

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2009/116491

発行日 平成23年7月21日(2011.7.21)

(43) 国際公開日 平成21年9月24日(2009.9.24)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考)
C07K 16/24 (2006.01)	C07K 16/24	4B064
C12P 21/08 (2006.01)	C12P 21/08	4B065
C07K 1/22 (2006.01)	C07K 1/22	4C085
C12N 5/10 (2006.01)	C12N 5/00 1O2	4H045
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 N	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 36 頁) 最終頁に続く

出願番号	特願2010-503863 (P2010-503863)	(71) 出願人	000155908 株式会社林原生物化学研究所 岡山県岡山市北区下石井1丁目2番3号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2009/055039	(72) 発明者	牛尾 知恵 日本国岡山県岡山市北区下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内
(22) 国際出願日	平成21年3月16日(2009.3.16)	(72) 発明者	有安 晴美 日本国岡山県岡山市北区下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内
(31) 優先権主張番号	特願2008-72729 (P2008-72729)	(72) 発明者	栢野 徹 日本国岡山県岡山市北区下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内
(32) 優先日	平成20年3月21日(2008.3.21)	(72) 発明者	有安 利夫 日本国岡山県岡山市北区下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2008-149916 (P2008-149916)		
(32) 優先日	平成20年6月6日(2008.6.6)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒトインターフェロン α サブタイプ α 8及びその変異蛋白質を特異的に認識するモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、インターフェロン α サブタイプ α 8（以下、IFN α 8）及びその変異蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を提供すること、該抗体を産生し得るハイブリドーマを提供すること、該抗体によるIFN α 8及びその変異蛋白質の検出方法を提供すること、該抗体によるIFN α 8及びその変異蛋白質の精製方法を提供すること、該抗体を有効成分とするIFN α 8が発症や増悪に関与する各種疾患の治療剤を提供することを課題とする。

IFN α 8及びその変異蛋白質に特異的なモノクローナル抗体、該抗体を産生し得るハイブリドーマ、該抗体を使用した免疫反応によるIFN α 8及びその変異蛋白質の検出方法、該抗体を使用したIFN α 8或いはその変異蛋白質の精製方法、並びに該抗体を有効成分とするIFN α 8が発症や増悪に関与する各種疾患の治療剤を提供することで解決する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗ヒトインターフェロン（IFN） α モノクローナル抗体であって、ヒトIFN α サブタイプ α 8（IFN α 8）及びその変異蛋白質との結合能を有し、ヒトIFN α サブタイプ α 1、 α 2、 α 5、 α 6、 α 10、コンセンサスIFN、ヒトIFN β 、ヒトIFN γ 、マウスIFN α/β 、ラットIFN α 及びヒト腫瘍壊死因子（TNF α ）と実質的に結合しない単離されたモノクローナル抗体。

【請求項2】

ヒトIFN α 8及びその変異蛋白質の定量に使用する請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

10

【請求項3】

ヒトIFN α 8及びその変異蛋白質の精製に使用する請求の範囲第1項記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

ヒトIFN α 8の変異蛋白質が、ヒトIFN α サブタイプ α 8bのアミノ酸配列のアミノ末端のシステイン残基から145番目のアルギニン残基をイソロイシン残基又はロイシン残基に、146番目のアラニン残基をセリン残基に、149番目のメチオニン残基をチロシン残基に置換したアミノ酸配列を有する請求の範囲第1項乃至第3項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項5】

20

重鎖可変領域に配列表における配列番号21、22、23、27、28及び29で示されるアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含む請求の範囲第1項乃至第4項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項6】

軽鎖可変領域に配列表における配列番号24、25、26、30、31又は32で示されるアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含む請求の範囲第1項乃至第5項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項7】

重鎖可変領域に配列表における配列番号9、10、18及び19で示されるアミノ酸配列のいずれかのアミノ酸配列を含む請求の範囲第1項乃至第6項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

30

【請求項8】

軽鎖可変領域に配列表における配列番号11又は20で示されるアミノ酸配列を含む請求の範囲第1項乃至第7項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項9】

ハイブリドーマmAb-IFN α 8#139（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11081）又はmAb-IFN α 8Y36-2（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11082）が産生するモノクローナル抗体か、該モノクローナル抗体の抗原結合部位と相同の結合部位を有する請求の範囲第1項乃至第8項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

40

【請求項10】

ヒトIFN α 8及びその変異蛋白質の抗ウイルス活性に対する中和能を有する請求の範囲第1項乃至第9項のいずれかに記載のモノクローナル抗体。

【請求項11】

ヒトIFN α 8及びその変異蛋白質に特異的な定量方法であって、請求の範囲第1項乃至第10項のいずれかに記載のモノクローナル抗体から選ばれるいずれか1種又は2種を用いる定量方法。

【請求項12】

ヒトIFN α 8及びその変異蛋白質に特異的な精製方法であって、請求の範囲第1項乃至

50

至第10項のいずれかに記載のモノクローナル抗体から選ばれるいずれかを担体に固定化した抗体カラムを使用する工程を含む精製方法。

【請求項13】

請求の範囲第1項乃至第10項のいずれかに記載のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項14】

請求の範囲第1項乃至第10項のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその抗原認識部位を有する断片を含む医薬組成物又は臨床診断薬。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本発明はヒトインターフェロン α （以下、インターフェロンを「IFN」と略記する場合がある。）に対する新規なモノクローナル抗体に関するものであり、詳細には、ヒトIFN α サブタイプ $\alpha 8$ （以下、ヒトIFN α サブタイプ $\alpha 8$ を「IFN $\alpha 8$ 」と略記する。）及びその変異蛋白質に特異的なモノクローナル抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

IFNは、ウイルスに感染した細胞が産生するウイルス増殖抑制因子として発見された。現在、IFNには、受容体の異なる α/β 、 γ 、 λ の3タイプが知られており、ヒトIFN α には、少なくとも13種類以上のサブタイプの存在が知られている。ヒトIFN α は、大腸菌で生産した組換え型製剤や、末梢血白血球や培養株化されたリンパ芽球様細胞をセンダイウイルス（HVJ）などで刺激して誘発した天然型製剤が、腎癌などの悪性新生物や、B型及びC型肝炎の治療剤として広く臨床応用されている。また、IFNの免疫調節作用、アレルギー疾患、糖尿病などの自己免疫疾患や、ウイルス感染に起因する疾患への関与も研究されており、生体内での動態にも関心が持たれている。IFNの活性測定には、培養細胞を使用した抗ウイルス活性に基づくバイオアッセイが用いられている。バイオアッセイは、IFNの生理活性を最もよく反映するものの、測定に時間がかかることに加えて、アッセイに使用する細胞の生理機能に影響する因子の影響を受けやすいことなどが知られている。また、白血球やリンパ芽球をウイルス等で刺激すると複数のタイプやサブタイプを含む天然型のIFNが産生される（例えば、ヤナイワイ、（Yanai Y.）等、『ジャーナル オブ インターフェロン アンド サイトカイン リサーチ（Journal of Interferon & Cytokine Research）』、第21巻、第10号、第835乃至841頁（2001年）を参照）ため、これらの各々サブタイプの活性を直接測定することやその機能を解析することは極めて困難であった。

20

30

【0003】

ヒトIFN α の定量や精製のために、数多くの抗ヒトIFN α モノクローナル抗体が調製されている（例えば、特公平6-11235号公報、特表2004-533217号公報、特開2007-63177号公報を参照）。また、ヒトIFN α サブタイプ $\alpha 4$ （以下、ヒトIFN α サブタイプ $\alpha 4$ を「IFN $\alpha 4$ 」と略記する。）に特異的に結合するモノクローナル抗体（『モレキュラー イムノロジー（Molecular Immunology）』、第29巻、第3号、第391-399頁（1992年）を参照）が調製されており、マウス由来のモノクローナル抗体を利用したヒトIFN α を特異的に定量できるキットも販売されている（例えば、株式会社JIMRO販売、商品名「ヒトIFN α 測定キット」）ものの、IFN α サブタイプを特異的に識別することはできない。

40

【0004】

一方、IFN $\alpha 8$ には、3種類の分子種の存在が知られており、各々IFN $\alpha 8 a$ 、IFN $\alpha 8 b$ 、及び、IFN $\alpha 8 c$ と呼ばれている（例えば、国際公開第WO 2006/051805号パンフレットを参照）。IFN $\alpha 8$ は、ヒトIFN α サブタイプ $\alpha 2 a$ や

50

ヒトIFN α サブタイプ α 2bなどの既存の医薬成分よりも優れた生理活性を有することから、IFN α 8やその変異蛋白質を有効成分とする感受性疾患治療剤が提案されている（例えば、国際公開第WO 2006/051805号パンフレット及び特表平9-509955号公報を参照）。また、ヒトIFN α のサブタイプによっては、他のサブタイプのコアゴニスト（増強剤）として作用する可能性も指摘されている（特表平9-509955号公報）し、比活性の異なるIFN α 8変異蛋白質も存在する（国際公開第WO 2006/051805号パンフレット）ので、これらのヒトIFN α サブタイプやその変異蛋白質の生理的な機能を研究したり、医薬用の製剤として開発する上で、その生理活性や血中動態を調べて比較するような場合、バイオアッセイのように他の生理学的な因子の影響を受けることなく、その蛋白質量が特異的に、且つ、正確に、高感度で定量できるアッセイ系が必要とされている。また、モノクローナル抗体は特定の抗原決定基（エピトープ）を認識できるものの、その特異性や親和性には差があるため、IFN α 8特異的で、且つ、高感度のアッセイ系の構築には、それに適したモノクローナル抗体を開発する必要がある。また、IFN α 8或いはその変異蛋白質を、医薬用途に使用するためには、該IFN α 8やその変異蛋白質を特異的に、且つ、大量に精製する必要があるので、IFN α 8やその変異蛋白質以外のIFNやこれら以外の蛋白質の非特異的吸着が少なく、且つ、該モノクローナル抗体を用いて調製した抗体カラムからのIFN α 8或いはその変異蛋白質の溶出が容易な抗体カラムの調製に適したモノクローナル抗体を開発する必要がある。

10

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

20

【0005】

本発明は、IFN α 8及びその変異蛋白質に特異的なモノクローナル抗体を提供することを第一の課題とする。

【0006】

本発明は、斯かるモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマを提供することを第二の課題とする。

【0007】

本発明は、斯かるモノクローナル抗体によるIFN α 8及びその変異蛋白質の検出方法を提供することを第三の課題とする。

【0008】

本発明は、斯かるモノクローナル抗体によるIFN α 8及びその変異蛋白質の精製方法を提供することを第四の課題とする。

30

【0009】

本発明は、斯かるモノクローナル抗体を有効成分とする、各種ウイルス性疾患、自己免疫疾患、糖尿病、乾癬、慢性関節リュウマチ、多発性硬化症、ベーチェット病、再生不良貧血、腎炎、全身性エリスマトーデス及び／又は後天性を含む免疫不全症の治療剤を提供することを第五の課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、前記課題を解決するために、IFN α 8及びその変異蛋白質を特異的に認識する新規モノクローナル抗体について鋭意研究を行い、本発明を完成するに至った。

40

【0011】

すなわち、本発明の要旨とするところは、IFN α 8及びその変異蛋白質を特異的に認識する新規モノクローナル抗体を提供することにある。

【0012】

本発明の他の態様によれば、IFN α 8及びその変異蛋白質を特異的に検出する方法が提供される。

【0013】

また、本発明の他の態様によれば、夾雑物を含む被験試料からIFN α 8及びその変異蛋白質を特異的に精製する方法が提供される。

50

【0014】

また、本発明の他の態様によれば、IFN α 8が関与する、アレルギー症、免疫不全症或いは自己免疫疾患など各種疾患の治療剤が提供される。

【発明の効果】

【0015】

本発明のモノクローナル抗体は、IFN α 8及びその変異蛋白質に特異的に結合し、これ以外のIFNのタイプやサブタイプには実質的に結合しない。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、被験試料中のIFN α 8及びその変異蛋白質のみと免疫反応を呈するので、被験試料中のIFN α 8及びその変異蛋白質を、特異的に、且つ、定性的又は定量的に検出することができるという利点を有する。また、IFN α 8及びその変異蛋白質と夾雑物質とを含む混合物から、IFN α 8及びその変異蛋白質を高純度、且つ、効率的に採取することができるという利点を有する。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】IFN類を、各々の蛋白質量が10ng/レーンとなるようにチャージしてSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行い、ゲルに含まれるIFN類をニトロセルロース膜に移して、本発明のモノクローナル抗体(α 8#139mAb)を反応させたウエスタンブロッティングの一例を示す説明図である。

【図2】本発明のモノクローナル抗体 α 8#139mAbを固相抗体とし、 α 8Y36-2mAbを標識抗体として使用した、サンドイッチ法によるエンザイムイムノアッセイにより求めたrIFN α 8の検量線の一例を示す説明図である。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明でいうIFN α 8とは、例えば国際公開第WO 2006/051805号パンフレットに記載されたIFN α 8のアミノ酸配列を有する既知のポリペプチドをいい、アミノ末端(以下、「N末端」という。)がシステインではじまる165又は166個のアミノ酸で構成されたアミノ酸配列を有する3種類のポリペプチドをいう。当該ポリペプチドはIFN α 8a、IFN α 8b、及び、IFN α 8cと呼ばれる場合があり(例えば、国際公開第WO 2006/051805号パンフレット参照)、本明細書ではこれらを総称してIFN α 8という場合がある。当該ポリペプチドの出所、由来は問わず、天然型であっても組換型であってもよいし、化学的に合成したものであってもよい。

30

【0018】

本発明でいうIFN α 8の変異蛋白質とは、IFN α 8のアミノ酸配列を有するポリペプチドを構成する1個又は2個以上数個以下のアミノ酸を、他のアミノ酸に置換したポリペプチドをいい、少なくとも後述の、ハイブリドーマmAb-IFN α 8#139(独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11081、以下「 α 8#139」と略記する。)及びmAb-IFN α 8Y36-2(独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11082、以下「 α 8Y36-2」と略記する。)が産生するモノクローナル抗体により認識される抗原決定部位を有するポリペプチドであって、IFN α 8のアミノ酸配列におけるN末端及び/又はカルボキシ末端(以下、「C末端」という。)にアミノ酸が1個又は2個以上数個以下付加したもの、及び、そのポリペプチド内、そのN末端及び/又はC末端のアミノ酸が1個又は2個以上数個以下欠失したものを含む。具体的には、本出願人が国際公開第WO 2006/051805号パンフレットにおいて開示した、IFN α 8のアミノ酸配列のN末端から145番目のアルギニン残基をロイシン残基、イソロイシン残基又はバリン残基に、146番目のアラニン残基をアスパラギン残基又はセリン残基に、或いは、149番目のメチオニン残基をチロシン残基に置換したポリペプチドや、これらペプチドのアミノ酸配列のN末端から31番目及び134番目のリジン残基のいずれかを保持し、他のリジン残基の全てが他のアミノ酸残基に変換されたものなどを例示することができる。

40

50

【0019】

本発明でいうモノクローナル抗体とは、前述のIFN α 8及びその変異蛋白質に特異的なモノクローナル抗体全般を包含するものとし、その出所・由来、クラス、イソタイプなどは問わない。

【0020】

本発明のモノクローナル抗体は、IFN α 8又はその変異蛋白質或いはこれらの抗原性フラグメントを抗原として用いることにより得ることができる。具体的には、例えば、斯かる抗原で免疫感作しておいた哺乳動物より採取した抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳動物由来の細胞とのハイブリドーマを作製し、これより本発明のモノクローナル抗体を産生し得るハイブリドーマのクローンを選択し、これを生体内外で培養することにより得ることができる。

10

【0021】

抗原となり得るIFN α 8及びその変異蛋白質は、その由来や製法に制限はなく、例えば、BALL-1細胞などのリンパ芽球様細胞にHVJなどのウイルスを加えることにより誘導されるIFN α 8であってもよく、遺伝子組換技術や化学的合成法により調製されるIFN α 8或いはその変異蛋白質であってもよい。具体的には、例えば、ヤナイワイ。(Yanai Y.)等、『ジャーナル オブ インターフェロン アンド サイトカイン リサーチ (Journal of Interferon & Cytokine Research)』、第21巻、第10号、第835乃至841頁(2001年)に記載された方法により、BALL-1細胞由来のIFN α 8を調製してもよく、国際公開第WO 2006/051805号パンフレットに記載された方法により、IFN α 8又はその変異蛋白質を調製することもできる。それらは、通常、完全精製又は部分精製した状態で使用される。抗原性フラグメントを得るには、これら完全精製品又は部分精製品を化学的又は酵素的に分解するか、国際公開第WO 2006/051805号パンフレットなどに開示されたIFN α 8a、IFN α 8b或いはIFN α 8cのアミノ酸配列に基づき目的とするペプチドを合成すればよい。

20

【0022】

免疫感作は常法によればよく、例えば、上記のIFN α 8、その変異蛋白質或いはこれらのフラグメントを単独又は適宜アジュバントとともに哺乳動物の静脈、皮内、皮下又は腹腔内に投与して、一定期間飼育する。哺乳動物に特に限定はなく、所期の抗体産生細胞が得られるかぎり、種類、大きさ、雌雄は問わない。通常はラット、マウス、ハムスターなどのげっ歯類が用いられ、後述の無限増殖可能な哺乳動物由来の細胞との適合性も勘案しながら、最適のものが選択される。哺乳動物の種類や大きさにも依るが、抗原の接種量は、通常、総接種量を約5乃至500 μ g/匹とし、これを約1乃至2週間の間隔を置いて2乃至5回に分けて接種する。そして、最終接種から3乃至5日後に脾臓を摘出し、分散して抗体産生細胞としての脾細胞を得る。

30

【0023】

つぎに、新しくして得られた抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳動物由来の細胞とを融合させて、目的のハイブリドーマを含む融合細胞を得る。無限増殖可能な哺乳動物由来の細胞には、通常、P3-NS1-Ag4-1細胞(ATCC TIB18)、P3-X63-Ag8細胞(ATCC TIB9)及びSP2/O-Ag14細胞(ATCC CRL1581)、Y3Ag1.2.3(ATCC CRL1631)などのマウスやラットの骨髓腫由来細胞株、又はこれらの変異株が用いられる。細胞融合は、例えば、ポリエチレングリコールやセンダイウイルスを始めとする融合促進剤や電気パルスによる方法が用いられ、一例を挙げると、融合促進剤を含む融合培地に抗体産生細胞と無限増殖可能な哺乳動物由来の細胞を約1:1乃至1:10の割合で浮遊させ、この状態のまま、約30乃至40 $^{\circ}$ Cで約1乃至5分間インキュベートする。融合培地には、例えば、MEM培地、RPMI1640培地及びイスコフ改変ダルベコ培地を始めとする通常一般のものをを用いればよく、ウシ血清などの血清類は除いておくのが望ましい。

40

【0024】

50

目的のハイブリドーマを選択するには、まず、上記のようにして得た融合細胞をHAT培地などの選択用培地に移し、約30乃至40℃で約3日乃至3週間培養してハイブリドーマ以外の細胞を死滅させる。次に、ハイブリドーマを常法により培養し、培養物中に分泌された抗体につき、IFN α 8及びその変異蛋白質との反応性を試験する。試験には、エンザイムイムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ及びバイオアッセイなどの抗体を検出するための慣用の方法が用いられ、例えば、富山朔二・安東民衛編『単クローン抗体実験マニュアル』、講談社サイエンティフィック発行、第105乃至152頁(1991年)にはそのための方法が種々詳述されている。IFN α 8及びその変異蛋白質に特異的な抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法などにより、直ちにクローニングされ、単クローン化された本発明によるハイブリドーマを得る。

10

【0025】

本発明のモノクローナル抗体は、斯かるハイブリドーマを生体内外で培養することにより得ることができる。培養には、哺乳動物由来の細胞を培養するための慣用の方法が用いられ、例えば、生体外の培養培地で培養するときには、その培養物から、一方、ヒト以外の温血動物に移植し、生体内で培養するときには、その腹水及び/又は血液からモノクローナル抗体を採取する。後述の α 8#139(独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11081)及び α 8Y36-2(独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11082)の産生するモノクローナル抗IFN α 8抗体は、これらの抗体をIFN α 8及びその変異蛋白質の検出に使用したとき、非特異的反応が低く、微量のIFN α 8を特異的に、かつ

20

【0026】

また、本発明のモノクローナル抗体は、例えば、配列表における配列番号3又は4と、5で示される塩基配列を含む重鎖及び軽鎖可変領域をコードするDNA、或いは、配列番号12又は13と、14で示される塩基配列を有する重鎖及び軽鎖可変領域をコードするDNAを各々、重鎖および軽鎖の定常領域をコードする既知のDNA(例えば、特開2007-252372号公報参照)とそれぞれ連結した遺伝子を、PCR法、または、化学合成により合成し、定法により、その遺伝子の発現を可能とする公知の発現ベクター(p cDNA3.1(Invitrogen社販売)等に組み込んで形質転換体を調製し、チャイニーズハイスター卵巣細胞(CHO細胞)や大腸菌等の宿主中で発現させることによって抗体を産生し、これらの培養液から、Protein Aカラム等を用いて抗体を精製することによって得ることができる。

30

【0027】

これらの方法で産生された抗体は、後述する目的で、抗体全体をそのまま使用してもよく、IFN α 8及びその変異蛋白質に結合能を有する限り、当該抗体の抗原認識部位を含むFv、scFv、Fab、F(ab')、Fab'などの断片として使用することも有利に実施できる。

40

【0028】

本発明のモノクローナル抗体は、IFN α 8及び/又はその変異蛋白質の検出を必要とする諸分野に広範な用途を有する。すなわち、本発明のモノクローナル抗体にラジオイムノアッセイ、エンザイムイムノアッセイ、蛍光イムノアッセイなどの標識イムノアッセイを適用するときには、被験試料中のIFN α 8及び/又はその変異蛋白質を、特異的に、迅速且つ正確に定性又は定量分析することができる。斯かる分析において、本発明のモノ

50

クローナル抗体は、例えば、放射性物質、酵素及び／又は蛍光物質により標識して用いられる。本発明のモノクローナル抗体は、IFN α 8及びその変異蛋白質に特異的に反応するので、その免疫反応を、これら標識物質を指標に測定すれば、被験試料中のごく微量のIFN α 8及びその変異蛋白質を精度よく検出することができる。標識免疫アッセイは、バイオアッセイと比較して、一度に数多くの被験試料を分析できるうえに、分析に要する時間と労力が少なく済み、しかも、分析が高精度であるという特徴がある。したがって、本発明による検出方法は、IFN α 8及び／又はその変異蛋白質を製造する際の工程管理や製品の品質管理、さらにはIFN α 8が関与する疾患の臨床診断などにきわめて有用である。なお、本発明はモノクローナル抗体の標識や標識アッセイそのものに係わるものではないので詳細な説明は省くが、例えば、ピー・ティッセン著、石川栄治訳『エンザイム免疫アッセイ』、1989年、東京化学同人発行、第196乃至348頁などにはそのための方法が種々詳述されている。また、本発明のモノクローナル抗体は、IFN α 8及びその変異蛋白質を特異的に認識する抗体なので、これらのモノクローナル抗体を、酵素抗体法の固相抗体及び／又は標識抗体として使用することにより、IFN α 8及びその変異蛋白質を特異的に検出することができる。なかでも、本発明のモノクローナル抗体をサンドイッチ法による酵素抗体法において、固相抗体及び標識抗体として使用して、IFN α 8及びその変異蛋白質の検出に適用したときには、当該蛋白質を50乃至2,000 pg/mlの範囲で検出可能であり、且つ、IFN α 8以外の他のヒトIFN α サブタイプを実質的に検出しない、高感度のアッセイ系を構築することができる。この目的、とりわけ、サンドイッチ法による高感度の酵素抗体法に適したモノクローナル抗体として、例えば、後述する α 8#139（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11081）及び α 8Y36-2（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11082）のハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体を例示することができる。この2種類のモノクローナル抗体を固相抗体及び標識抗体として使用する場合には、IFN α 8以外のヒトIFN α サブタイプを、その濃度が2,000 pg/mlでも検出することはなく、かつ、非特異的な吸着による反応も殆ど認められないので、IFN α 8及びその変異蛋白質を高感度で、且つ、正確に測定することができる。

【0029】

また、本発明のモノクローナル抗体は、免疫アフィニティークロマトグラフィーによるIFN α 8及びその変異蛋白質の精製にもきわめて有用である。斯かる精製方法は、本発明のモノクローナル抗体を当該IFN α 8及びその変異蛋白質と当該蛋白質以外の夾雑蛋白質を始めとする夾雑物質との混合物に接触させてモノクローナル抗体に当該蛋白質のみを吸着させる工程と、吸着した蛋白質をモノクローナル抗体から脱着させる工程を含んでなり、両工程は、通常、水性媒体中で行なわれる。本発明のモノクローナル抗体は、通常、ゲル状の水不溶性担体に結合した状態で用いられ、その水不溶性担体を円筒管などにカラム状に充填し、これに、例えば、リンパ芽球様細胞株BALL-1をHVJで刺激して製造したIFN α を含む培養上清、IFN α 8或いはその変異蛋白質の産生能をもつ形質転換体の培養液又はそれらの部分精製品を通液すると、実質的に当該蛋白質のみが水不溶性担体上のモノクローナル抗体に吸着する。吸着した蛋白質は、モノクローナル抗体周囲の水素イオン濃度を変えることにより、容易に脱着させることができ、例えば、IgGのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合は酸性側のpH、通常、pH2乃至3で、一方、IgMのクラスに属するモノクローナル抗体を用いる場合はアルカリ側のpH、通常、pH10乃至11で溶出させることができる。この目的に適したモノクローナル抗体として、例えば、上記 α 8#139及び α 8Y36-2の産生するモノクローナル抗体を例示することができる。

【0030】

さらに、本発明のモノクローナル抗体は、上記のごとき組換技術等を利用して、CHO細胞や大腸菌で発現させて、キメラ抗体、ヒト化抗体やヒト抗体を調製して、さらには、これらの抗体の抗原認識部位を有するFv、短鎖抗体(scFv)、Fab、F(ab')

10

20

30

40

50

）、Fab'断片、ダイアボディ (diabodies) 及びミニボディ (minibodies) などの断片を調製して、IFN α 8が、発症や増悪に關与している各種ウイルス性疾患、アレルギー症、アトピー症、自己免疫疾患、糖尿病、乾癬、慢性関節リュウマチ、多発性硬化症、ベーチェット病、再生不良貧血、腎炎、全身性エリスマトーデス及び／又は後天性を含む免疫不全症等の各種疾患の治療剤の有効成分としても有利に使用できる。この治療剤の有効成分として使用可能なモノクローナル抗体として、具体的には、上記のハイブリドーマ α 8#139及び α 8Y36-2の産生するモノクローナル抗体を例示することができ、とりわけ、IFN α 8活性を中和することのできる α 8#139の産生する抗体が望ましい。また、後述するハイブリドーマ α 8#S56-1の産生する抗体も、IFN α 8活性を中和することができるので有利に利用できる。この場合、モノクローナル抗体単独の製剤とすることもできるが、通常、製剤学的に許容される添加剤を1種又は2種以上を加えた製剤の形態が望ましく、当該疾患の治療に使用される他の有効成分をさらに配合することも随意である。これらの製剤は通常、皮内、皮下、筋肉内、静脈内、腹腔内などに投与すればよく、その際の投与量は、対象とする疾患に対して治療効果を發揮する量を適宜選択すればよく、通常は、成人1日当たり、本発明のモノクローナル抗体を、0.001mg乃至2,000mg、望ましくは0.01乃至1,000mg、より望ましくは、0.1mg乃至1,000mgを、1回乃至複数回に分けて投与すればよい。

10

【0031】

前記、イムノアッセイ、IFN α 8又はその変異蛋白精製やIFN α 8が発症や増悪に關与する疾患治療剤として好ましい本発明のモノクローナル抗体についてより具体的に説明すると、本発明の所期の目的を達成できるモノクローナル抗体であれば、その由来やアミノ酸配列は問わず、とりわけ、 α 8#139及び α 8Y36-2のハイブリドーマが産生する抗体が望ましい。そのアミノ酸配列についていえば、重鎖可変領域に配列表における配列番号21乃至23で示されるアミノ酸配列の1種以上を含み、及び／又は、軽鎖可変領域に配列番号24乃至26で示されるアミノ酸配列の1種以上を含む抗体、或いは、重鎖可変領域に配列表における配列番号27乃至29で示されるアミノ酸配列の1種以上を含み、及び／又は、軽鎖可変領域に配列番号30乃至32で示されるアミノ酸配列の1種以上を含む抗体が望ましい。さらには、重鎖可変領域に配列表における配列番号21乃至23で示される全てのアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域に配列番号24乃至26で示される全てのアミノ酸配列を含む抗体、又は、重鎖可変領域に配列表における配列番号27乃至29で示される全てのアミノ酸配列を含み軽鎖可変領域に配列番号30乃至32で示される全てのアミノ酸配列を含む抗体がより望ましく、重鎖可変領域に配列表における配列番号9又は10で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域に配列表における配列番号11で示されるアミノ酸配列を含む抗体、又は、重鎖可変領域に配列表における配列番号18又は19で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域に配列表における配列番号20で示されるアミノ酸配列を含む抗体がさらに望ましい。特に、重鎖可変領域に配列表における配列番号9又は10で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域に配列表における配列番号11で示されるアミノ酸配列を含む抗体は、IFN α 8に対する中和活性を有することから、活性との相関が高いので望ましい。

20

30

40

【0032】

これらの抗体は、そのまま、その部分配列を利用して、或いは、それらのアミノ酸の1乃至100個程度を、欠失、付加、置換するなどにして組み換え体を調製し、ヒトIFN α 8及びその変異蛋白を特異的に認識する、IFN α 8の定量・定性、IFN α 8精製、さらには、IFN α 8の關与する疾患治療、臨床診断などの各々の用途に適したキメラ抗体、ヒト化抗体、或いは、ヒト抗体を、公知の方法 (例えば、特開2004-533217号公報や特開2007-252372号公報) により調製することも有利に実施できる。通常、アミノ酸の欠失、付加、置換は、数個の範囲が望ましく、1乃至5個が望ましく、1乃至3個が望ましく、1又は2個が特に望ましい。このような、欠失、付加置換は、抗体の特異性を規定する超可変部位に導入してもよいが、通常は、それ以外の部位が望ま

50

しい。

【0033】

以下、実施例に基づき本発明を説明するが、本発明は、これら実施例のみに限定されるものではない。なお、以下の実施例で使用したIFN α 8を含む組換え型（以下、組換え型を「r」と略記する場合がある）のヒトIFN α サブタイプ及びIFN α 8の変異蛋白質は、いずれも、株式会社林原生物化学研究所で、大腸菌を用いて調製したものを使用し（ヤナイワイ、(Yanai Y.)等、『ジャーナル オブ インターフェロン アンド サイトカイン リサーチ (Journal of Interferon & Cytokine Research)』、第21巻、第10号、第835乃至841頁（2001年）及び国際公開第WO 2006/051805号パンフレットを参照）。rIFN α 8はIFN α 8bのアミノ酸配列を有するペプチドを使用した（国際公開第WO 2006/051805号パンフレットを参照）。また、天然型（以下、天然型を「n」と略記する場合がある。）のヒトIFN α サブタイプ α 2b（以下、「IFN α 2」と略記する。）、nIFN α 8、マウスIFN α/β 及びラットIFN α は、株式会社林原生物化学研究所で調製したものを使用した（ヤナイワイ、(Yanai Y.)等、『ジャーナル オブ インターフェロン アンド サイトカイン リサーチ (Journal of Interferon & Cytokine Research)』、第21巻、第10号、第835乃至841頁（2001年）を参照）。ヒトIFN β （以下、ヒトIFN β を「IFN β 」と略記する。）、コンセンサスIFN（以下、「Con IFN」と略記する場合がある。）は、各々、持田製薬株式会社及びアステラス製薬株式会社販売の製品をそれぞれ購入して使用した。ヒトIFN γ （以下、ヒトIFN γ を「IFN γ 」と略記する。）及びヒト腫瘍壊死因子（ヒトTNF α 、以下、ヒトTNF α を「TNF α 」と略記する。）はコスモバイオ株式会社の製品を購入して使用した。

【0034】

また、以下の実施例で使用したIFN類及びサイトカイン（表5に示す比活性は、安定化等の目的で添加した蛋白質成分を含まない）は、後述の表5にまとめて示す。なお、以下、ヒトIFN α のサブタイプ α 1、 α 5、 α 6及び α 10を、各々IFN α 1、IFN α 5、IFN α 6及びIFN α 10と略記する。また、以下の実施例では、IFN α 8の変異体として、ヤナイワイ、(Yanai Y.)等、『ジャーナル オブ インターフェロン アンド サイトカイン リサーチ (Journal of Interferon & Cytokine Research)』、第21巻、第10号、第835乃至841頁（2001年）の実験1-1乃至1-3において開示した変異体No. 2及びNo. 3、すなわち、166のアミノ酸残基からなるIFN α 8bのアミノ酸配列のN末端のシステイン残基から145番目のアルギニン残基をイソロイシン残基に、146番目のアラニン残基をセリン残基に、149番目のメチオニン残基をチロシン残基に置換したIFN α 8の変異蛋白質（以下、「IFN α 8-MUT2」と略記する。）、及び、IFN α 8bのアミノ酸配列のN末端のシステイン残基から145番目のアルギニン残基をロイシン残基に、146番目のアラニン残基をセリン残基に、149番目のメチオニン残基をチロシン残基に置換したIFN α 8の変異蛋白質（以下、「IFN α 8-MUT3」と略記する。）を使用した。

【実施例1】

【0035】

<マウス抗IFN α 8抗体産生ハイブリドーマの調製>

<抗原>

抗原として、国際公開第WO 2006/051805号パンフレットに記載された方法により調製したIFN α 8bのアミノ酸配列を有するrIFN α 8（大腸菌由来、蛋白質濃度510 μ g/ml、1.27 \times 10⁸ IU/ml）を使用した。なお、IFNの力価（国際単位：IU）は、FL細胞のシンドビスウイルスによる細胞変性の抑制作用を指標とするバイオアッセイで測定した。測定には、国際標準品（Ga23-901-532）を使用して検定した自社標準品（株式会社林原生物化学研究所調製）を使用した。

<免疫方法>

抗原 ($10 \mu\text{g}/\text{匹}$) とフロイントのコンプリートアジュバント (株式会社ディフコ (DIFCO) 販売) とを混合して、エマルジョンを作成し、マウス (BALB/c、9週齢、メス、株式会社日本チャールスリバー販売) に、腹腔内に免疫した。2回目以降はフロイントのインコンプリートアジュバント (株式会社ディフコ (DIFCO) 販売) に変更して、腹腔内に2週間隔で計3回免疫した。

<細胞融合>

最後の免疫後、7日目に尾静脈より部分採血し抗体価を確認した。抗体価の上昇が認められた個体について、細胞融合を行う3日前に、最終免疫として、アジュバントを含まない抗原 $10 \mu\text{g}$ を静脈内に投与 (以下、「静注」という。) した。この静注を行って3日目のマウスの脾臓を、常法により採取し、分散して脾細胞を得た。この脾細胞と親株であるマウス SP2/O-Ag14細胞 (ATCC CRL1581) を 37°C に予温しておいた血清不含の RPMI 1640 培地 ($\text{pH} 7.2$) にそれぞれ細胞密度 2.5×10^5 個/ ml 及び 5×10^4 個/ ml になるように浮遊させ、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱に平均分子量 $1,500$ ダルトンの 50% (w/v) ポリエチレングリコールを含む血清不含の RPMI 1640 培地 ($\text{pH} 7.2$) 1ml を1分間かけて滴々加え、 37°C で1分間インキュベートした後、全量が 50ml になるまで血清不含の RPMI 1640 培地 ($\text{pH} 7.2$) を滴々加え、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱を HAT 培地に浮遊させ、 96 ウエルマイクロプレートに $200 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ ずつ分注し、 37°C で2週間インキュベートしてハイブリドーマを選択した。細胞融合は、1回に1匹のマウスから得た脾細胞を使用して、同様の方法で3回実施した。ハイブリドーマが増殖した各ウエルの培養上清 (以下、「ハイブリドーマの培養上清」という。) を採取し、後述の直接法によるエンザイムイムノアッセイに供して、 $\text{rIFN}\alpha 8$ に反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選別した。引続き、このハイブリドーマを、常法にしたがって限界希釈を繰返し適用し、 $\text{rIFN}\alpha 8$ に親和性を示すモノクローナル抗体を安定して産生するハイブリドーマのクローン $\alpha 8\#44$ 、 $\alpha 8\#59$ 、 $\alpha 8\#98$ 、 $\alpha 8\#139$ 、 $\alpha 8\#145$ を得た。なお、ハイブリドーマ $\alpha 8\#139$ 、すなわち、 $\text{mAb-IFN}\alpha 8\#139$ については、平成20年2月15日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1 中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託し、受託番号 FERMBP-11081 として受託された。これらのハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体は、 $\text{IFN}\alpha 8$ 及びその変異蛋白質の定性や定量のためのイムノアッセイ用やこれらの蛋白質の精製用の抗体として使用することができる。また、これらのハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体は、そのまま、或いは、組換技術等を利用して、キメラ抗体、ヒト化抗体やヒト抗体を調製して、 $\text{IFN}\alpha 8$ が発症や増悪に関与している各種疾患の治療剤の有効成分としても使用することができる。

<直接法による抗 $\text{IFN}\alpha 8$ 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング>

抗原として使用した $\text{rIFN}\alpha 8$ を、その蛋白質濃度を $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈して、 $50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ ($\text{rIFN}\alpha 8$ の蛋白質量: $100 \text{ng}/50 \mu\text{l}/\text{ウエル}$) で、コバレント NH モジュール (NUNC 社販売) に加え、ビス スルフォサクシニミジル スベレイトを用いて吸着させて固相とした。各ウエルに加えた $\text{rIFN}\alpha 8$ を含む溶液を除去し、 1% BSA 含 PBS でブロッキング処理後、処理液を除去した。この各ウエルに、上記のハイブリドーマの培養上清を加えて、室温で2時間振とうした。この培養上清を除去後、 0.05% ツイーンを含む PBS で洗浄し、ペルオキシダーゼ (以下、「HRP」と略記する。) 標識したウサギ抗マウスイムノグロブリン (ダコ サイトメイション (DAKO Cytomation) 社販売) を加えた。この標識抗体を含む溶液を除去後、 0.05% ツイーンを含む PBS で洗浄し、 $0.5 \text{mg}/\text{ml}$ の o-フェニレンジアミン (以下、「 o-PD 」) と 0.03% の過酸化水素を含む 0.1M のリン酸ナトリウム-クエン酸緩衝液 ($\text{pH} 5.0$) を加えて、発色反応を行い、 $2\text{N H}_2\text{SO}_4$ を $100 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ 加えて反応を停止して、マルチプレートリーダーで吸光度 (OD: A490/650 nm) を測定して、 $\text{rIFN}\alpha 8$ に反応性を示す抗体を産生するハイブリド

ーマを選別した。

【実施例2】

【0036】

＜ラット抗IFN α 8抗体産生ハイブリドーマの調製＞

10週齢BNラットの腹腔内に実施例1で使用したrIFN α 8を抗原として、コンプリートフロイントアジュバントに混和して、その蛋白質量が20 μ g/匹の割合で腹腔内に免疫した。その後、2週間おきに同一量の抗原をインコンプリートアジュバントに混合して2回接種し、最後の投与から1週間後に、アジュバントを含まない抗原を、同一量さらに静注した。その3日後に脾臓を摘出し、分散して脾細胞を得た。この脾細胞とラット骨髄腫由来のY3Ag1.2.3細胞(ATCC CRL1631)を37 $^{\circ}$ Cに予温しておいた血清不含のRPMI1640培地(pH7.2)にそれぞれ細胞密度 2.5×10^5 個/ml及び 5×10^4 個/mlになるように浮遊させ、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱に平均分子量1,500ダルトンの50%(w/v)ポリエチレングリコールを含む血清不含のRPMI1640培地(pH7.2)1mlを1分間かけて滴々加え、37 $^{\circ}$ Cで1分間インキュベートした後、全量が50mlになるまで血清不含のRPMI1640培地(pH7.2)を滴々加え、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱をHAT培地に浮遊させ、96ウエルマイクロプレートに200 μ l/ウエルずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで2週間インキュベートしてハイブリドーマを選別した。各ウエルにおける培養上清中に分泌された抗体につき、後述のサンドイッチ法によるエンザイムイムノアッセイにより調べ、rIFN α 8に反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選別した。引続き、このハイブリドーマに常法にしたがって限界希釈を繰返し適用し、本発明のモノクローナル抗体を安定して産生するハイブリドーマのクローン α 8#Y19-1及び α 8Y36-2を得た。なお、ハイブリドーマ α 8Y36-2、すなわち、mAb-IFN α 8Y36-2については、平成20年2月15日付で、日本国茨城県つくば市東1丁目1番地1中央第6所在の独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センターに寄託し、受託番号FERM BP-11082として受託された。これらハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体は、IFN α 8及びその変異蛋白質の定性や定量のためのイムノアッセイ用やこれらの蛋白質の精製の抗体として使用することができる。また、これらのハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体は、そのまま、或いは、組換技術等を利用して、キメラ抗体、ヒト化抗体やヒト抗体を調製して、IFN α 8が発症や増悪に関与している各種疾患の治療剤の有効成分としても使用することができる。

＜サンドイッチ法による抗IFN α 8抗体産生ハイブリドーマのスクリーニング＞

イムノプレート(NUNC社販売)を、ウサギ抗ラットイムノグロブリン(ダコ サイトメイション(DAKO Cytomation)社販売)でコーティングし、ハイブリドーマの培養上清を加えて、室温で1~2時間振とうし、培養上清を除去して、0.05%ツイーンを含むPBSで3回洗浄して、rIFN α 8を5ng/50 μ l/ウエル添加し、さらにHRP標識したウサギポリクローナル抗IFN α 抗体(株式会社林原生物化学研究所調製)を、50ng/50 μ l/ウエル加えた。実施例1と同様に、発色反応を行い、マルチプレートリーダーで吸光度(OD:A490nm/650nm)を測定して、rIFN α 8に反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選別した。

【実施例3】

【0037】

＜ラットマウス抗IFN α 8抗体産生ヘテロハイブリドーマの調製＞

10週齢BNラットの腹腔内に、実験1で使用したのと同じrIFN α 8蛋白質をコンプリートフロイントアジュバントに混和して、蛋白質量が20 μ g/匹の割合で腹腔内に免疫した。その後、2週間おきに同一量を2回追加免疫し、最後の免疫から1週間後に同一量をさらに静注した。その3日後に脾臓を摘出し、分散して脾細胞を得た。この脾細胞とマウス骨髄腫由来のSP2/O-Ag14細胞(ATCC CRL1581)を37 $^{\circ}$ Cに予温しておいた血清不含のRPMI1640培地(pH7.2)にそれぞれ細胞密度 2.5×10^5 個/ml及び 5×10^4 個/mlになるように浮遊させ、遠心分離後、沈

澱部分を採取した。この沈澱に平均分子量1,500ダルトンの50% (w/v) ポリエチレングリコールを含む血清不含のRPMI 1640培地 (pH 7.2) 1mlを1分間かけて滴々加え、37℃で1分間インキュベートした後、全量が50mlになるまで血清不含のRPMI 1640培地 (pH 7.2) を滴々加え、遠心分離後、沈澱部を採取した。この沈澱をHAT培地に浮遊させ、96ウエルマイクロプレートに200 μ l/ウエルずつ分注し、37℃で2週間インキュベートしてハイブリドーマを選択した。各ウエルにおける培養上清中に分泌された抗体につき、実施例1又は実施例2と同様の方法でIFN α 8との反応性をエンザイムイムノアッセイにより調べ、rIFN α 8に反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマを選別した。引続き、このハイブリドーマに、常法にしたがって限界希釈を繰返し適用し、本発明のモノクローナル抗体を安定して産生するハイブリドーマのクローン α 8#S18-1及び α 8#S56-1を得た。これらのモノクローナル抗体は、IFN α 8及びその変異蛋白質の定性や定量のためのイムノアッセイ用やこれらの蛋白質の精製用の抗体として使用することができる。また、これらのハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体は、そのまま、或いは、組換技術等を利用して、キメラ抗体、ヒト化抗体やヒト抗体を調製して、IFN α 8が発症や増悪に関与している各種疾患の治療剤の有効成分としても使用することができる。

10

【実施例4】

【0038】

<モノクローナル抗体の調製>

<マウス抗IFN α 8モノクローナル抗体の調製>

20

実施例1の方法により得たハイブリドーマのクローン α 8#44、 α 8#59、 α 8#98、 α 8#139 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11081) 及び α 8#145を、各々細胞密度約 1×10^6 個/mlになるように無血清培地 (インビトロジェン (Invitrogen) 社販売、商品名「ハイブリドーマーSFMコンプリートDMP」) 又は10% (v/v) ウシ胎児血清 (FCS) を加えたRPMI 1640培地に浮遊させ、培養規模を拡大しながら、5% (v/v) CO₂ インキュベータ中、37℃で培養した。所期の細胞密度に達した時点で、ハイブリドーマを、予め、プリスタン 0.5 ml/匹腹腔内注射しておいた8週齢のBALB/cマウスの腹腔内に、各々 1×10^7 個/匹注射接種し、通常の方法で10日間飼育した。マウスから腹水を採取し、PBSで3倍希釈した後、硫酸アンモニウムを50%飽和になるように加え、4℃で24時間静置し、遠心分離後、沈澱部を採取した。沈澱をPBSで透析し、常法により、プロテインG結合セファロースカラム (ジーイーヘルスケア バイオサイエンス (ジーイーヘルスケア バイオサイエンス) 社販売、商品名「プロテインGセファロース4FFカラム」) に供し、IgG画分を精製した。以下、ハイブリドーマのクローン α 8#44、 α 8#59、 α 8#98、 α 8#139 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11081)、 α 8#145の産生する抗IFN α 8抗体を、各々 α 8#44 mAb、 α 8#59 mAb、 α 8#98 mAb、 α 8#139 mAb、 α 8#145 mAbとよぶ。

30

<ラット或いはラットマウス抗IFN α 8モノクローナル抗体の調製>

実施例2で得たハイブリドーマ α 8#Y19-1及び α 8Y36-2 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11082)、実施例3で得たハイブリドーマ α 8#S18-1及び α 8#S56-1を、各々、細胞密度約 1×10^6 個/mlになるように、無血清培地 (インビトロジェン (Invitrogen) 社販売、商品名「ハイブリドーマーSFMコンプリートDMP」) 又は10% (v/v) ウシ胎児血清 (FCS) を加えたRPMI 1640培地に浮遊させ、培養規模を拡大しながら、5% (v/v) CO₂ インキュベータ中、37℃で所定量の培養規模になるまで培養した。この培養上清を回収し、濃縮して、常法により、プロテインG-セファロース4FFカラム (ジーイーヘルスケア バイオサイエンス (ジーイーヘルスケア バイオサイエンス) 社販売) に供し、各々のハイブリドーマの産生したIgG画分を精製した。以下、ハイブリドーマ α 8#Y19-1、 α 8Y36-2 (独立行政法人産業技術

40

50

総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11082)、ハイブリドーマ $\alpha 8 \# S 18-1$ 及び $\alpha 8 \# S 56-1$ の産生する抗IFN $\alpha 8$ 抗体を、各々 $\alpha 8 \# Y 19-1 mAb$ 、 $\alpha 8 Y 36-2 mAb$ 、 $\alpha 8 \# S 18-1 mAb$ 及び $\alpha 8 \# S 56-1 mAb$ とよぶ。

<モノクローナル抗体の特徴>

これら9種類の抗体のイソタイプを、各ハイブリドーマを無血清培地で培養した培養上清を使用して、市販のエンザイムイムノアッセイキット (Zymed社販売、商品名「Rat MonoAB ID kit」又は「Mouse MonoAB ID kit」) により決定した結果を表1に示す。さらに、これら9種類のモノクローナル抗体の、表1又は2に示すIFN類及びTNF α に対する反応性を、後述のウエスタンブロッティング分析により確認した結果を表1及び表2に併せて示す。また、代表的なウエスタンブロッティングの結果として、図1に示すIFN α 類を使用して、 $\alpha 8 \# 139$ の培養上清を用いた時のウエスタンブロッティングのパターンを図1に示す。さらに、これらのハイブリドーマの培養上清と、表3に示すIFN類又はIFN $\alpha 8$ の変異体を30乃至70 IU/mlに希釈した溶液とを等量混合して、その抗ウイルス活性が中和される (活性が減少する) かどうかを、FL細胞に対するシンドビスウイルスの細胞変性を指標とする抗ウイルス活性測定により確認した。その結果を表3に示す。なお、ウエスタンブロッティングは、IFN類或いはTNF蛋白質のバンドが染色された場合を反応性あり (+)、染色されない場合を反応性なし (-) と判定した。また、中和活性は、実質的に抗ウイルス活性が測定されない場合を中和活性あり (+)、それ以外の場合を中和活性なし (-) と判定した。

<ウエスタンブロッティング分析>

10% (w/v) SDS水溶液0.5ml及びグリセロール1mlからなる混液に実施例1で抗原として使用したrIFN $\alpha 8$ 或いはnIFN $\alpha 2$ を加え、37℃で1時間インキュベートした後、各々の蛋白質量が10又は100 ng/レーンとなるようにチャージして、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動した。IFN類の蛋白質の分子量に相当する約20乃至29キログルトン (以下、「KDa」と略記する。) の範囲のゲルに含まれる蛋白質を、常法により、ニトロセルロース膜に移し、非特異的な反応を抑制するためブロッキング溶液 (大日本住友製薬社販売、商品名「ブロックエース」) に浸漬した。このブロッキング処理したニトロセルロース膜を、プロテインGセファロースを用いて精製した9種類のモノクローナル抗体のいずれかを2 μ g/ml含有する溶液に、室温で1時間浸漬した後、0.05% (v/v) ツイーン20を含む50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) で洗浄して過剰の抗体を除いた。ニトロセルロース膜を、HRP標識した抗マウスイムノグロブリン又は抗ラットイムノグロブリン (何れもダコ サイトメイション (DAKO Cytomation) 社販売) 溶液に、室温で1時間浸漬した。この膜を0.05% (v/v) ツイーン20を含む50mMトリス-塩酸緩衝液 (pH7.5) で30分間洗浄後、発色反応は、市販のウエスタンブロッティング検出キット (ジーイーヘルスケア バイオサイエンス社販売、商品名「ECL western blotting detection reagent and Hyperfilm ECL」) を用いて行った。なお、分子量マーカーには、市販のSDS-PAGE用分子量マーカー (バイオラッド社販売、商品名「プレステイン SDS-PAGE スタンダード ブロードレンジ」、構成: ミオシン (204 KDa)、 β -ガラクトシダーゼ (120 KDa)、BSA (100 KDa)、オボアルブミン (52 KDa)、カーボニックアンヒドラーゼ (37 KDa)、ソイビートトリプシンインヒビター (29 KDa)、リゾチーム (20 KDa) 及びアプロチニン (7 KDa) を用いた。

【0039】

【表 1】

ハイブリドーマ	インタイプ	ヒトIFN α サブタイプ又はその変異蛋白との反応性(ウエスタンブロットティング)											
		rIFN α 1	rIFN α 2	nIFN α 2	rIFN α 5	rIFN α 6	rIFN α 8	nIFN α 8	rIFN α 8	rIFN α 10	Con IFN	IFN α 8-MUT2	IFN α 8-MUT3
α 8#44	IgG ₁ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
α 8#59	IgG ₁ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
α 8#98	IgG ₁ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
α 8#139	IgG ₁ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
α 8#145	IgG ₁ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
α 8#S18-1	IgG ₁ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
α 8#Y19-1	IgG ₁ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
α 8#Y36-2	IgG ₁ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+
α 8#S56-1	IgG ₃ , κ	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+

+: 反応性あり

-: 反応性なし

【0040】

10

20

30

40

【表 2】

ハイブリドーマ	IFN類、サイトカイン類との反応性(ウエスタンブロッティング)					
	IFN β	IFN γ	Con IFN	マウスIFN α/β	ラットIFN α	TNF α
α 8#44	—	—	—	—	—	—
α 8#59	—	—	—	—	—	—
α 8#98	—	—	—	—	—	—
α 8#139	—	—	—	—	—	—
α 8#145	—	—	—	—	—	—
α 8#S18-1	—	—	—	—	—	—
α 8#Y19-1	—	—	—	—	—	—
α 8Y36-2	—	—	—	—	—	—
α 8#S56-1	—	—	—	—	—	—

+: 反応性あり

-: 反応性なし

10

20

【0041】

【表 3】

ハイブリドーマ	ヒトIFN或いはその変異体に対する中和活性						
	nIFN α 8	rIFN α 8	IFN α 8-MUT2	IFN α 8-MUT3	rIFN α 2	IFN β	IFN γ
α 8#44	—	—	—	—	—	—	—
α 8#59	—	—	—	—	—	—	—
α 8#98	—	—	—	—	—	—	—
α 8#139	+	+	+	+	—	—	—
α 8#145	—	—	—	—	—	—	—
α 8#S18-1	—	—	—	—	—	—	—
α 8#Y19-1	—	—	—	—	—	—	—
α 8Y36-2	—	—	—	—	—	—	—
α 8#S56-1	+	+	+	+	—	—	—

+: 中和活性あり

-: 中和活性なし

30

【0042】

表1から明らかのように、実施例1乃至3で得たモノクローナル抗体はいずれもIgGクラス(軽鎖は κ)の抗体であった。また、表1及び2から明らかのように、これらの抗体は、rIFN α 8、nIFN α 8及び2種類のIFN α 8変異蛋白質とのみ反応し、その他のヒトIFN α サブタイプ、IFN β 、IFN γ 、ConIFN、マウスIFN α/β 、ラットIFN α 及びTNF α と反応せず、これらの抗体がIFN α 8及びその変異体を特異的に認識する抗体であることが明らかになった。また、図1から明らかのように、ウエスタンブロッティング分析では、分子量が20乃至29kDaに認められるnIFN α 8及びrIFN α 8蛋白質のバンドのみが発色し、他のIFN α の蛋白質のバンドは染色していないので、 α 8#139mAbは、nIFN α 8及びrIFN α 8蛋白質特異的に反応することが明らかになった。また、 α 8#139mAbのnIFN α 8とrIFN

40

50

$\alpha 8$ に対する反応性を比較すると、プロットイングには、等質量の n I F N $\alpha 8$ と r I F N $\alpha 8$ の蛋白質を使用したにもかかわらず、n I F N $\alpha 8$ の方が強く染色されているので、このモノクローナル抗体は組換型よりも天然型の I F N $\alpha 8$ に対する反応性が強いと判断した。また、具体的なウエスタンブロットイングのパターンは示さないが、表 1 及び表 2 に示すとおり、他の 8 つのハイブリドーマの産生する抗体は、いずれも天然型、組換型の I F N $\alpha 8$ 及び I F N $\alpha 8$ 変異蛋白質とのみ反応し、他の I F N 類や T N F α には反応しなかった。また、天然型と組換型 I F N α に対する反応性も、 $\alpha 8 \# 139mAb$ と同様のパターンを示した。さらに、表 3 から明らかなように、I F N $\alpha 8$ の抗ウイルス活性に対する中和活性は、 $\alpha 8 \# 139mAb$ 及び $\alpha 8 \# S56-1mAb$ でのみ認められた。また、 $\alpha 8 \# 139mAb$ 及び $\alpha 8 \# S56-1mAb$ の場合も、n I F N $\alpha 2$ 、I F N β 及び I F N γ の抗ウイルス活性に対する中和活性は認められなかったことから、これら 2 種類のモノクローナル抗体の持つ中和活性は I F N $\alpha 8$ 特異的であることが判明した。

10

【実施例 5】

【0043】

< I F N $\alpha 8$ に対するエンザイムイムノアッセイ系の構築 >

実施例 4 の方法により調製した 9 種類のモノクローナル抗体を使用して、I F N $\alpha 8$ を特異的に定量できるエンザイムイムノアッセイ系の構築に適した抗体のスクリーニングを以下のように行った。

< 抗体 >

20

実施例 4 で調製した 9 種類のモノクローナル抗体、ウサギポリクローナル抗 I F N α 抗体 (以下、「p o l y I F N α 」と略記する。) 及びマウスモノクローナル抗 I F N α 抗体 (以下、「m A b I F N $\alpha 14$ 」と略記する。)(何れも、株式会社林原生物化学研究所調製)を使用した。なお、p o l y I F N α 及び m A b I F N $\alpha 14$ は、I F N $\alpha 8$ 及びそれ以外のヒト I F N α サブタイプとの反応性を有している。

< ペルオキシダーゼ標識抗体の調製 >

常法にしたがって、前記 11 種類の抗体を、過ヨウ素酸化法により H R P 標識した。すなわち、H R P (ロッシュ (R o c h e) 社販売) 10 m g を蒸留水 2 m l に溶解し、0.1 M 過ヨウ素酸ナトリウム 125 μ l を添加して遮光下、室温で 15 分間静置した。その後、エチレングリコール 100 μ l を添加後、遮光下で、室温で 5 分間、1 m M 酢酸ナトリウム緩衝液 (p H 4.2) に対し透析した後、H R P が 15 m g / m l 以上になるように濃縮した。この濃縮した H R P 8 m g と、予め 20 m g / m l 以上に濃縮した前記 11 種類の抗体のいずれか 10 m g とを混合し、水を加えて全量を 850 μ l にした後、0.1 M 炭酸水素ナトリウム緩衝液 (p H 9.5) 150 μ l を添加して、p H を約 9.3 に調整して、遮光下、4 $^{\circ}$ C で 2 時間静置した。その後、4 m g / m l 水素化ホウ素ナトリウムを 100 μ l 添加して、遮光下、室温で、3 時間静置後、ゲル濾過用カラム (ジーイーヘルスケア バイオサイエンス社販売、商品名「S e p h a c r y l S - 300 H R」) によるゲルろ過にて、H R P 標識抗体画分を回収した。回収した画分に、ウシ血清アルブミン (以下、「B S A」) と略記する。) を 1% となるよう溶解し、膜ろ過 (ポアサイズが 0.22 μ m) して、H R P 標識抗体 (以下、「標識抗体」という。) を調製した。

30

40

< エンザイムイムノアッセイの方法 >

前記 H R P 標識した 11 種類の抗体と、その標識に使用した 11 種類の未標識の抗体 (以下、「未標識抗体」という。) を固相抗体として使用して、サンドイッチ法による 121 通りの組み合わせによるエンザイムイムノアッセイで、r I F N 蛋白質の定量が可能かどうかを試験した。すなわち、11 種類の未標識抗体を、各々抗体濃度が 20 μ g / m l となるように P B S で希釈し、その各々をイムノプレートに 50 μ l / ウエル添加して、室温 2 時間静置後、溶液を除去し、1% B S A を含む P B S を加えて、4 $^{\circ}$ C で一晩、ブロッキング処理をおこなった。ブロッキング後、1% B S A を含む P B S を除去し、r I F N $\alpha 8$ を、5% F C S、1% B S A、1 M N a C l を含む P B S で 69 p g / m l ~ 60

50

ng/mlに希釈したもののいずれかを、50 μ l/ウエル添加した。室温で2時間振とう後、各ウエルを、0.05%ツイーン20を含むPBSで3回洗浄した。洗浄に使用したPBSを除去後、前記11種類の標識抗体を、各々5%FCS、1%BSA、0.15M NaCl及び0.1%CHAPSを含むPBSで1 μ g/mlとなるように希釈して、それぞれを、11種類の未標識抗体を固相に使用したウエルに、50 μ l/ウエル添加して、室温で2時間振とうした。この標識抗体を含む溶液を除去後、0.05%ツイーン20を含むPBSで3回洗浄後、0.5mg/mlのo-フェニレンジアミン(o-PD)と0.03% H_2O_2 とを含む0.1Mリン酸クエン酸緩衝液(pH5.0)を100 μ l/ウエル加えて発色させ、2N H_2SO_4 を100 μ l/ウエル加えて反応を停止して、マルチプレートリーダーで吸光度(OD:A490/650nm)を測定した。対照として、rIFN α 8を含まない、5%FCS、1%BSA、1M NaClを含むPBSを加えた場合の吸光度を同様に測定した。なお、測定は1試料につき3ウエルを使用し、その平均を求めた。また、測定した吸光度に基づく検量線の回帰分析による直線性を判定する相関係数(r値)が0.997以上の範囲となるrIFN α 8蛋白質の最小濃度と、対照のウエルを測定した時の吸光度(OD)に、その測定値の標準偏差値を3倍した値を加えた値と、rIFN α 8蛋白質最小濃度の測定値からその測定値の標準偏差値を3倍した値を減じた値とを比較して、数値の大きい方に相当するrIFN α 8蛋白質濃度を、試験したエンザイムイムノアッセイによるrIFN α 8蛋白質の検出下限濃度とした。

10

<IFN α 2との交差反応性の確認>

前記エンザイムイムノアッセイの方法において、rIFN α 8に換えてrIFN α 2を使用した以外は、全く同じ方法で、エンザイムイムノアッセイを行った。rIFN α 2の濃度に依存した吸光度の上昇が認められた場合を交差反応あり(「有」)、認められなかった場合を交差反応なし「無」と判定した。

20

<測定結果>

11種類の未標識抗体(固相)と11種類の標識抗体による121通りの組み合わせのエンザイムイムノアッセイのうち、rIFN α 8の濃度に依存した吸光度(OD)の上昇が認められ、且つ、IFN α 8を含まない溶液(5%FCS、1%BSA、1M NaCl)の吸光度(OD)が比較的低かった(ODが0.4以下)、14通りの組合せのみを表4に示す。また、表4に示す抗体の組み合わせで、rIFN α 8に替えて、IFN α 2を使用した場合にrIFN α 2の濃度に依存した吸光度(OD)の上昇が認められるかどうか(IFN α 2との交差反応の有無)も確認して、その結果を併せて表4に示す。また、上記方法により求めた、14類の組み合わせによるエンザイムアッセイの検出下限濃度(pg/ml)を表4に併せて示す。

30

【0044】

【表 4】

固相抗体	標識抗体	rIFN α 2との 交差反応の 有無	rIFN α 8蛋白質 の検出下限濃度 (pg/ml)	吸光度(OD)	
				対照 (rIFN α 8を 含まない)	rIFN α 8 (50ng/ml)
α 8#59mAb	mAbIFN α 14	無	617	0.03	1.0
	α 8Y36-2mAb	無	617	0.07	1.1
α 8#98mAb	polyIFN α	無	1852	0.3	0.65
α 8#139mAb	α 8Y36-2mAb	無	69又は206	0.05	3.5
	α 8#44mAb	無	5555	0.03	1.2
	polyIFN α	無	206	0.2	2.1
	mAbIFN α 14	無	69又は206	0.007	2.7
α 8Y36-2mAb	α 8#145mAb	無	5555	0.05	0.12
	α 8#139mAb	無	5555	0.4	0.95
	α 8#59mAb	無	1852	0.1	0.9
	polyIFN α	無	69	0.02	1.6
α 8#S56-1mAb	polyIFN α	有	69>	0.02	2.5
polyIFN α	polyIFN α	有	69	0.02	1.4
	α 8#S56-1mAb	有	206	0.2	1.5

10

【0045】

表4に示す固相抗体と標識抗体の14種類の組合せで、エンザイムイムノアッセイを行
った場合に、rIFN α 8の濃度に依存した吸光度の上昇が認められた。固相抗体として
 α 8#139mAb又は α 8Y36-2mAbを使用した組み合わせで、検出下限濃度が
69又は206pg/mlとなった。また、polyIFN α と α 8#S56-1との組
み合わせでは、rIFN α 2に対する交差反応が認められた。エンザイムアッセイは、I
FN α 8に特異的で、且つ、検出感度が高く、測定精度も高いことが求められるので、I
FN α 2と交差反応が「無」く、rIFN α 8の検出下限濃度が低く、且つ、検量線の傾
きが大きい(対照とIFN α 8濃度50ng/mlの吸光度差が大きい)という要件を満
たす組み合わせとしては、固相抗体に α 8#139mAbを使用し、標識抗体として α 8
Y36-2mAb又はmAbIFN α 14を使用する組み合わせと、固相抗体として α 8
Y36-2mAbを使用し、標識抗体としてpolyIFN α を使用した場合が考えられ
た。これらの結果は、固相抗体としてIFN α 8を特異的に認識する α 8#139m又は
Ab α 8Y36-2mAbを使用することにより、高感度のIFN α 8を特異的に検出す
るアッセイ系が構築できることを物語っている。しかしながら、標識抗体としてmAbI
FN α 14又はpolyIFN α を使用すると、これらの抗体はIFN α 8以外のIFN
 α サブタイプと反応する可能性があるため、IFN α 8サブタイプ特異的なエンザイム
イムノアッセイ系としては、固相抗体として α 8#139mAbを使用し、標識抗体として
 α 8Y36-2mAbを使用する組み合わせが特に望ましいと判断した。

20

30

【実施例6】

【0046】

<IFN α 8サブタイプ特異的なエンザイムイムノアッセイ系によるIFN α 8の検出範
囲>

40

実施例5でIFN α 8の特異的な検出に使用可能と判断した、固相抗体として α 8#1
39mAbを使用し、標識抗体として α 8Y36-2mAbを使用するエンザイムイム
ノアッセイを、後述の方法でおこない、rIFN α 8の検量線を作成した結果を図2に示
す。また、この検量線に基づき算出した当該エンザイムアッセイ系によるIFN α 8蛋白質
の検出下限濃度を、実施例5に記載した方法に基づき算出して表5に併せて示す。また、
この検量線の直線性を示す相関係数(r値)が0.997以上の範囲の最大のOD値に相
当するrIFN α 8蛋白質濃度を求めて、当該エンザイムイムノアッセイによるrIFN
 α 8蛋白質の検出上限濃度として表5に併せて示す。

<IFN α 8サブタイプ特異的なエンザイムイムノアッセイの特異性の確認>

50

前記の固相抗体として $\alpha 8 \# 139 \text{mAb}$ を使用し、標識抗体として $\alpha 8 Y 36-2 \text{mAb}$ を使用するエンザイムイムノアッセイ系がIFN $\alpha 8$ 以外のIFN類やサイトカイン蛋白を検出しないことを確認するために、表5に示す蛋白質濃度のIFN類及びサイトカイン類を当該エンザイムイムノアッセイ系に供したときの吸光度の測定結果を表5に併せて示す。

<エンザイムイムノアッセイの方法>

固相抗体として $\alpha 8 \# 139 \text{mAb}$ を、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ にPBSで希釈して、イムノプレート (NUNC社販売) に $100 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ で分注した。室温で3時間静置後、固相溶液を捨て、1%BSAを含むPBSを $250 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ 加えて、 4°C で一晩静置してブロッキングを行った。1%BSAを含むPBSを除去後、標準品として、2.5%FCS、0.5%BSA及び0.5M NaClを含むPBSで、rIFN $\alpha 8$ を10乃至2,000 pg/mlに希釈した溶液を調製した。また、表5に示すIFN類又はサイトカイン類を被験試料として、rIFN $\alpha 8$ の希釈に使用したのと同じFCS、BSA及びNaClを含むPBSで10 ng/mlに希釈した溶液のいずれかを、 $100 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ 添加して室温で、3時間振とうした。その後、標準品溶液或いは被験試料を含む溶液を除去後、0.05%ツイーン20含有PBSで3回洗浄した。洗浄液を除去後、5%FCS、1%BSA、0.15M NaCl及び0.1%CHAPSを含むPBSで $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ に希釈したHRP標識した $\alpha 8 Y 36-2 \text{mAb}$ を、 $100 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ 添加して、室温2時間振とう後、0.05%ツイーン20を含むPBSで3回洗浄した。洗浄液を除去後、0.5 mg/mlのo-PDと0.03% H_2O_2 を含有する0.1Mリン酸クエン酸緩衝液 (pH 5.0) を $100 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ 添加して発色させた後、2N H_2SO_4 を $100 \mu\text{l}/\text{ウエル}$ 添加して発色反応を停止させて、マルチプレートリーダーで吸光度 (OD: A490/650 nm) を測定した。なお、測定は1試料につき3ウエルを使用し、その平均を求めた。

【0047】

【表 5】

IFN類・サイトカイン類	比活性 (IU or U/mg 蛋白)	蛋白質濃度 (ng/ml)	吸光度 (OD)
rIFN α 1	7.55×10^6	10	0.014
rIFN α 2	1.68×10^8	10	0.013
nIFN α 2	1.82×10^8	10	0.011
rIFN α 5	3.91×10^7	10	0.010
rIFN α 6	5.35×10^7	10	0.024
rIFN α 8	2.49×10^8	2	2.991
nIFN α 8	2.98×10^8	2	2.910
rIFN α 10	1.41×10^8	10	0.010
Con IFN	1×10^9	10	0.009
IFN β	2×10^8	10	0.013
IFN γ	1.46×10^7	10	0.010
TNF α	9.37×10^8	10	0.010
ラット IFN α	2.97×10^7	10	0.009
マウス IFN α/β	1.38×10^7	10	0.011
IFN α 8-MUT2	4.2×10^8	2	3.079
IFN α 8-MUT3	3.9×10^8	2	2.604
rIFN α 8 (検出上限濃度)	—	2	2.991
rIFN α 8 (検出下限濃度)	—	0.05	0.033
緩衝液のみ	—	0	0.015

10

20

30

【0048】

図2から明らかなように、前記条件に従って、固相抗体に α 8#139mAbを使用し、標識抗体として α 8Y36-2mAbを使用したエンザイムイムノアッセイの場合、rIFN α 8が0.05乃至2ng/ml(50乃至2,000pg/ml)の範囲において、その蛋白質量に比例した吸光度に直線的な上昇が認められた。この結果は、当該エンザイムイムノアッセイ系を使用することにより、少なくとも約50乃至2,000pg/mlの濃度の当該蛋白質を精度よく検出できることを物語っている。また、表5から明らかなように、当該エンザイムイムノアッセイ系により、nIFN α 8、rIFN α 8及びその変異体以外のIFN α サブタイプ、IFN β 、IFN γ 、Con IFN、ラットIFN α 、マウスIFN α/β 、TNF α のいずれかを、IFN α 8の検出下限濃度の200倍量(検出上限濃度の5倍量)に相当する10ng/ml含む溶液を測定しても、その吸光度は、これらの蛋白質を溶解した緩衝液のみの場合と差は認められなかった。この結果は、当該エンザイムイムノアッセイが、IFN α 8及びその変異体以外のIFN類やサイトカインとの交差性はなく、IFN α 8及びその変異体に特異的なエンザイムイムノアッセイ系が確立できたことを物語っている。

40

【実施例7】

【0049】

<ラジオイムノアッセイによるrIFN α 8蛋白質の検出>

50

常法にしたがって、実施例4の方法により得た $\alpha 8 \# 139 \text{mAb}$ を常法によりラジオイムノアッセイ用ポリスチレンビーズに吸着させ、2% (w/v) BSAを含むPBS中、4℃で一晩静置して固相抗体ビーズを調製した。

【0050】

試験管にこの固相抗体ビーズを1個ずつとり、実施例1で使用したrIFN $\alpha 8$ を0.5% (w/v) BSAを含むPBSにより適宜濃度に希釈して0.2mlずつ加え、4℃で4時間静置した。固相抗体ビーズを0.05% (v/v) ツイーン20と0.5% (w/v) BSAを含むPBSで洗浄した後、実施例4の方法により得た $\alpha 8 \text{Y}36-2 \text{mAb}$ を常法により ^{125}I 標識して0.2ml ($1 \times 10^5 \text{cpm}$) ずつ加え、4℃で一晩静置した。過剰の標識抗体を除去し、0.05% (v/v) ツイーン20と0.5% (w/v) BSAを含むPBSで洗浄した後、ガンマカウンタによりビーズの放射能を測定したところ、10乃至1,000 pg/mlのIFN $\alpha 8$ 及びその変異蛋白質を精度よく検出することができた。

10

【実施例8】

【0051】

<エンザイムイムノアッセイによるBALB-1細胞由来のヒトnIFN $\alpha 8$ 蛋白質の定量>

ヒトリンパ芽球様細胞株のBALB-1細胞(株式会社林原生物化学研究所所有)にHVJを加えて誘導されたnIFN α は、nIFN $\alpha 2$ とnIFN $\alpha 8$ (IFN $\alpha 8 \text{b}$)とを、72 \pm 9:28 \pm 9の比率(質量)で含有し、nIFN $\alpha 7$ をわずかに含むことが知られている(例えば、シゲハル フクダ等(Shigeharu Fukuda et al.)、『リンフォカイン(Lymphokine)』、第7巻、第2号、第175乃至185頁(1988年)参照)。実施例6で使用した本発明のエンザイムイムノアッセイ系が、このBALB-1細胞由来のヒトnIFN α 中のnIFN $\alpha 8$ を特異的に定量できることを確認するために以下の試験を行った。すなわち、BALB-1細胞をハムスターの新生仔の背部皮下に移植し、増殖させたBALB-1細胞を、RPMI1640培地に浮遊させて、HVJを加えて一晩培養した培養上清に紫外線を照射してHVJを不活化した溶液(以下、「BALB-1培養上清」と略記する。)、及び、当該溶液をモノクローナル抗体カラム(ロンザ社販売、商品名「NK2-セファロース」)で精製したヒトnIFN α 標品を、バイオアッセイ、及び、IFN $\alpha 2$ 又はIFN $\alpha 8$ 特異的なエンザイムイムノアッセイに供した。その結果を表6に示す。また、バイオアッセイでは、予め、実施例4で調製した抗IFN $\alpha 8$ 抗体($\alpha 8 \# 139 \text{mAb}$)を加えてnIFN $\alpha 8$ の活性を特異的に中和した標品の活性を測定した結果も併せて表6に示す。なお、エンザイムイムノアッセイには、nIFN $\alpha 8$ の定量は、実施例6で構築したアッセイ系を使用し、nIFN $\alpha 2$ は市販のIFN α アッセイキット(株式会社JIMRO販売、商品名「ヒトIFN- α 測定キット」)を使用した。また、測定は1試料につき3ウェルを使用し、その平均を求めた。

20

30

【0052】

【表 6】

	抗ウイルス活性	BALL-1培養上清	抗体カラム精製ヒトnIFN α
バイオアッセイ	総活性(IU/ml)	3.08×10^4	4.4×10^7
	nIFN α 2(IU/ml) * 1	1.93×10^4	2.77×10^7
	nIFN α 8(IU/ml) * 2	1.16×10^4	1.63×10^7
	nIFN α 8/総ヒトnIFN α (%)	37.7	37.0
エンザイムノアッセイ	総量(ng/ml)	107.0	173000
	nIFN α 2(ng/ml)	64.5	117000
	nIFN α 8(ng/ml)	42.5	56000
	nIFN α 8/総ヒトnIFN α (%)	39.7	32.4

* 1: 抗IFN α 8抗体による中和後の活性

* 2: 総IFN α 活性 - 抗IFN α 8抗体による中和後の活性

【0053】

表6から明らかのように、BALL-1培養上清に含まれるヒトnIFN α は、バイオアッセイでは総ヒトIFN α 活性の約38%がnIFN α 8と計算された。また、同じ培養上清を、nIFN α 2及びnIFN α 8に特異的なエンザイムノアッセイで測定した場合は、総ヒトIFN α 活性の約40%がnIFN α 8と計算された。また、BALL-1培養上清を抗体カラムで精製した標品では、バイオアッセイでは総ヒトIFN α 活性の約37%がIFN α 8と計算された。また、同じ培養上清を、nIFN α 2及びnIFN α 8に特異的なエンザイムノアッセイで測定した場合も、総ヒトIFN α 活性の約32%がnIFN α 8と計算された。このエンザイムノアッセイに基づく、総ヒトIFN α 活性に占めるIFN α 8活性の割合(%)は、バイオアッセイによる活性測定の誤差を勘案すると、文献値や今回のバイオアッセイの結果とよく一致していると判断した。また、表には示していないものの、市販の抗体カラム(NK2-セファロースカラム)で精製した標品(抗体カラム精製ヒトnIFN α)の蛋白質量を、ブラッドフォード法により測定したところ、 $184.9 \mu\text{g/ml}$ となっており、エンザイムノアッセイの結果から計算したnIFN α 2とnIFN α 8との合計の蛋白質量 $173 \mu\text{g/ml}$ ともほぼ一致した。これら結果は、本発明のモノクローナル抗体を使用したエンザイムノアッセイ系は、IFN α 8蛋白質量を特異的に、かつ、バイオアッセイとの相関もよく測定できることを物語っている。

【実施例9】

【0054】

<ヒトnIFN α (BALL-1細胞由来)及びnIFN α 8の変異蛋白質の薬物動態>
 ヒトnIFN α (nIFN α 2を $6.46 \mu\text{g}$ 、nIFN α 8を $1.81 \mu\text{g}$ 含有)、実施例6で使用したIFN α 8-MUT2($5.83 \mu\text{g}$ 含有)又はIFN α 8-MUT3($5.38 \mu\text{g}$ 含有)を、各々4匹のBALB/cマウス(株式会社日本チャールスリバー販売、メス、9週齢)に、約 10^6 IU/匹で皮下投与した。投与後、経時的(0、0.5、1、2、3、6、24時間)に尾静脈から血液をサンプリングし、遠心後得られた血漿を、実施例8で使用したのと同じIFN α 2、IFN α 8特異的なエンザイムイ

10

20

30

40

50

ムノアッセイに供した。測定結果に基づき、IFN α 8又はその変異蛋白質を投与したときの各マウスにおけるAUC（血中濃度-時間曲線下面積）、MRT（平均滞留時間）、Cmax（最高血中濃度）、Tmax（最高血中濃度到達時間）及びEBA（生物学的利用率）を求め、各IFN標品を投与した4匹のマウスの平均を求めて表7に示す。なお、測定は1試料につき3ウェルを使用し、その平均を求めた。

【0055】

【表7】

ヒトIFN α の種類 サブタイプの種類	ヒトnIFN α		IFN α 8-MUT2	IFN α 8-MUT3
	nIFN α 2	nIFN α 8		
投与量 (ng)	6460	1810	5830	5380
AUC (ng・時間/ml)	553	1975	917	562
MRT (時間)	2.4	3.9	2.2	2.0
Cmax (ng/ml)	188	313	311	212
Tmax (時間)	1	1	0.8	0
EBA (%)	8.6	109	15.7	10.4

10

20

【0056】

表7から明らかのように、ヒトnIFN α に含まれているnIFN α 8はnIFN α 2の3分の1にも満たないものの、ヒトnIFN α をマウスの皮下に投与した場合、nIFN α 8はnIFN α 2に比べて、薬動学的定数であるAUCでは3.6倍（ $\div 553$ ）、MRTでは1.7倍（ $\div 2.4$ ）高かった。また、IFN α 8変異蛋白質の血中動態は、MRTやEBAから見るとnIFN α 8よりもむしろnIFN α 2に似ていることが判明した。これらの結果は、本発明のIFN α 8に特異的なエンザイム免疫アッセイ系が、IFN α 8やその変異蛋白質の体内動態、分布排泄等の生体内での挙動をモニターするために、バイオアッセイよりも適したアッセイ方法であることを物語っている。

30

【実施例10】

【0057】

<免疫アフィニティークロマトグラフィー用ゲルの調製>

実施例4の方法により得た α 8 # 139 mAbの精製品を80mgとり、0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M硼酸緩衝液（pH 8.5）に対して4℃で一晩透析した。水不溶性担体（ジーイーヘルスケア バイオサイエンス社販売、商品名「CNBr-活性化セファロース4B」）4gを1mM塩酸水溶液中で膨潤させ、新鮮な1mM塩酸水溶液、0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M硼酸緩衝液（pH 8.5）の順序で洗浄した後、上記のモノクローナル抗体水溶液約10mlを加え、室温下で2時間、4℃でさらに一晩緩やかに攪拌した。その後、ゲルを1Mエタノールアミン水溶液（pH 8.0）で洗浄し、さらに、0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M硼酸緩衝液（pH 8.5）及び0.5M塩化ナトリウムを含む0.1M酢酸緩衝液（pH 4.0）をこの順序で用いて洗浄する工程を5回繰返し、最後にPBSで洗浄して免疫アフィニティークロマトグラフィー用ゲルを得た。常法により分析したところ、ゲル1ml当たり、約6mgのモノクローナル抗体 α 8 # 139 mAbが結合していた。

40

【実施例11】

50

【0058】

<イムノアフィニティークロマトグラフィーによるnIFN α 8の精製>

実施例10で得たイムノアフィニティークロマトグラフィー用ゲル10mlをプラスチック製円筒管内部にカラム状に充填し、PBSで洗浄後、特許第112301号公報に記載された方法により、免疫抑制したハムスターに移植して増殖させたBALL-1細胞に、HVJを加えて産生させたヒトnIFN α を約0.1mg/ml含む画分40mlを負荷した。新鮮なPBSで洗浄した後、カラムに、0.3MのNaClを含む0.1Mクエン酸緩衝液(pH1.9)を通液し、抗ウイルス活性のある画分を採取した。採取した画分をプールし、濃縮後、蛋白質含量を測定したところ、純度99.8%以上の精製蛋白質が得られたことが判明した。また、この精製蛋白質を、実施例8で使用したIFN α 2或いはIFN α 8特異的なエンザイムイムノアッセイに供したところ、IFN α 2蛋白質は10
 検出されず、IFN α 8のみが検出された。その蛋白質量は、nIFN α 8の比活性を勘案すると、当該精製蛋白質の抗ウイルス活性とよく一致しており、また、カラムに負荷したヒトnIFN α に含まれているnIFN α 8のほぼ全量が回収されていたので、当該抗体カラムがIFN α 8精製用に好適なことが判明した。

【実施例12】

【0059】

< α 8#139の産生するモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖可変部領域のcDNA断片クローニングと塩基配列の同定>

ハイブリドーマ α 8#139(独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11081)の産生するモノクローナル抗体 α 8#139
 mA bの重鎖及び軽鎖可変部を含む領域のcDNA断片のクローニングと塩基配列(アミノ酸配列を含む)の同定を以下のようにおこなった。20

【0060】

<RNAの抽出>

α 8#139を常法により培養して、約 3×10^6 個の細胞を調製した。市販のRNA調製キット(QIAGEN社販売、商品名「RNeasy Mini Kit (Cat. No. 74104)」)

を用いてその取扱説明書中の「遠心法を用いた動物細胞からのトータルRNA精製」に従って、細胞のホモジネートからRNAを抽出して、30乃至60 μ gのRNAを得た。な
 お、細胞のホモジネートの調製には、市販のカラム(QIAGEN社販売、商品名「QIAshredder Spin Column」)を使用し、その際DNAase I処理は行わなかった。30

【0061】

<逆転写酵素反応及びPCR反応>

逆転写酵素反応及びPCR反応は、市販のキットを使用した(Invitrogen社販売、商品名「SuperScript III逆転写酵素(カタログ番号18080-044)」)を用いて、その取扱説明書「First Strand cDNA Synthesis」に従って、市販のoligo(dT)₁₂₋₁₈(Invitrogen社販売、カタログ番号18418-012)をプライマーとして逆転写酵素反応を実施した。40
 得られたcDNAを鋳型として、市販のMouse Ig-Primerセット(Novagen社販売、カタログ番号#69831-3)をプライマーとして、PCR反応を行った。DNAポリメラーゼは、市販品(TOYOBO社販売、商品名「KOD-Plus(カタログ番号KOD-201)」、以下、「KODキット」という)を使用した。また、このKODキットで増幅ができなかった場合には、タカラバイオ社販売、商品名「TaKaRa Ex Taq (code RR001A)」、以下、「Ex Taqキット」という。)を使用した。なお、Mouse Ig-Primerセットのうち、 α 8#139mA bの重鎖可変部領域のDNA増幅には、5'プライマーとして6本のプライマー「MuIgGV_H 5' A~F」と、3'プライマーとして1本のプライマー「MuIgGV_H 3'-2」を用いた組み合わせでPCRを行った。 α 8#139mA bの軽鎖 50

可変部領域の増幅には、5'プライマーとして7本のプライマー「M u I g κ V_H 5' A ~G」と3'プライマーとして1本のプライマー「M u I g κ V_L 3' -1」を使用した。なお、5'プライマーは何れも、開始コドンを含む塩基配列を含むものを使用した。以下に、KODキットとEx Taqキット使用時の反応条件を示す。

【0062】

<KODキットの反応条件>

KOD-Plus- (1U/μl)	0.5 μl	
10×PCR Buffer	2.5 μl	
25mM MgSO ₄	1 μl	
2mM dNTPs	2.5 μl	10
逆転写酵素反応後鑄型	1 μl	
5'プライマー:		
5' A and B プライマーの場合	12.5 pmol	
或いは、		
5' C-G プライマーの場合	5 pmol	
3' プライマー	2.5 pmol	

適量の蒸留水を加えて全量を25 μl / チューブとする。

このチューブを、94℃ 2分処理後、94℃、15秒、処理温度*、30秒、68℃ 1分の3つの温度サイクルで、30乃至40回繰り返し処理し、4℃に冷却する。
処理温度* : 5' A and B Leaderプライマーは50℃、5' C-G Leaderプライマーは60℃で行った。

<Ex Taqキットの反応条件>

Ex Taq (5U/μl)	0.25 μl	
10×Ex Taq PCR Buffer	5 μl	
2.5mM dNTPs	4 μl	
逆転写酵素反応後鑄型	1 μl	
5'プライマー:		
5' A and B プライマーの場合	25 pmol	30
或いは、		
5' C-G プライマーの場合	10 pmol	
3' プライマー	5 pmol	

適量の蒸留水を加えて全量を50 μl / チューブとする。

このチューブを、94℃、1分、処理温度*、1分、72℃、1分の3つの温度サイクルで、30乃至35回繰り返し処理し、4℃に冷却する。
処理温度* : 5' A and B Leaderプライマーは50℃、5' C-G Leaderプライマーは60℃で行った。

【0063】

<DNA断片調製>

上記の重鎖及び軽鎖可変部領域のDNAを増幅したPCR反応液を、各々アガロースゲル電気泳動に供し、約500bpのDNA増幅断片を含むゲルから、市販のキット(QIAGEN社販売、商品名「QIAEX II Gel Extraction Kit」)を使用して、その取扱説明書の「QIAEX II Agarose Gel Extraction Protocol」、或いは、市販のキット(Stratagene社販売、商品名「PCR-Script Cam Cloning Kit (#211192)」に含まれる「StrataPrep PCR Purification Kit」)を使用して、その取扱説明書の「Purifying the PCR Products with the StrataPrep PCR Purification Kit」に従って、PCR後の反応液からPCR増幅断片を精製した。また、Ex Taqキットで増幅したDNA断片は、Stratagene社のPCR-Script

Cam Cloning Kitの操作方法「Polishing the Purified PCR Products」に従ってDNA断片の末端の平滑化を行った。

【0064】

<形質転換及びスクリーニング>

得られた精製DNA断片は、Stratagene社のPCR-Script Cam Cloning Kit (#211192) を用いて pPCR-Script Cam SK (+) Vectorにライゲートし、同キットのコンピテントセルXL10-Goldをトランスフォームした。続いてX-gal、クロラムフェニコール、IPTG含有プレートに播種後、白いコロニーをピックアップし、コロニーダイレクトPCR法により、目的とするサイズのインサートを含むクローンを選択した。目的とするサイズの断片を含むコロニーの培養液から、市販のプラスミド調製キット (QIAGEN社販売、商品名「QIAprep spin Miniprep Kit (Cat No. 27106)」) を用いてプラスミドを調製した。以下に、コロニーダイレクトPCR法の反応条件を示す。

10

【0065】

<コロニーダイレクトPCR反応条件>

Ex Taq (5U/μl)	0.05 μl	
10×Ex Taq PCR Buffer	1 μl	
2.5mM dNTPs	0.8 μl	
T3 プライマー	10 ng	20
T7 プライマー	10 ng	

蒸留水を加えて全量を10 μl / チューブとする。

チップでついたコロニーのレプリカをとり、チューブの反応液に混ぜる。

このチューブを、94℃、1分、55℃、1分、72℃、1分の3つ温度サイクルで、30乃至35回繰り返し処理し、4℃に冷却する。

<シーケンス>

DNAの塩基配列は、DNA自動シーケンサー (BECKMAN COULTER社販売、商品名「CEQ8000」) を用い、ベクターのT3プライマー (5' AATTAACCTCACTAAAGGG 3' : 配列表における配列番号1)、T7プライマー (5' GTAATACGACTCACTATAGGGC 3' : 配列表における配列番号2) を用いて双方向よりシーケンシング反応を行い、重鎖可変部領域をコードするDNAを含むクローン3個及び軽鎖可変部領域をコードするDNAを含むクローン3個を得て、そのDNAの塩基配列を決定した。重鎖可変部領域をコードするDNAを含むクローン3個のうち2個のクローンは配列表における配列番号3で示される塩基配列を、残りの1クローンは配列表における配列番号4で示される塩基配列を有していた。また、軽鎖可変部領域の配列を含む3個のクローンは、いずれも配列表における配列番号5で示される塩基配列を有していた。

30

【0066】

<アミノ酸配列>

上記3個のDNAの塩基配列に基づき、クローニングに使用した5' プライマー部分のアミノ酸配列に続く、α8#139mA bの重鎖及び軽鎖の可変部領域を含むアミノ酸配列を推定した結果を、各々、配列表における配列番号6乃至8で示されるアミノ酸配列に示す。また、既知の重鎖及び軽鎖の不変領域のアミノ末端のアミノ酸配列に基づき、重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端のアミノ酸を決定し、α8#139mA bの重鎖及び軽鎖の可変部領域のアミノ酸配列を決定して、各々配列表における配列番号9乃至11で示されるアミノ酸配列に示す。配列表における配列番号10で示されるアミノ酸配列は、配列表における配列番号9で示されるアミノ酸配列のうち、アミノ末端から37番目のフェニルアラニン (Phe) がイソロイシン (Ile) で、79番目のイソロイシン (Ile) がスレオニン (Thr) で置換された配列を有していた。得られたクローンの数からすると、α8#139mA bの重鎖可変部位のアミノ酸配列は、配列表における配列番号9で示

40

50

されるアミノ酸配列を有し、一部の抗体は、配列表における配列番号10で示されるアミノ酸配列を有していることを物語っている。

【実施例13】

【0067】

<α8Y36-2の産生するモノクローナル抗体の重鎖及び軽鎖可変部領域のcDNA断片クローニングと塩基配列の同定>

ハイブリドーマα8Y36-2（独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11082）の産生するモノクローナル抗体α8Y36-2mAbの重鎖及び軽鎖可変部領域のcDNA断片のクローニングと塩基配列（アミノ酸配列を含む）の同定を、以下のようにおこなった。即ち、α8Y36-2を常法により培養して、約 3×10^6 個の細胞を調製した。RNAの抽出以降の操作は、実施例12と同一の方法で行った。重鎖の可変部領域をコードするDNAを含むクローン3個及び軽鎖可変部領域をコードするDNAを含むクローン2個を得て、そのDNAの塩基配列を決定した。重鎖の可変部領域をコードするDNAを含むクローン3個のうちの2クローンは配列表における配列番号12で示される塩基配列を、残りの1クローンは配列表における配列番号13で示される塩基配列を有していた。また、軽鎖可変部領域の配列を含む2個のクローンは、いずれも配列表における配列番号14で示される塩基配列を有していた。

【0068】

<アミノ酸配列>

上記3個のDNAの塩基配列に基づき、クローニングに使用した5'プライマー部分のアミノ酸配列に続く、α8Y36-2mAbの重鎖及び軽鎖の可変部領域を含むアミノ酸配列を推定した結果を、各々、配列表における配列番号15乃至17で示されるアミノ酸配列に示す。また、既知の重鎖及び軽鎖の不変領域のアミノ末端のアミノ酸配列に基づき、重鎖及び軽鎖のカルボキシ末端のアミノ酸を決定し、α8Y36-2mAbの重鎖及び軽鎖の可変部領域のアミノ酸配列を決定して、各々配列表における配列番号18乃至20で示されるアミノ酸配列に示す。配列表における配列番号19で示されるアミノ酸配列は、配列表における配列番号18で示されるアミノ酸配列のうちの、アミノ末端から19番目のグリシン（Gly）がアスパラギン酸（Asp）で置換された配列を有していた。得られたクローンの数からすると、α8Y36-2mAbの重鎖可変部位のアミノ酸配列は、配列表における配列番号18で示されるアミノ酸配列を有し、一部の抗体は、配列表における配列番号19で示されるアミノ酸配列を有していることを物語っている。

【0069】

また、実施例12及び13の結果は、α8#139mAb及びα8Y36-2mAbの重鎖及び軽鎖の可変部位のDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を利用して、そのまま、その部分配列を利用して、或いは、それらのアミノ酸の1乃至100個程度を、欠失、付加、置換するなどにして、組み換え体を調製し、ヒトIFNα8及びその変異蛋白を特異的に認識する、IFNα8の定量・定性、IFNα8の精製、さらには、IFNα8の関与する疾患治療剤、臨床診断薬などとして使用するキメラ抗体、ヒト化抗体、或いは、ヒト抗体を公知の方法（例えば、特開2004-533217号公報や特開2007-252372号公報）により調製することも有利に実施できることを物語っている。

【0070】

さらに、実施例12及び13で得られたα8#139mAb及びα8Y36-2mAbの重鎖及び軽鎖の可変部位のアミノ酸配列を基に、カバット（Kabatt）等の方法（NIH出版、No. 91-3242、第I巻、647乃至669頁（1991年）参照）により、α8#139mAb及びα8Y36-2mAbの重鎖及び軽鎖の可変部位中に各々3箇所存在する、超可変部位のアミノ酸配列を決定した。α8#139mAbの重鎖の超可変部位は、各々配列表における配列番号21乃至23で示されるアミノ酸配列であり、軽鎖の超可変部位は、各々配列表における配列番号24乃至26で示されるアミノ酸配列であることが判明した。また、α8Y36-2mAb重鎖及び軽鎖の超可変部位は、各々配列表における配列番号27乃至29で示されるアミノ酸配列であり、軽鎖の超可変部位

は、各々配列表における配列番号30乃至32で示されるアミノ酸配列であることが判明した。この結果は、 $\alpha 8 \# 139 \text{mA b}$ 及び $\alpha 8 \text{Y}36-2 \text{mA b}$ の重鎖及び軽鎖のもつ、その抗体の特異性を規定する超可変部位のDNAの塩基配列及びアミノ酸配列を利用して、それらのアミノ酸配列に、1乃至100個程度のアミノ酸を付加して、さらには、超可変部位のアミノ酸を適宜、欠失、付加、置換して、組み換え体を調製し、ヒトIFN $\alpha 8$ 及びその変異蛋白を特異的に認識する、IFN $\alpha 8$ の定量・定性、IFN $\alpha 8$ 精製、さらには、IFN $\alpha 8$ の関与する疾患治療剤、臨床診断薬などとしての使用に適したキメラ抗体、ヒト化抗体、或いは、ヒト抗体を調製することも有利に実施できることを物語っている。

【実施例14】

10

【0071】

<治療剤>

実施例4の方法により調製した9種類のモノクローナル抗体のいずれかを150mg/ml、 α 、 α -トレハロース（株式会社林原生物化学研究所製造、パイロジェンフリー）を140mg/ml、L-塩酸ヒスチジンを3.4mg/ml、L-ヒスチジンを2.2mg/ml、及び、ツイーン20を0.6mg/mlとなるように精製水に溶解して、1mlずつバイアル瓶に分注し、常法により、9種類の注射用の凍結乾燥製剤を調製した。本品は、使用時に生理食塩水に溶解して注射剤として使用することができる。本品は、IFN $\alpha 8$ が発症や増悪に関与する各種疾患の治療剤として有用である。これら9種類の乾燥製剤を、各々生理食塩水で溶解し、各製剤を、各々5匹のラット（平均体重123g/匹）に、1日1回、7日間毎日、5ml/匹（モノクローナル抗体として750mg/匹/回）腹腔内投与して、体重を毎日測定した。対照として、5匹のラット（平均体重127g/匹）に、1日1回、7日間毎日、生理食塩水を5ml/匹腹腔内投与して、体重を毎日測定した。各製剤を投与したラットの体重と対照のラットの体重とを比較したところ、何れの製剤を投与した場合にも、対照と差は認められなかった。また、外観的な観察でも、各製剤を投与したラット及び対照のラットに、何ら異常は認められなかった。

20

【実施例15】

【0072】

<治療剤>

実施例12で得た $\alpha 8 \# 139 \text{mA b}$ の重鎖及び軽鎖の可変部位を含む領域をコードする塩基配列（配列表における配列番号3乃至5）及び可変部位のアミノ酸配列（配列表における配列番号9乃至11）に基づき、常法によりヒト化抗体を調製して、純度99.98%以上に精製後、その抗体を200mg/ml、 α 、 α -トレハロース（株式会社林原生物化学研究所製造、パイロジェンフリー）を140mg/ml、L-塩酸ヒスチジンを3.4mg/ml、L-ヒスチジンを2.2mg/ml、及び、ツイーン20を0.6mg/mlとなるように精製水に溶解して、1mlずつバイアル瓶に分注し、常法により、凍結乾燥製剤を調製した。本品は、使用時に生理食塩水に溶解して注射剤として使用することができる。本品は、IFN $\alpha 8$ が発症や増悪に関与する各種疾患の治療剤として有用である。本品を生理食塩水で溶解して、5匹のマウス（平均体重23g/匹）に、1日1回、7日間毎日、0.5ml/匹（モノクローナル抗体として100mg/匹/回）静脈内投与して、体重を毎日測定した。対照として、5匹のマウス（平均体重24g/匹）に、1日1回、7日間毎日、生理食塩水を0.5ml/匹静脈内投与して、体重を毎日測定した。本品を投与したマウスと対照のマウスの体重を比較したところ、差は認められなかった。また、外観的な観察でも、本品を投与したマウス及び対照のマウスに、何ら異常は認められなかった。

30

40

【実施例16】

【0073】

<治療剤>

実施例13で得た $\alpha 8 \text{Y}36-2 \text{mA b}$ の重鎖及び軽鎖の可変部位を含む領域をコードする塩基配列（配列表における配列番号12乃至14）及びそのアミノ酸配列（配列表に

50

おける配列番号18乃至20)に基づき、常法によりヒト化抗体を調製して、純度99.98%以上に精製後、その抗体を200mg/ml、 α , α -トレハロース(株式会社林原生物化学研究所製造、パイロジェンフリー)を140mg/ml、L-塩酸ヒスチジンを3.4mg/ml、L-ヒスチジンを2.2mg/ml、及び、ツイーン20を0.6mg/mlとなるように精製水に溶解して、1mlずつバイアル瓶に分注し、常法により、凍結乾燥製剤を調製した。本品は、使用時に生理食塩水に溶解して注射剤として使用することができる。本品は、IFN α 8が発症や増悪に関与する各種疾患の治療剤として有用である。本品を生理食塩水で溶解して、5匹のマウス(平均体重23g/匹)に、1日1回、7日間毎日、0.5ml/匹(モノクローナル抗体として100mg/匹/回)静脈内投与して、体重を毎日測定した。対照として、5匹のマウス(平均体重23g/匹)に、1日1回、7日間毎日、生理食塩水を0.5ml/匹静脈内投与して、体重を毎日測定した。本品を投与したマウスと対照のマウスの体重を比較したところ、差は認められなかった。また、外観的な観察でも、本品を投与したマウス及び対照のマウスに、何ら異常は認められなかった。

10

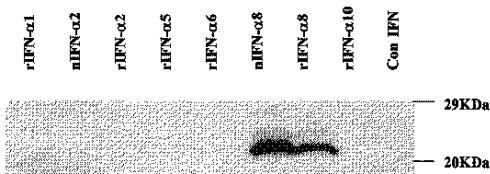
【産業上の利用可能性】

【0074】

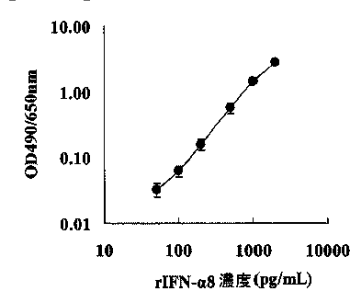
以上説明したごとく、本発明のモノクローナル抗体は、IFN α 8及びその変異蛋白質に特異的に反応する。したがって、本発明のモノクローナル抗体は、斯かるIFN α 8及びその変異蛋白質の検出及び精製などに多種多様の用途を有することとなる。斯くも有用な本発明のモノクローナル抗体は、ハイブリドーマを用いる製造方法などにより、所望量を容易に得ることができる。本発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であるといえる。

20

【図1】



【図2】



【配列表】
2009116491000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2009/055039
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/24(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K16/00-16/46		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed, WPI, G-Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Makoto SATO et al., "Hito Jin Saibo Gan Saibo ni Taisuru Interferon α subtype ni yoru Koshuyo Koka no Chigai", The 94th Japanese Journal of Urology, 2006, Vol.97, No.2, page 417(MP-204)	1-14
Y	EP 915099 A1 (ALFA WASSERMANN S.p.A.), 12 May, 1999 (12.05.99), & IT 1295657 B	1-14
Y	WO 2006/051805 A1 (Hayashibara Biochemical Labs., Inc.), 18 May, 2006 (18.05.06), & EP 1842857 A1	1-14
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 27 March, 2009 (27.03.09)		Date of mailing of the international search report 07 April, 2009 (07.04.09)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/055039

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	VANCOVA, I. et al. The Carboxyterminal Domains of Human IFN- α 2 and IFN- α 8 Are Antigenically Homologous. J. Interferon Cytokine Res., 2000, Vol. 20, No. 5, p. 455-461	1-14
P, X	USHIO, C. et al. Establishment of Antihuman IFN- α 8-Specific Monoclonal Antibodies and Their Application in the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). J. Interferon Cytokine Res., Jun. 2008, Vol. 28, No. 6, p. 359-366	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 5 0 3 9	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. C07K16/24(2006.01)i, C07K1/22(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i, G01N30/88(2006.01)i, G01N33/577(2006.01)i			
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.Cl. C07K16/00-16/46			
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/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamI), PubMed, WPI, G-Search			
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	
Y	佐藤 信他, ヒト腎細胞癌細胞に対するインターフェロン α subtype による抗腫瘍効果の違い, 第94回日本泌尿器科学会雑誌, 2006, Vol. 97, No. 2, p. 417 (MP-204)	1-14	
Y	EP 915099 A1 (ALFA WASSERMANN S.p.A) 1999.5.12 & IT 1295657 B	1-14	
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」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 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献	
国際調査を完了した日 27.03.2009		国際調査報告の発送日 07.04.2009	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 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) 三原 健治	4N 2937
		電話番号 03-3581-1101	内線 3488

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 9 / 0 5 5 0 3 9

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
Y	WO 2006/051805 A1 (株式会社林原生物化学研究所) 2006. 05. 18 & EP 1842857 A1	1-14
A	VANČOVÁ, I. et al. The Carboxyterminal Domains of Human IFN- α 2 and IFN- α 8 Are Antigenically Homologous. J. Interferon Cytokine Res., 2000, Vol. 20, No. 5, p. 455-461	1-14
P, X	USHIO, C. et al. Establishment of Antihuman IFN- α 8-Specific Monoclonal Antibodies and Their Application in the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). J. Interferon Cytokine Res., Jun. 2008, Vol. 28, No. 6, p. 359-366	1-14

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 33/577 (2006.01)	G 0 1 N 33/577	B
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	P

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 太田 恒孝

日本国岡山県岡山市北区下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

(72)発明者 福田 恵温

日本国岡山県岡山市北区下石井1丁目2番3号 株式会社林原生物化学研究所内

Fターム(参考) 4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA01
 4B065 AA91X AA92X AC14 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 AA19 BB17 CC02 DD62 DD63 EE01 GG01
 4H045 AA11 BA10 CA40 DA16 DA76 EA29 EA53 FA72

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】 第3部門第2区分
 【発行日】 平成24年5月24日(2012.5.24)

【国際公開番号】 WO2009/116491
 【年通号数】 公開・登録公報2011-029
 【出願番号】 特願2010-503863(P2010-503863)
 【国際特許分類】

C 0 7 K 16/24 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 C 0 7 K 1/22 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 G 0 1 N 33/577 (2006.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)

【F I】

C 0 7 K 16/24
 C 1 2 P 21/08
 C 0 7 K 1/22
 C 1 2 N 5/00 1 0 2
 A 6 1 K 39/395 N
 G 0 1 N 33/577 B
 G 0 1 N 33/53 P

【手続補正書】
 【提出日】 平成24年3月12日(2012.3.12)
 【手続補正1】
 【補正対象書類名】 特許請求の範囲
 【補正対象項目名】 全文
 【補正方法】 変更
 【補正の内容】
 【特許請求の範囲】
 【請求項1】

ヒトIFN α サブタイプ α 8 (IFN α 8) 及びその変異蛋白質との結合能を有し、ヒトIFN α サブタイプ α 1、 α 2、 α 5、 α 6、 α 10、コンセンサスIFN、ヒトIFN β 、ヒトIFN γ 、マウスIFN α / β 、ラットIFN α 及びヒト腫瘍壊死因子(TNF α)と実質的に結合しないモノクローナル抗体を産生する、ハイブリドーマmAb-IFN α 8#139 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11081) 又はmAb-IFN α 8Y36-2 (独立行政法人産業技術総合研究所 特許生物寄託センター、受託番号FERM BP-11082)。

【請求項2】

請求項1に記載のハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体か、該モノクローナル抗体の抗原結合部位と相同の結合部位を有するモノクローナル抗体。

【請求項3】

ヒトIFN α 8及びその変異蛋白質の抗ウイルス活性に対する中和能を有する請求項2に記載のモノクローナル抗体。

【請求項4】

ヒトIFN α 8及びその変異蛋白質に特異的な定量方法であって、請求項2又は3に記載のモノクローナル抗体を用いる定量方法。

【請求項5】

ヒトIFN α 8及びその変異蛋白質に特異的な精製方法であって、請求項2乃至4のいずれかに記載のモノクローナル抗体を担体に固定化した抗体カラムを使用する工程を含む精製方法。

【請求項6】

請求項2乃至5のいずれかに記載のモノクローナル抗体又はその抗原認識部位を有する断片を含む医薬組成物又は臨床診断薬。

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JPWO2009116491A5	公开(公告)日	2012-05-24
申请号	JP2010503863	申请日	2009-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社林原生物化学研究所		
申请(专利权)人(译)	株式会社林原生物化学研究所		
[标]发明人	牛尾知惠 有安晴美 栢野徹 有安利夫 太田恒孝 福田惠温		
发明人	牛尾 知惠 有安 晴美 栢野 徹 有安 利夫 太田 恒孝 福田 惠温		
IPC分类号	C07K16/24 C12P21/08 C07K1/22 C12N5/10 A61K39/395 G01N33/577 G01N33/53		
CPC分类号	C07K16/249 A61K2039/505 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/76 G01N33/6866 G01N2030/8831		
FI分类号	C07K16/24 C12P21/08 C07K1/22 C12N5/00.102 A61K39/395.N G01N33/577.B G01N33/53.P		
F-TERM分类号	4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AA92X 4B065/AC14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/AA19 4C085/BB17 4C085/CC02 4C085/DD62 4C085/DD63 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA16 4H045/DA76 4H045/EA29 4H045/EA53 4H045/FA72		
优先权	2008072729 2008-03-21 JP 2008149916 2008-06-06 JP		
其他公开文献	JPWO2009116491A1		

摘要(译)

本发明提供了对干扰素 α 亚型 $\alpha 8$ (下文中称为IFN $\alpha 8$)及其突变蛋白具有特异性的单克隆抗体,提供了能够产生该抗体的杂交瘤,以及由该抗体产生的IFN $\alpha 8$ 及其突变蛋白。为了提供一种检测方法,提供一种通过抗体纯化IFN $\alpha 8$ 及其突变蛋白的方法,并提供一种用于治疗以该抗体为有效成分的IFN $\alpha 8$ 的发作或恶化的各种疾病的治疗剂。要做。对IFN $\alpha 8$ 及其突变蛋白具有特异性的单克隆抗体,能够产生该抗体的杂交瘤,使用该抗体通过免疫反应检测IFN $\alpha 8$ 及其突变蛋白的方法,使用该抗体纯化IFN $\alpha 8$ 或其突变蛋白的方法 并提供针对各种疾病的治疗剂,其中包含抗体作为有效成分的IFN $\alpha 8$ 参与了发作或恶化。