血中カルシウム濃度、体重および腫瘍体積を指標として各指標が平均化するように群分けし、悪液質モデル動物とした。

悪液質に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。

(1) 生存期間の観察

延命効果の検討では、マウスモノクローナル抗体を週２回投与して、生存期間の観察を行った。また、既に高カルシウム血症治療薬として処方されているパミドロネート（アレディア）を、15mg/Kg の用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を 0.2ml/mouse で尾静脈内に週２回投与した。その結果を図１に示す。

(2) 血中カルシウム濃度の観察

上記で作製、群分けした悪液質モデル動物に、マウス１匹あたり 10μg または 100μg の PTHrP に対するマウスモノクローナル抗体を尾静脈内に２日おきに２回投与した。また、既に高カルシウム血症治療薬として処方されているパミドロネート（アレディア）を、15mg/Kg の用量で尾静脈内に単回投与した。対照として、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を 0.2ml/mouse で尾静脈内に２日おきに２回投与した。

(3) 血中カルシウムの測定

マウスモノクローナル抗体投与後、１日および４日目に血中カルシウム濃度を測定し、各抗体の薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、眼窩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。体重は、抗体投与後４日目まで毎日測定した。その結果を、図２および図３に示す。

(4) 腫瘍重量の測定

腫瘍体積は、抗体投与後４日目に、腫瘍の長径（a mm）および短径（b mm）を測定し、ギャランの計算式 $ab^2/2$ により腫瘍体積として算出した。その結果を、図４に示す。

以上の結果より、血中カルシウム濃度については、抗体濃度 10μg では、パミドロネート投与群と差がないにも関わらず、悪性腫瘍に伴う体重減少をパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制した。抗体濃度 100μg を投与した群では、血中カルシウム濃度の上昇をパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制し、体重減少もパミドロネート投与群又は対照群に比べて抑制した。また、抗 PTHrP 中和抗体 100μg を週２回投与した群では、パミドロネート投与群又は対照群に比べて有意な生存期間の延長（p=0.0003：Log Rank test）が認められた。このことから、PTHrP に対する中和マウスモノクローナル抗体は体重減少抑制、生存期間の延長など既存の高カルシウム血症治療薬にはない効果を有する。したがって本抗体の悪性腫瘍に伴う悪液質の治療薬としての有用性が示された。

〔実施例２〕 高カルシウム血症・悪液質モデル動物での薬効試験

ヒト腫瘍－ヌードマウス移植系の悪液質モデル動物を用いて、PTHrP に対するヒト型化抗体バージョンｑの悪液質に対する治療効果を検討した。

モデル動物としてヒト口腔底癌 OCC-1（（財）実験動物中央研究所より購入）を移植したヌードマウスを用いた。ヒト口腔底癌 OCC-1 を移植されたヌードマウスは、腫瘍の増加に伴い血中カルシウム濃度が上昇し、体重減少や運動量の低下などの悪液質症状を発症する。ヒト口腔底癌 OCC-1 によって引き起こされる悪液質症状を、ヒト型化抗体バージョンｑが改善することを、血中カルシウム濃度、体重および延命効果を指標にして評価した。

ヒト口腔底癌 OCC-1 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。薬効評価には、6 週齢雄性 BALB/c-nu/nu ヌードマウス（日本クレア）を購入し、１週間の馴化の後、7 週齢の動物を使用した。

悪液質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、継代しているヒト口腔底癌 OCC-1 を摘出し、３ｍｍ角ブロックに細かく刻んだ腫瘍塊をマウスの脇腹皮下に１匹あたり１個ずつ移植した。腫瘍塊移植後、10 日目に腫瘍体積が十分に大きくなったのを確認した後、腫瘍体積、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、悪液質モデル動物とした。

悪液質に対する治療効果の検討は、以下のようにして行った。

(1) 生存期間の観察

延命効果の検討では、ヒト型化抗体バージョンｑを週２回尾静脈内に投与して、生存期間の観察を行った。対照として、リン酸バッファー生理食塩水（PBS）を 0.1ml/mouse で尾静脈内に週２回投与した。その結果を図 16 に示す。

(2) 血中カルシウム濃度の観察

上記で作製、群分けした悪液質モデル動物に、マウス１匹あたり 10μｇまたは 100μｇのヒト型化抗体バージョンｑを尾静脈内に２日あけて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 0.1ml/mouse で同様に投与した。

(3) 血中カルシウムの測定

ヒト型化抗体バージョンｑ初回投与後、１日および４日目に血中カルシウム濃度を測定し、抗体の薬効評価を行った。血中カルシウム濃度は、眼窩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（CHIRON）を用いて全血イオン化カルシウム濃度として測定した。体重は、４日目まで毎日測定した。その結果を、図 17 および図 18 に

示す。

(4) 腫瘍重量の測定

腫瘍体積は、初回投与時および４日目に、腫瘍の長径（a mm）および短径（b mm）を測定し、ギャランの計算式 $ab^2/2$ により算出した。その結果を図 19 に示す。

以上の結果のように、ヒト型化抗体バージョンｑを 10μｇあるいは 100μｇを投与することで、悪性腫瘍に伴う血中カルシウム濃度の上昇及び体重の減少は対照群に比べて抑制された。また、ヒト型化抗体バージョンｑを 100μｇ、週 2 回投与し続けた場合、対照群に比べて有意な生存期間の延長（p=0.0108：Log Rank test）が認められた。今回のヒト型化抗体バージョンｑの悪性腫瘍に伴う悪液質モデル動物に対する効果は、すでに報告したマウスモノクローナル抗体の効果と同様のものであった。このことから、本抗体の悪性腫瘍に伴う高カルシウム血症・悪液質の治療薬としての有用性が示された。

〔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）（配列番号 75）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 を、佐藤幹二らにより作製された（Sato, K. et al., J. Bone Miner. Res. 8, 849-860, 1993）。

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２μg/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 μｇ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。

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、キャリアータンパクを結合していないＰＴＨｒＰ（１－３４）を動物あたり 50μｇを

最終免疫した。

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。

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 としてブダペ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 Extraction Buffer 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。ｍＲＮＡ沈殿物を Elution Buffer 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２μｇを鋳型としてＭＨＣ２プライマー 10pmole を加え、逆転写酵素と 52℃、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℃、30 分間）した後、エタノール沈殿によりｃDNA を精製した。Ｔ４ＲＮＡリガーゼで 37℃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。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 50μｌ中に 10mM Tris-HCl(pH8.3)、50mM KCl、0.25mM dNTPs(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)、1.5 mM $MgCl_2$、2.5 ユニットの TaKaRa Taq（宝酒造）、10pmole のアンカー(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１μｌを含有する。この溶液に 50μｌの鉱油を上層した。PCR は Thermal Cycler Mode 1480J(Perkin Elmer) を用い、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。

(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(Clonetech)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２μｇを鋳型と

して oligo-dT プライマーを加え、逆転写酵素と 52℃、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℃、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Ｔ４ＲＮＡリガーゼで 37℃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λ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 シンセサイザー（ABI 社）を用いて合成した。PCR 溶液は、その 100 μｌ中に 10 mM Tris-HCl（pH８．３）、50mM KCl、0.25mM ｄＮＴＰｓ（dATP, dGTP, dCTP, dTTP）、1.5mM $MgCl_2$、2.5 ユニットの AmpliTaq（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１μｌを含有する。この溶液に 50μｌの鉱油を上層した。PCR は Thermal Cycler Model480J (Perkin Elmer) を用い、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取り、GENECLEAN II Kit(BIO101)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 20μｌに溶解した。得られた DNA 溶液１μｌを制限酵素 XmaI (New England Biolabs)により 37℃で１時間消化し、次いで制限酵素 EcoRI（宝酒造）により 37℃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℃

で1時間反応させ連結した。次に 10μl 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 μl に加え、この細胞を氷上で 15 分間、42℃にて１分間、さらに氷上で１分間静置した。次いで 300 μl のＳＯＣ培地（Molecular Cloning: A Labgoratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)を加え 37℃にて 30 分間インキュベートした後、100 μｇ／ｍｌ又は 50 μｇ／ｍｌのアンピシリン、0.1mM の IPTG、20μｇ／ｍｌのＸ－ｇａｌを含むＬＢ寒天培地または２ｘＹＴ寒天培地（Molecular Cloning: A Labgoratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)上にこの大腸菌をまき、37℃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 μｇ／ｍｌ又は 50μｇ／ｍｌのアンピシリンを含有するＬＢ培地または２×ＹＴ培地２ｍｌで 37℃にて一夜培養し、菌体画分からプラスミド抽出機 PI-100Σ（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。Ｈ鎖Ｖ領域及びＬ鎖Ｖ領域断片のポリペプチドは、ともに配列番号 57、65 で表される塩基配列の第 58 番目（グルタミンをコードする）から開始されている。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	ＣＤＲ１	ＣＤＲ２	ＣＤＲ３
Ｈ鎖Ｖ領域	57	31-35	50-66	99-107
Ｌ鎖Ｖ領域	65	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

ヒトＨ鎖Ｃ領域Ｃγ１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５’一側をコードする 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。前方プライマーＭＢＣ１－ａ（配列番号８）はＪ領域の３’一側をコードする DNA 配列にハイブリダイズし、且つ、スプライス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、50μｌの反応混合液に鋳型DNA として0.07μｇ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ｄＮＴＰ含む条件で添付緩衝液を使用して 50μｌの鉱油を上層し、94℃にて１分間、55℃にて１分間、72℃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取り、GENECLEAN II Kit(BIO101)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 20μｌに溶解した。得られたDNA 溶液１μｌを制限酵素BamHI、Hind III （宝酒造）により 37℃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 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 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有し、５’一側に Hind III 認識配列及びKozak 配列、３’一側に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

ヒトＨ鎖Ｃ領域Ｃγ１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 MBC1HVS2 -

（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. et al., J. Mol. Biol., 196, 947-950, 1987)並びに Hind III 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（配列番号 10）はＪ領域の３’一側をコードする DNA 配列にハイブリダイズし、且つ、Ｃ領域の５’一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、50μｌの反応混合液に鋳型 DNA として 0.6μｇのプラスミド MBC1H/pUC19 、プライマーとして MBC1HVS2 および MBC1HVR2 をそれぞれ 50pmole 、TaKaRa Ex Taq を 2.5U、0.25mM のｄＮＴＰ含む条件で添付の緩衝液を使用して 50μｌの鉱油を上層して 94℃１分間、55℃１分間、72℃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、GENECLEAN II Kit(BIO101)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 をエタノール沈殿させた後、10mM Tris-HCl(pH7.4)、１mM EDTA 溶液 20μｌに溶解した。

得られた DNA 溶液１μｌを制限酵素 EcoRI および SmaI（宝酒造）により 37℃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有し、５’一側に EcoRI および Hind III 認識配列及び Kozak 配列、３’一側に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Ｃγ１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-△E-RVh-PM-1-f（WO92/19759 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（WO92/19759 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Ｃγ１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-△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－１α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Ｃγ１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-BamHI 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-△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Ｃγ１をコードするｃDNA を含む発現ベクター RVh-PM1f－ｃDNA を構築した。

ヒト型化ＰＭ１抗体Ｈ鎖Ｖ領域およびヒト抗体Ｃ領域Ｃγ１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Ｃγ１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-gγ

1（WO92/19759 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 Adaptor（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 pCHO1 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/pCHO1 と命名した。なお、発現ベクター pCHO1 は、DHFR- △E-rvH-PM1-f（WO92/19759 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 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２μｇを 20mM Tris-HCl（pH8.5）、10mM $MgCl_2$、１mM DTT、100 mM KCl、８Ｕの Hind III（宝酒造）を含有する反応混合液 20μｌ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し、DNA をエタノール沈殿により回収した。

回収した DNA を 50mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM $MgCl_2$、１mM DTT、100mM NaCl、0.5mM dNTP、６Ｕのクレノウ(Klenow)フラグメント（GIBCO BRL)を含有する 50μｌ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。

回収したベクター DNA を 50mM Tris-HCl (pH7.6)、10mM $MgCl_2$、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 10μｌ中で 16℃で２時間反応させ、自己連結させた。反応混合液５μｌを大腸菌 JM109 コンピテント細胞（ニッポンジーン）100 μｌに加え、氷上で 30 分間静置した後、42℃にて１分間、さらに氷上で１分間静置した。ＳＯＣ培地 500 μｌを加えて、37℃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×ＹＴ寒天培地（50μg/ml アンピシリン含有）（Molecular Cloning: A Labgoratory Manual, Sambrook, et al., Cold Spring Harbor Laboratory -

Press, 1989)にまき、37℃で一夜培養して形質転換体を得た。

形質転換体を、50μg/ml アンピシリンを含有する２×ＹＴ培地 20ml で 37℃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 ΔHind 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

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。

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 合成機(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。

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５Ｕの TaKaRa Ex Taq (宝酒造) とを含有する 100 μ l の反応混合液、あるいは 0.5pmole の HLAMB3 および 5 pmole

の HLAMB4 と５Uの TaKaRa Ex Taq （宝酒造）とを含有する 100 μｌの反応混合液を用い、50μｌの鉱油を上層して 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50μｌずつ混合し、50μｌの鉱油を上層して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(BIO101) を用い、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 $MgCl_2$、１mM DTT、 100mM NaCl 、８U の EcoRI （宝酒造）を含有する 20μｌの反応混合液中で 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、10mM Tris-HCl(pH7.4)、１mM EDTA 溶液８μｌに溶解した。

プラスミド pUC19 ΔHind III 0.8μｇ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 Δ Hind III を 50 mM Tris-HCl (pH9.0)、１mM $MgCl_2$、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 50μｌ中で 37℃、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)、１mMEDTA 溶液 10μｌに溶解した。

上記のＢＡＰ処理したプラスミド pUC19 ΔHind III１μｌと先の PCR 産物４μｌ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 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。

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 シークエンサー (ABI 社) を用い、プライマーには M13 Primer M4 および M13 Pricer 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ＣλΔ／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ＣλΔ／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100μｌの反応混合液を用い、50μｌの鉱油を上層して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(BIO101)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の鉱油を上層して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100μｌの反応混合液を用い、50μｌの鉱油を上層した。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(BIO101)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 DNAシークエンサー(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 (WO92/19759) 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 合成機(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、BlnI 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。

鋳型となるプラスミド HEF-PM1k-gk 0.1 μｇ、プライマー HKAPS 、HKAPA 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(BIO101) を用いてゲルから回収、精製した。

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 ΔHind 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、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の塩基配列を M13 Primer M4 、M13 Primer RV (宝酒造) を用い、373A DNA シークエンサー(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Ｃκ／pUC19 とした。

(3) キメラ抗体Ｌ鎖発現ベクターの構築

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Ｃλ／pUC19 、Ｃκ／pUC19 のヒト抗体定常領域の直前にある Hind III、BlnI 部位に、#23-57-137-1 Ｌ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。

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 合成機(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BglII 、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 $MgCl_2$ 、0.2mM ｄＮＴＰ、0.1μｇの MBC1L24 、プライマーとして MBCCHL1 および MBCCHL3 を各 50pmole 、１μｌの AmpliTaq(PERKIN ELMER) を含有する100μｌの反応混合液を用い、50μｌの鉱油を上層して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 II kit(BIO101)を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4) 、１mM EDTA 溶液 20μｌに溶解した。PCR 産物１μｌをそれぞれ 10mM Tris-HCl (pH7.5)、10mM $MgCl_2$、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 20μｌ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８μｌに溶解した。

プラスミド pUC19 １μｇ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10μｌに溶解した。

ＢＡＰ処理したプラスミド pUC19 １μｌと先の PCR 産物４μｌを DNA LigationKit 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 50μｇ／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、50μｇ／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QIAprep 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１μｇをそれぞれ20mM Tris-HCl(pH8.5)、10mM $MgCl_2$、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 20μｌ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℃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10μｌに溶解した。

#23-57-137-1Ｌ鎖Ｖ領域を含むプラスミド CHL/pUC19 から８μｇ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(BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl (pH7.4)、１mM EDTA 溶液10μｌに溶解した。

このＬ鎖Ｖ領域 DNA ４μｌをＢＡＰ処理したプラスミドＣλ／pUC19 またはＣκ／pUC19 各１μｌにサブクローニングし、大腸菌ＪＭ１０９コンピテント細胞に形質転換した。50μg/ml アンピシリンを含有する２×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。

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(BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、１mMEDTA 溶液10μｌに溶解した。

発現ベクターとしてプラスミドHEF-PM1k-gk 2.7 μｇ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(BIO101) を用いてゲルから回収、精製し、10mM Tris-HCl(pH7.4)、１mM EDTA 溶液10μｌに溶解した。

ＢＡＰ処理したＨＥＦベクター２μｌを上記プラスミド MBC1L(λ) またはMBC1L(κ) EcoRI 断片各３μｌと連結し、大腸菌ＪＭ１０９コンピテント細胞に形質転換した。50μg/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。

精製したプラスミドを、20mM Tris-HCl (pH8.5) 、10mM $MgCl_2$、１mM DTT、100mM KCl 、８Uの Hind III (宝酒造) および２Uの PvuI (宝酒造) を含有する反応混合液20μｌ中で 37℃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、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、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ装置（ＢｉｏＲａｄ）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１ｘ１０^{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 DNA１０μｇ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CO_2 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 ＭＡＰＳＩＩ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 $NaHCO_3$ 、0.02% NaN_3 ）で１μｇ／ｍｌの濃度に調製したヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体（ＴＡＧＯ）１００μｌで固相化し、２００μｌの希釈バッファー（50mM Tris-HCl、1mM $MgCl_2$ 、0.1M NaCl 、0.05% Tween20、0.02% NaN_3 、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）１００μｌ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。濃度測定のスタンダードとして、Ｈｕ　ＩｇＧ１λ　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１μｇ／ｍｌの濃度に調製したヒトＰＴＨｒＰ（１－３４）（ペプチド研究所）１００μｌで固相化した。２００μｌ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、アルカリフォスファターゼ結合ヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体（ＴＡＧＯ）１００μｌ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（ＢｉｏＲａｄ）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（図５）。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ＭＢＣ１ＨｃDNA／pCHO1 とＭＢＣ１Ｌ（λ）／ｎｅｏまたはＭＢＣ１ＨｃDNA／pCHO1 とＭＢＣ１Ｌ（κ）／ｎｅｏの組み合わせで、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ装置（ＢｉｏＲａ

d）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 10μｇを加え、1,500 Ｖ，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）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CO_2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、0.2μｍ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　ａｎｄｓｏａｋ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２０μｌ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、１００μｌ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１μｌ、０．２５ｍＭ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℃にて１分間、５５℃にて１分間、７２℃にて１分間の温度サイクルで５回行い、さらに５０ｐｍｏｌｅ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取り、ＧＥＮＥＣＬＥＡＮＩＩ Ｋｉｔ（ＢＩＯ１０１）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２０μｌ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Ｃγ１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領域のリーダー配列の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３’一側をコードするDNA配列にハイブリダイズし且つＣ領域の５’
一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０．４μｇのｈＭＢＣＨｖ／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℃にて１分間、５５℃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法により増幅したDNA断片を３％ＮｕＳｉｅｖｅＧＴＧ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（ＢＩＯ１０１）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），１

mM ＥＤＴＡ溶液２０μｌ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Ｃγ１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pCHO1 に導入した。こうして得られたヒト型化抗体の発現プラスミドをｈＭＢＣ１ＨｃDNA／pCHO1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ＡｆｌＩＩ切断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１０μｇを１０mMＴｒｉｓ－HCｌ（pH7．５），１０mM $MgCl_2$，１mMDTT，５０mMNaCｌ，０．０１％（w／ｖ）ＢＳＡ，ＡｆｌＩＩ（宝酒造）１０Ｕを含有する反応混合液１００μｌ中で３７℃にて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）／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、ＧＥＮＥＣＬＥＡＮＩＩＫｉｔ（ＢＩＯ１０１）を用いてゲルから回収、精製した。

回収したｃ１、ｈ１断片各１μｇ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（pH7．４），１mM　ＥＤＴＡ溶液１０μｌに溶解した。

ＢＡＰ処理したｃ１及びｈ１断片１μｌをそれぞれｈ２、ｃ２断片４μｌに連結し（４℃、一夜）、大腸菌ＪＭ１０９コンピテント細胞に形質転換した。５０μｇ／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ＱＩＡｐｒｅｐＳｐｉｎＰｌａｓｍｉｄＫｉｔ（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、１０mMＴｒｉｓ－HCｌ（pH7．５），１０mM $MgCl_2$，１mMDTT，ＡｐａＬＩ（宝酒造）２Ｕ、またはＢａｍＨＩ（宝酒造）８Ｕ，ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造）８Ｕを含有する反応混合液２０μｌ中で３７℃、１時間消化した。ｃ1-ｈ２が正しく連結されていれば、ＡｐａＬＩ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、ｐＵＣ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ＦＲ３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。

プラスミドＭＢＣ１Ｌ（λ）／ｐＵＣ１９、ｈＭＢＣ１Ｌａλ／ｐＵＣ１９及びｈＭＢＣ１Ｌｄλ／ｐＵＣ１９の各１０μｇを１０ｍＭＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５），１０ｍＭＭｇＣｌ$_2$，１ｍＭＤＴＴ，５０ｍＭＮａＣｌ，０．０１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ，ＨｉｎｄＩＩＩ１６Ｕ，ＡｆｌＩＩ４Ｕを含有する反応混合液３０μｌ中で３７℃、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からそれぞれ３２１８ｂｐ（ｈａ１’，ｈｄ１’）のDNA断片をＧＥＮＥＣＬＥＡＮＩＩ　Ｋｉｔ（ＢＩＯ１０１）を用いてゲルから回収、精製した。

ｈａ１’、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。５０μｇ／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ＱＩＡｐｒｅｐＳｐｉｎＰｌａｓｍｉｄＫｉｔ（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、ＧＥＮＥＣＬＥＡＮＩＩ　Ｋｉｔ（ＢＩＯ１０１）を用いてゲルから回収、精製し、１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４），１ｍＭ　ＥＤＴＡ溶液２０μｌに溶解した。

各DNA断片４μｌを前述のＢＡＰ処理したＨＥＦベクター１μｌに連結し、大腸菌ＪＭ１０９コンピテント細胞に形質転換した。５０μｇ／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ＱＩＡｐｒｅｐＳｐｉｎＰｌａｓｍｉｄＫｉｔ（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、２０mMＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５），１０mM $MgCl_2$，１mMＤＴＴ，１００mMＫＣｌ，ＨｉｎｄＩＩＩ（宝酒造）８Ｕ，ＰｖｕＩ（宝酒造）２Ｕを含有する反応混合液２０μｌ中で３７℃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／ｈＭＢＣ１Ｌａλ／ｎｅｏ、ｍ／ｈＭＢＣ１Ｌｄλ／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。

プラスミドＭＢＣ１Ｌ（λ）／ｎｅｏ及びｈ／ｍＭＢＣ１Ｌ（λ）／ｎｅｏの各１０μｇを１０mM Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．９），１０mM $MgCl_2$，１mM ＤＴＴ，５０mM ＮａＣｌ，０．０１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ，ＳｎａＢＩ（宝酒造）６Ｕを含有する反応混合液２０μｌ中で３７℃にて１時間消化した。次に２０mMＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ８．５），１０mM $MgCl_2$，１mM ＤＴＴ，１００mM ＫＣｌ，０．０１％（ｗ／ｖ）ＢＳＡ，ＰｖｕＩ６Ｕを含有する反応混合液５０μｌ中で３７℃にて１時間消化した。

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（ＢＩＯ１０１）を用いてゲルから回収、精製し、１０mM Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４），１mM ＥＤＴＡ溶液４０μｌに溶解した。

ｍ１、ｈｍ１断片１μｌをそれぞれｈｍ２、ｍ２断片４μｌに連結し、大腸菌ＪＭ１０９コンピテント細胞に形質転換した。５０μｇ／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ＱＩＡｐｒｅｐＳｐｉｎＰｌａｓｍｉｄＫｉｔ（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、１０mMＴｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．５），１０mM $MgCl_2$，１mMＤＴＴ，ＡｐａＩ（宝酒造）８Ｕ、またはＡｐａＬＩ（宝酒造）２Ｕを含有する反応混合液２０μｌ中で３７℃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

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。

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ＭＢＣ１ＬＶＳ１（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ＭＢＣ１ＬＧＰ１及びＭＢＣ１ＬＧＰ４とホモロジーを有する。

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　ａｎｄｓｏａｋ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２０μｌの１０ｍＭ　Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ（ｐＨ７．４），１ｍＭＥＤＴＡ溶液に溶解した。

PCRは、ＴａＫａＲａ　Ｅｘ　Ｔａｑ（宝酒造）を用い、１００μｌ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１μｌ、０．２５ｍＭ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℃にて１分間、５５℃にて１分間、７２℃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。

４２１ｂｐ長のDNA断片を含有するアガロース片を切取り、ＧＥＮＥＣＬＥＡＮＩＩ Ｋｉｔ（ＢＩＯ１０１）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、１００μｌの反応混合液に鋳型DNAとして０．６μｇ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５０μｌの鉱油を上層して９４℃にて１分間、５５℃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 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（ＢＩＯ１０１）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（ＢＩＯ１０１）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。

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ＡｆｌＩＩで消化し、ＨｉｎｄＩＩＩおよびＡｆｌＩＩ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hMBC1Laλ／pUC19と連結した。こうして得られたプラスミドをhMBC1Lcλ／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、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hMBC1Lcλ／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）によりそれぞれhMBC1Laλ／pCOS1，hMBC1Lbλ／pCOS1，hMBC1Lcλ／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で消化することより調製したCλ／pUC

１９と連結した。

こうして得られたプラスミドを順にｈＭＢＣ１Ｌｄλ／ｐＵＣ１９、ｈＭＢＣ１Ｌｅλ／ｐＵＣ１９、ｈＭＢＣ１Ｌｆλ／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、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それぞれ順にｈＭＢＣ１Ｌｄλ／pCOS1、ｈＭＢＣ１Ｌｅλ／pCOS1、ｈＭＢＣ１Ｌｆλ／pCOS1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、ｈＭＢＣ１Ｌａλ／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ｈＭＢＣ１Ｌａλ／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Ｃλ／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ＨｉｎｄＩＩＩでＩ消化し、ＡｐａＩおよびＨｉｎｄＩＩＩで消化したプラスミドｈＭＢＣ１Ｌａλ／ｐＵＣ１９およびｈＭＢＣ１Ｌｄλ／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ｈＭＢＣ１Ｌｇλ／ｐＵＣ１９およびｈＭＢＣ１Ｌｈλ／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、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それぞれ順にｈＭＢＣ１Ｌｇλ／pCOS1およびｈＭＢＣ１Ｌｈλ／pCOS1と命名した。

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４

1）とプライマーＶｌＲＶ（λ）（配列番号４３）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ｈＭＢＣ１Ｌｇλ／ｐＵＣ１９にサブクローニングした。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ｈＭＢＣ１Ｌｘλ／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、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ｈＭＢＣ１Ｌｘλ／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。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。

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 配列表における置換アミノ酸の位置

（Kabatの規定によるアミノ酸番号）

バージョン	36	43	45	47	49	80	87
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。

なお、前記プラスミドhMBC1HcDNA／pUC19およびhMBC1Lqλ／pUC19を有する大腸菌はEscherichia coli JM109（hMBC1HcDNA／pUC19）および Escherichiacoli JM109（hMBC1Lqλ／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 c

ｏｌｉ　ＪＭ１０９（hMBC1HcDNA／pUC19）についてはＦＥＲＭ　ＢＰ－５６２９、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。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／ｈＭＢＣ１Ｌａλ／ｎｅｏ、hMBC1HcDNA/pCOS1 とｍ／ｈＭＢＣ１Ｌｄλ／ｎｅｏ、hMBC1HcDNA/pCOS1 とｈｍｍＭＢＣ１Ｌ（λ）／ｎｅｏ、またはhMBC1HcDNA/pCOS1 とｍｈｍＭＢＣ１Ｌ（λ）／ｎｅｏとの組み合わせを、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ装置（ＢｉｏＲａｄ）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 DNA１０μｇ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CO_2 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。

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ｈＭＢＣ１Ｌｘλ／pCOS1（ｘ＝ａ～ｔ）のいずれかの組み合わせをＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ装置（ＢｉｏＲａｄ）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製は、ＡｆｆｉＧｅｌ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　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穴プレート（Ｍａｘｉｓｏｒｐ，ＮＵＮＣ）の各穴を固相化バッファー（０．１Ｍ $NaHCO_3$ 、０．０２％ NaN_3 ）で１μｇ／ｍｌの濃度に調製したヤギ抗ヒトＩｇＧ抗体（ＴＡＧＯ）１００μｌで固相化し、２００μｌの希釈バッファー（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ－ＨＣｌ、１ｍＭ $MgCl_2$ 、０．１Ｍ ＮａＣｌ、０．０５％ Ｔｗｅｅｎ２０、０．０２％ NaN_3 、１％ 牛血清アルブミン（ＢＳＡ）、ｐＨ７．２）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。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）１００μｌ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。濃度測定のスタンダードとして、Ｈｕ ＩｇＧ１λ Ｐｕｒｉｆｉｅｄ（ＴｈｅＢｉｎｄｉｎｇ 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１μｇ／ｍｌの濃度に調製したヒトＰＴＨｒＰ（１－３４）１００μｌで固相化した。２００μｌ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）１００μｌ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（ＢｉｏＲａｄ）で測定した。

（7） 活性確認

(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（図6）。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。

(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／hMBC1Laλあるいはm／hMBC1Ldλ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（図7）。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（図8）。これらの結果は、FR1，2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PTHrP結合能を示した（図9～12）。

（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hMB

Ｃ１ＨｃDNA／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、ＧｅｎｅＰｕｌｓｅｒ装置（ＢｉｏＲａｄ）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DNA１０μｇ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CO_2 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、0.2μm 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、ＣｏｎＳｅｐＬＣ１００（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'ＳＦ-１２培地（ＧＩＢＣＯ）中にて、CO_2 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10^4細胞／１００μｌ／穴で蒔込み１日間培養し、４mMのヒドロコルチゾンと１０%牛胎児血清を含むＨａｍ'ＳＦ-１２培地（ＧＩＢＣＯ）に交換する。さらに3ないし４日間培養した後、２６０μｌのＨａｍ'ＳＦ-１２培地（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８０μｌのＨａｍ' ｓＦ-１２を加え、３０分間３７℃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１０μｇ／ｍｌ、３．３μｇ／ｍｌ、１．１μｇ／ｍｌおよび０．３７μｇ／ｍｌの群、１０μｇ／ｍｌ、２μｇ／ｍｌ、０．５μｇ／ｍｌおよび０．０１μｇ／ｍｌの群、または１０μｇ／ｍｌ、５μｇ／ｍｌ、１．２５μｇ／ｍｌ、０．６３μｇ／ｍｌおよび０．３１μｇ／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８０μｌ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、１００μｌ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（ＣＡＹＭＡＮＣＨＥＭＩＣＡＬ'Ｓ）付属のＥＩＡバッファー１２０μｌを添加しｃＡＭＰを抽出後、ｃＡＭＰ ＥＩＡ ｋｉｔ（ＣＡＹＭＡＮＣＨＥＭＩＣＡＬ'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（図１３～１５）。

産業上の利用可能性

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悪液質治療剤が提供される。

上記物質は、悪液質モデル動物での薬効試験において、体重減少を対照と比較して抑制し、また、生存期間の延長効果も奏することから、悪液質治療剤として有用である。

配列表

配列番号：１

配列の長さ：２０

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

AAATAGCCCT TGACCAGGCA 20

配列番号：２

配列の長さ：３８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTGGTTCGGC CCACCTCTGA AGGTTCCAGA ATCGATAG 38

配列番号：３

配列の長さ：２８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGATCCCGGG CCAGTGGATA GACAGATG 28

配列番号：４

配列の長さ：２９

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGATCCCGGG TCAGRGGAAG GTGGRAACA 29

配列番号：５

配列の長さ：１７

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTTTTCCCAG TCACGAC 17

配列番号：６

配列の長さ：１７

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CAGGAAACAG CTATGAC 17

配列番号：７

配列の長さ：３１

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGAA ACTTCGGGCT C 31

配列番号：８

配列の長さ：３０

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGGATCC CTGCAGAGAC AGTGACCAGA 30

配列番号：９

配列の長さ：３６

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTCCAC CATGGGGTTT GGGCTG 36

配列番号：１０

配列の長さ：４１

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TTTCCCGGGC CCTTGGTGGA GGCTGAGGAG ACGGTGACCA G 41

配列番号：１１

配列の長さ：１０９

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCCCACGGTC ACCCTGTTCC 60

CGCCCTCCTC TGAGGAGCTC CAAGCCAACA AGGCCACACT AGTGTGTCT 109

配列番号：１２

配列の長さ：１１０

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGTTTGGTGG TCTCCACTCC CGCCTTGACG GGGCTGCCAT CTGCCTTCCA GGCCACTGTC 60

ACAGCTCCCG GGTAGAAGTC ACTGATCAGA CACACTAGTG TGGCCTTGTT 110

配列番号：１３

配列の長さ：９８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGAGTGGAGA CCACCAAACC CTCCAAACAG AGCAACAACA AGTACGCGGC CAGCAGCTAC 60

CTGAGCCTGA CGCCCGAGCA GTGGAAGTCC CACAGAAG 98

配列番号：１４

配列の長さ：１０６

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGAATTC TTACTATGAA CATTCTGTAG GGGCCACTGT CTTCTCCACG GTGCTCCCTT 60

CATGCGTGAC CTGGCAGCTG TAGCTTCTGT GGGACTTCCA CTGCTC 106

配列番号：１５

配列の長さ：４３

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTA CTTGGCCAGC CCAAGGCCAA CCC 43

配列番号：１６

配列の長さ：２０

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGAATTC TTACTATGAA 20

配列番号：１７

配列の長さ：３９

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CAACAAGTAC GCGGCCAGCA GCTACCTGAG CCTGACGCC 39

配列番号：１８

配列の長さ：３９

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTAGCTGCTG GCCGCGTACT TGTTGTTGCT CTGTTTGGA 39

配列番号：１９

配列の長さ：４６

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTGAATTC AAGCTTAGTC CTAGGTCGAA CTGTGGCTGC ACCATC 46

配列番号：２０

配列の長さ：３４

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGAATTC TTACTAACAC TCTCCCCTGT TGAA 34

配列番号：２１

配列の長さ：３５

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGC CTGGACTCCT CTCTT 35

配列番号：２２

配列の長さ：４８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGAATTC AGATCTAACT ACTTACCTAG GACAGTGACC TTGGTCCC 48

配列番号：２３

配列の長さ：１２８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG AGCTGGGTTT TCCTCGTTGC TCTTTTAAGA 60

GGTGTCCAGT GTCAGGTGCA GCTGGTGGAG TCTGGGGGAG GCGTGGTCCA GCCTGGGAGG 120

TCCCTGAG 128

配列番号：２４

配列の長さ：１２５

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

ACCATTAGTA GTGGTGGTAG TTACACCTAC TATCCAGACA GTGTGAAGGG GCGATTCACC 60

ATCTCCAGAG ACAATTCCAA GAACACGCTG TATCTGCAAA TGAACAGCCT GAGAGCTGAG 120

GACAC 125

配列番号：２５

配列の長さ：１３２

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTACCACCAC TACTAATGGT TGCCACCCAC TCCAGCCCCT TGCCTGGAGC CTGGCGGACC 60

CAAGACATGC CATAGCTACT GAAGGTGAAT CCAGAGGCTG CACAGGAGAG TCTCAGGGAC 120

CTCCCAGGCT GG 132

配列番号：２６

配列の長さ：１１０

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG GTTCCCTGGC CCCAGTAAGC AAAGTAAGTC 60

ATAGTAGTCT GTCTCGCACA GTAATACACA GCCGTGTCCT CAGCTCTCAG 110

配列番号：２７

配列の長さ：３０

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GTCTAAGCTT CCACCATGGG GTTTGGGCTG 30

配列番号：２８

配列の長さ：３０

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

TGTTGGATCC CTGAGGAGAC GGTGACCAGG 30

配列番号：２９

配列の長さ：１３３

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

ACAAAGCTTC CACCATGGCC TGGACTCCTC TCTTCTTCTT CTTTGTTCTT CATTGCTCAG 60

GTTCTTTCTC CCAGCTTGTG CTGACTCAAT CGCCCTCTGC CTCTGCCTCC CTGGGAGCCT 120

CGGTCAAGCT CAC 133

配列番号：３０

配列の長さ：１１８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

AGCAAGATGG AAGCCACAGC ACAGGTGATG GGATTCCTGA TCGCTTCTCA GGCTCCAGCT 60

CTGGGGCTGA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGTC TGAGGATGAG GCTGACTA 118

配列番号：３１

配列の長さ：１２８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTGTGGCTTC CATCTTGCTT AAGTTTCATC AAGTACCGAG GGCCCTTCTC TGGCTGCTGC 60

TGATGCCATT CAATGGTGTA CGTACTGTGC TGACTACTCA AGGTGCAGGT GAGCTTGACC 120

GAGGCTCC 128

配列番号：３２

配列の長さ：１１４

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CCCTCACAAA 60

TTGTTCCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GTAATAGTCA GCCTCATCCT CAGA 114

配列番号：３３

配列の長さ：１７

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

ACAAAGCTTC CACCATG 17

配列番号：３４

配列の長さ：１９

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCT 19

配列番号：３５

配列の長さ：７５

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA 60

TTGTTCCTTA ATTGT 75

配列番号：３６

配列の長さ：４３

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

AAAGGATCCT TAAGATCCAT CAAGTACCGA GGGGGCTTCT CTG 43

配列番号：３７

配列の長さ：４６

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

ACAAAGCTTA GCGCTACCTC ACCATCTCCA GCCTCCAGCC TGAGGA 46

配列番号：３８

配列の長さ：１１１

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTGGATCCG GGCTGACCTA GGACGGTCAG TTTGGTCCCT CCGCCGAACA CGTACACAAA 60

TTGTTCCTTA ATTGTATCAC CCACACCACA GATATAGTCA GCCTCATCCT C 111

配列番号：３９

配列の長さ：４２

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CTTCTCTGGC TGCTGCTGAT ACCATTCAAT GGTGTACGTA CT 42

配列番号：４０

配列の長さ：２６

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CGAGGGCCCT TCTCTGGCTG CTGCTG 26

配列番号：４１

配列の長さ：３５

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GAGAAGGGCC CTARGTACST GATGRAWCTT AAGCA 35

配列番号：４２

配列の長さ：３５

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

CACGAATTCA CTATCGATTC TGGAACCTTC AGAGG 35

配列番号：４３

配列の長さ：１８

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GGCTTGGAGC TCCTCAGA 18

配列番号：４４

配列の長さ：２０

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：他の核酸（合成 DNA）

配列：

GACAGTGGTT CAAAGTTTTT 20

配列番号：４５

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser Phe Ser Leu Gly
1 5 10 15

Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30

Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu Lys Pro Pro Lys
35 40 45

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Asp Arg
65 70 75

Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp Glu Ala Met Tyr
80 85 90

Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

配列番号：４６

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly
1 5 10 15

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

配列番号：４７

配列の長さ：１１６

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

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

50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg

65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80 85 90

Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val

95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

110 115

配列番号：４８

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp

50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg

65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80 85 90

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

配列番号：４９

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

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

配列番号：５０

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30

Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
35 40 45

Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

配列番号：５１

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

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

配列番号：５２

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30

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

配列番号：５３

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

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

65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80 85 90

Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val

95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro

110 115

配列番号：５４

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp

50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg

65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr

80 85 90

Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val

95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

配列番号：５５

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser Gln His Ser Thr
20 25 30

Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu Lys Gly Pro Arg
35 40 45

Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His Ser Thr Gly Asp
50 55 60

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser Gly Ala Glu Arg
65 70 75

Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
80 85 90

Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln Phe Val Tyr Val
95 100 105

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro
110 115

配列番号：５６

配列の長さ：１１８

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：タンパク質

配列：

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
35 40 45

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr
50 55 60

Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr Met Thr Tyr Phe
95 100 105

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

配列番号：５７

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ

配列：

ATG AAC TTC GGG CTC AGC TTG ATT TTC CTT GCC CTC ATT TTA AAA 45
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Ala Leu Ile Leu Lys
-15 -10 -5
GGT GTC CAG TGT GAG GTG CAA CTG GTG GAG TCT GGG GGA GAC TTA 90
Gly Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu
1 5 10
GTG AAG CCT GGA GGG TCC CTG AAA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA 135
Val Lys Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
15 20 25
TTC ACT TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG ATT CGC CAG ACT CCA 180
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro
30 35 40
GAC AAG AGG CTG GAG TGG GTC GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT 225
Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser
45 50 55
TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC 270
Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
60 65 70
AGA GAC AAT GCC AAG AAC ACC CTA TAC CTG CAA ATG AGC AGT CTG 315
Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu
75 80 85
AAG TCT GAG GAC ACA GCC ATG TTT TAC TGT GCA AGA CAG ACT ACT 360
Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Phe Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr
90 95 100
ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG ACT CTG GTC ACT GTC 405
Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
105 110 115
TCT GCA 411

Ser Ala

配列番号：５８

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍRNA

配列：

```
ATG GGG TTT GGG CTG AGC TGG GTT TTC CTC GTT GCT CTT TTA AGA    45
Met Gly Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg
                -15                 -10                 -5
GGT GTC CAG TGT CAG GTG CAG CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG    90
Gly Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val
                  1                   5                  10
GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA    135
Val Gln Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly
            15                  20                  25
TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG TCT TGG GTC CGC CAG GCT CCA    180
Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
            30                  35                  40
GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA ACC ATT AGT AGT GGT GGT AGT    225
Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser
            45                  50                  55
TAC ACC TAC TAT CCA GAC AGT GTG AAG GGG CGA TTC ACC ATC TCC    270
Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser
            60                  65                  70
AGA GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG    315
```

Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu
75 80 85

AGA GCT GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GCG AGA CAG ACT ACT 360
Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Thr Thr
90 95 100

ATG ACT TAC TTT GCT TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC 405
Met Thr Tyr Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
105 110 115

TCC TCA 411
Ser Ser

配列番号：５９
配列の長さ：１１
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
配列：

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

配列番号：６０
配列の長さ：７
配列の型：アミノ酸
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ペプチド
配列：

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr
1 5

配列番号：６１

配列の長さ：９

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Phe Thr

1 5

配列番号：６２

配列の長さ：５

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Pro Tyr Trp Met Gln

1 5

配列番号：６３

配列の長さ：１６

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

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

1 5 10 15

配列番号：６４

配列の長さ：１１

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

配列番号：６５

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAA CTT GTG CTC ACT CAG TCA TCT TCA GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Ser Ser Ala Ser
1 5 10

TTC TCC CTG GGA GCC TCA GCA AAA CTC ACG TGC ACC TTG AGT AGT 135
Phe Ser Leu Gly Ala Ser Ala Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAA CAG CCA CTC 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Leu
30 35 40

AAG CCT CCT AAG TAT GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Pro Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
45 50 55
AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCT GGA TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
60 65 70
GGT GCT GAT CGC TAC CTT AGC ATT TCC AAC ATC CAG CCA GAA GAT 315
Gly Ala Asp Arg Tyr Leu Ser Ile Ser Asn Ile Gln Pro Glu Asp
75 80 85
GAA GCA ATG TAC ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Met Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
90 95 100
TTT GTG TAT GTT TTC GGC GGT GGG ACC AAG GTC ACT GTC CTA GGT 405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly
105 110 115
CAG CCC 411
Gln Pro

配列番号：６６
配列の長さ：４０５
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ
配列：
ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG CAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp His Gln Gln Gln Pro Glu
30 35 40

AAG GGC CCT CGG TAC TTG ATG AAA CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Lys Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
75 80 85

GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGT 405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
105 110 115

配列番号：６７

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA　ｔｏ　ｍＲＮＡ

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

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

-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser

1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

30 35 40

AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225

Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His

45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270

Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315

Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp

75 80 85

GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln

90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
105 110 115
CAG CCC 411
Gln Pro

配列番号：６８
配列の長さ：４１１
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ
配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
-15 -10 -5
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
1 5 10
GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
15 20 25
CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
30 35 40
AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
60 65 70
GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
75 80 85
GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
90 95 100
TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
105 110 115
CAG CCC 411
Gln Pro

配列番号：６９
配列の長さ：４１１
配列の型：核酸
鎖の数：二本鎖
トポロジー：直鎖状
配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ
配列：
ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45
Met Ala Trp Thr Pro Leu Phe Phe Phe Val Leu His Cys Ser
-15 -10 -5
GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90
Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser
1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135
Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser
15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180
Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu
30 35 40

AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225
Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His
45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270
Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser
60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315
Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp
75 80 85

GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360
Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln
90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405
Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
105 110 115

CAG CCC 411
Gln Pro

配列番号：７０

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍRNA

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

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

-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser

1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

30 35 40

AAG GGC CCT AGG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225

Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His

45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270

Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315

Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp

75 80 85

GAG GCT GAC TAT TAC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360

Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln

90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105 110 115

CAG CCC 411

Gln Pro

配列番号：７１

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

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

-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser

1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

30 35 40

AAG GGC CCT AAG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225

Lys Gly Pro Lys Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His

45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270

Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315

Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp

75 80 85

GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360

Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln

90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105 110 115

CAG CCC 411

Gln Pro

配列番号：７２

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

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

-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser

1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

30 35 40

AAG GGC CCT AGG TAC CTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225

Lys Gly Pro Arg Tyr Leu Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His

45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270

Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315

Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp

75 80 85

GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360

Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln

90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105 110 115

CAG CCC 411

Gln Pro

配列番号：７３

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

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

-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser

1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

30 35 40

AAG GGC CCT AAG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225

Lys Gly Pro Lys Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His

45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270

Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315

Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp

75 80 85

GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360

Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln

90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105 110 115

CAG CCC 411

Gln Pro

配列番号：７４

配列の長さ：４１１

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ｃDNA ｔｏ ｍＲＮＡ

配列：

ATG GCC TGG ACT CCT CTC TTC TTC TTT GTT CTT CAT TGC TCA 45

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

-15 -10 -5

GGT TCT TTC TCC CAG CTT GTG CTG ACT CAA TCG CCC TCT GCC TCT 90

Gly Ser Phe Ser Gln Leu Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ala Ser

1 5 10

GCC TCC CTG GGA GCC TCG GTC AAG CTC ACC TGC ACC TTG AGT AGT 135

Ala Ser Leu Gly Ala Ser Val Lys Leu Thr Cys Thr Leu Ser Ser

15 20 25

CAG CAC AGT ACG TAC ACC ATT GAA TGG TAT CAG CAG CAG CCA GAG 180

Gln His Ser Thr Tyr Thr Ile Glu Trp Tyr Gln Gln Gln Pro Glu

30 35 40

AAG GGC CCT AGG TAC GTG ATG GAT CTT AAG CAA GAT GGA AGC CAC 225

Lys Gly Pro Arg Tyr Val Met Asp Leu Lys Gln Asp Gly Ser His

45 50 55

AGC ACA GGT GAT GGG ATT CCT GAT CGC TTC TCA GGC TCC AGC TCT 270

Ser Thr Gly Asp Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ser Ser

60 65 70

GGG GCT GAG CGC TAC CTC ACC ATC TCC AGC CTC CAG TCT GAG GAT 315

Gly Ala Glu Arg Tyr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp

75 80 85

GAG GCT GAC TAT ATC TGT GGT GTG GGT GAT ACA ATT AAG GAA CAA 360

Glu Ala Asp Tyr Ile Cys Gly Val Gly Asp Thr Ile Lys Glu Gln

90 95 100

TTT GTG TAC GTG TTC GGC GGA GGG ACC AAA CTG ACC GTC CTA GGC 405

Phe Val Tyr Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly

105 110 115

CAG CCC 411

Gln Pro

配列番号：７５

配列の長さ：３４

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

配列：

Ala Val Ser Glu His Gln Leu Leu His Asp Lys Gly Lys Ser Ile

1 5 10 15

Gln Asp Leu Arg Arg Arg Phe Phe Leu His His Leu Ile Ala Glu

20 25 30

Ile His Thr Ala

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悪液質治療剤。

2．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記載の悪液質治療剤。

3．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記載の悪液質治療剤。

4．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請求項1記載の悪液質治療剤。

5．抗体がヒト型化又はキメラ化されたものである請求項3又は4記載の悪液質治療剤。

6．ヒト型化抗体がヒト型化#23-57-137-1抗体である請求項5記載の悪液質治療剤。

7．抗体がモノクローナル抗体である請求項3又は4記載の悪液質治療剤。

8．悪液質が癌由来のものである請求項1～7のいずれか1項に記載の悪液質治療剤。