

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4605973号
(P4605973)

(45) 発行日 平成23年1月5日(2011.1.5)

(24) 登録日 平成22年10月15日(2010.10.15)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N 15/00
C 07 K 16/42	(2006.01)	C 07 K 16/42
C 07 K 16/46	(2006.01)	C 07 K 16/46
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K 39/395
A 61 P 37/08	(2006.01)	A 61 P 37/08

請求項の数 14 (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2001-557921 (P2001-557921)
(86) (22) 出願日	平成13年1月30日 (2001.1.30)
(65) 公表番号	特表2003-521916 (P2003-521916A)
(43) 公表日	平成15年7月22日 (2003.7.22)
(86) 國際出願番号	PCT/US2001/002924
(87) 國際公開番号	W02001/057090
(87) 國際公開日	平成13年8月9日 (2001.8.9)
審査請求日	平成20年1月30日 (2008.1.30)
(31) 優先権主張番号	60/179,629
(32) 優先日	平成12年2月1日 (2000.2.1)
(33) 優先権主張国	米国(US)
(31) 優先権主張番号	09/592,998
(32) 優先日	平成12年6月12日 (2000.6.12)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	300004500 アイデックス ラボラトリーズ インコーポレイテッド アメリカ合衆国 メイン州 ウエストブルック アイデックス ドライブ ワン
(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 葉
(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(72) 発明者	ロバート・エル・ロートン アメリカ合衆国O 4 9 3 8 メイン州ゴーラム、バーナム・ロード3番
(72) 発明者	アショク・ピー・アイヤッパ アメリカ合衆国O 4 0 7 4 メイン州スカーバーロウ、バーチウッド・サークル4番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】イヌのアレルギー治療用の組換えキメラ抗-IgEモノクローナル抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号3からなる重鎖DNA配列および配列番号4からなる軽鎖DNA配列によってコードされる、イヌIgEに特異的に結合するキメラマウス/イヌモノクローナル抗体。

【請求項2】

抗体が、イヌIgEのエキソン3に対してアフィニティーを有する、請求項1記載の抗体。

【請求項3】

抗体が、遊離イヌIgEおよびB細胞に結合したIgEに結合する、請求項1記載の抗体。

10

【請求項4】

抗体が、IgEの別の受容体への結合を阻害し、別の受容体がB細胞、肥満細胞または好塩基球上にある、請求項1記載の抗体。

【請求項5】

イヌのアレルギーの治療方法であって、請求項1記載の抗体をイヌに投与することを含む、方法。

【請求項6】

抗体の投与が、治療を受けたイヌにおいて血清IgEレベルの低下をもたらす、請求項5記載の方法。

【請求項7】

20

抗体の投与が、B細胞に対するIgEの結合、次いで、B細胞のクローン集団の排除をもたらす、請求項5記載の方法。

【請求項8】

抗体の投与が、請求項1記載の抗体と血漿中の可溶性IgEとの結合をもたらす、請求項5記載の方法。

【請求項9】

抗体の投与が、イヌにおいてIgE産生の阻害をもたらす、請求項5記載の方法。

【請求項10】

血清IgEレベルの低下が、IgEとIgEに対する受容体との相互作用の阻害または遮断によってもたらされる、請求項6記載の方法。

10

【請求項11】

IgEに対する受容体が、肥満細胞または好塩基球上にある、請求項10記載の方法。

【請求項12】

治療上有効な量の請求項1記載の抗体を含む医薬製剤。

【請求項13】

セイラインまたは他の非経口用溶液、緩衝化剤、安定化剤、增量剤、酸化防止剤および共溶媒からなる群より選択される1種または複数の成分をさらに含む、請求項12記載の医薬製剤。

【請求項14】

静脈内投与、皮下投与および筋肉内投与による投与に適している形態における、請求項12記載の医薬製剤。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

本願は2000年2月1日付け出願の米国出願番号60/179629の一部継続出願である。

(技術分野)

本発明はイヌにおけるIgEレベルを減少させ、アレルギー症状を緩和するための組成物および方法を提供する。該組成物はキメライヌ抗-IgEmAbを含み、該方法はイヌにおけるアレルギーを治療するのに有用である。

【0002】

30

(背景技術)

すべてのイヌの30%までもがアレルギーまたはアレルギー関連の皮膚障害に罹患していると予測される。具体的には、アレルギー性皮膚炎はイヌ全体の3ないし15%に影響を与えると予測される。イヌにおけるアレルギーの蔓延に鑑みて、イヌのアレルギーを適切に診断し、治療する方法および組成物を開発する必要がある。

アレルギー反応の原因となる可能性が最も高い物質は種によって変わる。通常のイヌのアレルゲンは、ノミ、花粉、カビおよび埃を包含する。ノミに対するアレルギーが最も一般的なイヌのアレルギーであると考えられる。典型的には、ノミの唾液がアレルゲンであり、ノミが一回噛むだけで実質的にカユミが生じ得る。イヌにおけるアレルギーのさらなる形態はアトピーと称される。アトピーはイヌが花粉、カビまたはハウスダスト中に見られる微視的なダニなどの吸入物に対してアレルギー性であるところの症状である。イヌのアレルギーを治療する最近の方法は、望ましくない副作用を引き起こすステロイドを使用すること、または各型のアレルギーに対して異なる処理を必要とするアレルゲン介在の脱感作操作を使用することに焦点が当てられることが多い。

40

【0003】

動物において、抗体分子はIgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMなどの種々のイソタイプに分類される。抗体分子は長および短鎖成分からなる。所定のイソタイプの分子の長鎖は、アミノ酸配列が相同的の長い領域と、逆に他のイソタイプに属する抗体とは異なる領域とを有する。長鎖の割り当てられた領域は、特定の細胞表面受容体に、または補体などの他の巨大分子に結合して、したがって、個々の免疫エフェクター機能を活性化する

50

共通の能力を各イソタイプのメンバーに提供する。かくして、抗体分子のイソタイプへの分離はまた、それらが共通して活性化する一連のエフェクター機能に従って抗体を分離することにも役立つ。ヒトおよびイヌにおいて、イムノグロブリンE (IgE) がアレルギーに関与しており、即時過敏性反応における抗原を認識する。

【0004】

さらには、IgEは、哺乳動物にて、I型即時過敏症を含む、アレルギー応答の重要な媒介物質であると考えられている抗体型である。IgEは肥満細胞などの伝達物質細胞上の受容体に結合する。この結合はIgE分子のFc領域が肥満細胞上のFc受容体に結合すると起こる。ついで、かかる細胞と結合したIgE抗体がアレルゲンに結合すると、このアレルゲンにより複数のIgE抗体が肥満細胞表面に架橋する。この架橋がI型即時過敏性反応を媒介し、アレルギーと関連する症状を引き起こすヒスタミンおよび他の分子の放出を引き起こす。

ヒトにおいて、血清中のIgE全体のレベルはアレルギー疾患の診断手段である。IgEの血清レベルがイヌにおいてもアレルギーの診断手段であり得る可能性を探るため、デボアおよびヒル (DeBoerおよびHill) はさらなる研究を行った (HillおよびDeBoer, Am.J.Vet.Res. 55 (7) : 944 - 48 (1994))。彼らは以下の構成 (D9を基質に結合させ、抗体をD9で捕獲させ、ついでマーカーを有するD9を用いて捕獲した抗体に印を付ける) のエライザアッセイにてモノクローナル抗体 ('mAb') D9を用いた。

【0005】

ヒルおよびデボアのエライザを用い、イヌのアレルギーを診断するための努力においてイヌ血清中のIgEの総量を確立した。しかし、IgEの定量はイヌにおけるアレルギーを診断するのに有用でないことが見出された (例えば、ヒルおよびデボアの要約および考察のセクションを参照のこと)。この知見はヒト免疫学における状況とは正反対であった。この結果は異なる2種類の動物の間のデータを相關させる試みが難しいことを指摘している。

この困難性はイヌがヒトよりも一連の異なる抗原に対してアレルギー的であり得るという事実によってさらに具現化される。例えば、ノミに対するアレルギーはイヌでは大きな問題であるが、ヒトではそうではない。さらには、イヌおよびヒトが同じアレルゲン抽出物に対してアレルギー作用性であることが明らかな場合に、グリール研究所 (Greer Laboratories) (Lenoir, NC) のエシュおよびグリール (EschおよびGreer) 博士による研究で、イヌの疾患を発症するアレルゲン抽出物中の特異的アレルゲンがヒトにおいて疾患を発症するアレルゲンと必ずしも同じである必要がないことを示した。例えば、チリダニ抽出物の免疫優勢成分がイヌとヒトとでは異なることが知られている。

【0006】

アレルギー機構および応答の種交差実験の困難性に加えて、イヌのアレルギーは主に皮膚で発症するのに対して、ヒトは主に呼吸器系にてアレルギー症状を示す。加えて、好酸球はヒトにおいてアレルギーと相關するが、イヌでは相關しない。

生理学的症状を治療するために医薬組成物の投与を考慮するにおいて、組換えまたはキメラ分子を動物にインピボにて投与した場合、それらはその動物から速やかに一掃される。組換え体を動物に投与する場合、組換え分子の半減期を長くするために組換えIgG分子が用いられた。例えば、カポン・ディ (Capon, D.) 、チャモウ・エス (Chamow, S.) ら、「Designing CD4 Immunoadhesins」Nature 337 : 525 (1989) ; バイルン・アール (Byrn, R.) 、モルデンチ・シー (Mordenti, C.) ら、「Biological Properties of a CD4 Immunoadhesin」Nature 344 : 667 (1990) ; ハーク・フレンドスコ・エム (Haak-Frendscho M.) 、リドウェイ・ジェイ (Ridgway, J.) ら、「Human IgE Receptor Alpha-Chain IgG Chimera Blocks Passive Cutaneous Anaphylaxis Reaction in vitro」Journal of Immunology 151 : 351 - 53 (1993) ; 米国特許第5116964号 (1992年5月26日発行; カポン・ディ・ジェイ (Capon, D.J.) ら、発明の名称「ハイブリッド・イムノグロブリン」) を参照のこと。

【0007】

10

20

30

40

50

一般に、IgGはヒトにおいて血清半減期の長いイソタイプのイムノグロブリンであると了承されている。イヌにおいて、半減期の長いイソタイプは知られていない。少なくとも2本の、あるいは4本すべての長鎖イヌIgGイムノグロブリン配列のエキソン1および3の一部に対応すると考えられている配列が米国特許第5593861号(マエダ(Maeda)ら)に報告されているが、これら長鎖配列のいずれがイヌの半減期の長いIgG構造の部分であるかわかっていない。

IgEレベルはアレルギー疾患を経験しているヒト患者では高く、IgEはアレルギー症状を媒介すると考えられる。イヌにおいて、血清IgEのレベルはアレルギー疾患と相関していないが、それにも拘わらず、アレルギー症状を軽減するための機構としてIgEレベルを減少させることが望ましい。

さらには、通常の組成物および方法の欠点を回避し、さらにイヌのアレルギーに対して効果的な治療活性を付与する、イヌのアレルギーの治療用組成物および方法に対する要求もある。

【0008】

(発明の開示)

本発明の一の目的は、イヌのアレルギーの治療用の組成物および方法であって、ステロイド処理で経験するよりも副作用が実質的に少ない、組成物および方法を提供することである。

本発明のもう一つ別の目的は、アレルゲンの型とは関係なく効果的であるイヌのアレルギー症状を軽減するための治療用組成物および方法であって、その処理が特異的アレルゲンよりもアレルギー応答の存在を基礎とする、組成物および方法を提供することである。

本発明のもう一つ別の目的はIgE合成を標的とすることによりイヌのアレルギー症状を軽減するための治療用組成物および方法を提供することである。

これらおよび他の目的は、以下の開示および添付したクレームから当業者に明らかであろう。

【0009】

本発明はイヌのアレルギーを治療するための組成物および方法に関する。さらに詳細には、本発明はイヌに投与するための方法および組成物であって、遊離した血清IgEが組成物と結合することで、このIgEが肥満細胞および好塩基球上にある高アフィニティー性のIgE受容体への結合を阻害するように、実質的にイヌのイムノグロブリンE分子に結合する組成物を提供する。その提供される組成物および方法は遊離した血清IgEのレベルを排除または減少させることができる。遊離した血清IgEレベルが低いほど、好塩基球および肥満細胞上にある高アフィニティー性IgE受容体の合成および発現をダウンリギュレートさせることができる。その結果として遊離したおよび/または全体としての血清IgEが減少または排除され、皮膚の肥満細胞上のアレルゲンに対するIgE応答が減少または排除される。「遊離した血清IgE」とは、高アフィニティー性IgE受容体に結合することができるIgEであって、血清中の結合していないIgEを意味する。

【0010】

本発明者らは、検出可能な遊離したおよび/または全体としての血清IgEの排除を7日間、あるいはさらに短期間維持することで、IgEの合成を抑制しつづける、負のフィードバック-ループが得られることを明らかにした。IgE合成の抑制を維持することでアレルゲンに対する皮膚応答の排除が得られるであろう。

好ましい具体例において、本発明のキメラ抗-IgE分子の特異性および構造をIgE+B細胞に直接標的化させることができる。この結合は成熟B細胞の負の刺激を介するか、またはアポトーシスもしくは補体介在溶菌によりB細胞を破壊するかのいずれかによりIgE合成の減少または排除を得ることができる。

【0011】

したがって、本発明は、キメラを含み、イヌIgEに特異的に結合するIgE受容体分子を含む。その受容体分子は抗体分子、好ましくはモノクローナル抗体(「mAb」)であつてもよく、そのmAbはイヌIgEのエキソン3に対してアフィニティーを有すること

が好ましい。キメラはイヌおよびマウスのイムノグロブリンを含むことができる。キメラはさらにマウスの長および短鎖可変領域に融合したイヌの長および短不变ドメインを含むこともできる。本発明の受容体および抗体分子もまた、IgG長鎖配列を含んでいてもよい。

本発明の受容体および抗体分子はIgEが別のIgE受容体に結合することを妨げることができる。その別のIgE受容体は1またはそれ以上の肥満細胞または好塩基球上にあってもよい。本発明の受容体および抗体分子は蛋白、ペプチドまたは他の有機分子からなっていてもよい。

【0012】

本発明はまた、イヌのアレルギーの治療方法であって、本発明のキメラを含み、イヌIgEに特異的に結合する受容体またはモノクローナル抗体をイヌに投与することを特徴とする方法を提供する。本発明の方法は、治療されるイヌの血清IgEレベルの低下をもたらすことができ、あるいはIgEをB細胞に結合させて、つづいてB細胞のクローニング集団を排除することができる。該方法はまた、血漿中の血清IgEの結合をもたらし、あるいは治療されるイヌにおけるIgEの産生の阻害をもたらすことができる。本発明の方法の血清IgEレベルの低下は、IgEと、肥満細胞または好塩基球上にあってもよいIgEについての受容体との間の相互作用の遮断を破壊することにより惹起することもできる。

本発明はさらには、本発明の受容体を治療上有効な量含有する医薬処方を提供する。

【0013】

(発明を実施するための最良の形態)

定義

アフィニティー：リガンドとその受容体の間の、あるいは2つの結合基の間の誘引力または結合力。アフィニティーはまた結合した結合対を平衡状態に保持する。

アミノ酸：リニアーアレイにて結合してポリペプチド、ペプチドまたは蛋白を形成するとのできるアミノ基を含有する有機分子。20種の通常のアミノ酸は、アラニン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、システイン、グルタミン酸、グルタミン、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニルアラニン、プロリン、セリン、トレオニン、トリプトファン、トリプシンおよびバリンである。保守的変種を含む本発明の具体例において、当業者であれば、通常のアミノ酸のいずれも、ならびに列挙されていない他の物も本発明において用いることができるこ理解するであろう。

【0014】

イヌIgE受容体：イヌIgEに対してアフィニティーを示すか、さもなければインビボまたはインビトロにて結果としてイヌの血清からIgEを除去する、本明細書にて限定される組換えまたはキメラ受容体。

cDNAクローニングベクター：クローニングベクター中に保有される、RNAを提示する二重DNA配列。

キメラmAb：少なくとも2種の異なるイヌ免疫グロブリン源からのアミノ酸を含して得られるハイブリッドアミノ酸配列を有するイムノグロブリン分子。一般に、アミノ酸配列は天然では一緒に見られないのが普通である。「mAb」はモノクローナル抗体をいう。

クローニングベクター：宿主細胞にて複製することができ、付加したDNA配列の増幅または発現を目的として外因的に付加されたDNA配列の保持能を有するプラスミド、ファージDNAまたは他のDNA配列。

【0015】

保守的変種：ヌクレオチド配列の保守的変種は、アミノ酸配列の変化をもたらさないヌクレオチド置換、ならびに同類アミノ酸置換またはそのヌクレオチドから翻訳されたポリペプチドの特性に実質的に影響を及ぼさないアミノ酸置換をもたらすヌクレオチド置換を包含する。例えば、置換がペプチドとイヌのIgE受容体またはイヌの他のIgEリガンドとの特異的結合を妨げないならば、ポリペプチド特性は実質的には影響を受けていない。

10

20

30

40

50

アミノ酸配列の保守的変種は、出発ペプチドに関連するポリペプチド変種の特性に実質的に影響を及ぼさないアミノ酸の置換または欠失を包含する。例えば、置換または欠失がペプチド変種の出発ペプチドの特異的結合パートナーへの特異的結合を妨げないならば、ポリペプチド特性は実質的には影響を受けていない。糖鎖形成および他の変種ならびに当業者に明らかであろう誘導体はこの定義に含まれ、本発明の範囲内にあると考えられる。さらに、出発ペプチドに対してポリペプチドの特性に実質的に影響を及ぼさないアミノ酸挿入、置換、欠失および切断もこの定義に含まれる。

【0016】

発現調節配列：構造遺伝子に作動的に連結した場合に、その遺伝子の発現を調節および制御するヌクレオチドのDNA配列を意味する。

10

エキソン：ポリペプチドの一部をコードするDNAの1つの連續領域。いずれかのエキソンに言及すること、例えば「エキソン6のDNA配列」は完全なエキソンまたはその一部をいう。

遊離したIgEまたは血清IgE：IgEまたは他のIgE分子に対してアフィニティーを有する未変性または投与受容体と複合または結合していない、患者において循環しているIgE。

ゲノム：1の物質の全DNA。ゲノムは、とりわけ、その物質のポリペプチドをコードする構造遺伝子ならびにオペレーター、プロモーターおよびシャイン・ダルガーノ配列などのリボソーム結合および相互作用配列を含む。

【0017】

20

特異結合：バックグラウンド結合よりも大きな結合アフィニティーでの1つの物質の別の物質への結合。特異結合を示す2つの物質は特異結合パートナーまたは特異結合対と称される。抗体およびその抗原は特異結合対の一例である。

構造遺伝子：そのテンプレートまたはメッセンジャーRNA（「mRNA」）を介して特定のポリペプチドに特有のアミノ酸の配列をコードするDNA配列。

治療量：「治療量」は、治療された動物にて、血清IgEレベルを減少またはIgE産生もしくは活性を抑制し、障害または生理学的症状の徴候を軽減または防止する効果を有する、mAbの量である。

全IgE：「全IgE」とは別の分子と結合しているか、または結合していない、全血清IgEを意味する。

30

【0018】

本明細書において開示されるように、新規なキメライヌ抗-IgEmAbを産生し、ブタクサに感作したイヌに投与した。c15A.2と称されるこのキメラ分子はマウスの長および短可変領域に融合したイヌの不变長および短ドメインからなる。いずれのケースにおいても、かかる投与により、循環している遊離したIgEのレベルの検出可能なレベル以下までの持続的な減少が得られた。加えて、キメラ15A.2と複合体を形成し、今なお循環し、c15A.2の投与直後では検出可能なIgEを含む、全IgEは時間の経過と共に減少した。投与から28日後、遊離したc15.2が血清中で検出可能であったが、遊離および全血清IgEは共に検出できなかった。ヒトアレルギー用の治療薬としてのヒト化抗-IgEmAbの使用が米国特許第5593861号（マエダラ）に開示された。組換え抗-IgEmAbの投与によるIgEの除去は今までイヌでは知られていなかったと考える。当業者であれば、本願発明および本明細書中のmAbに関する開示が抗体分子の一部を含んでいてもよい受容体にも同様に適用できると認識するであろう。したがって、本明細書の開示は抗体だけでなく受容体の組成物にも関係するものである。

40

【0019】

本発明のイヌ抗-IgEmAb組成物はイヌおよびマウスイムノグロブリンの組換え体またはきキメラ構造物であってもよい。該分子は、イヌIgG不变長および短ドメインと、イヌIgEのエキソン3に対してアフィニティーを有するネズミイムノグロブリン長および短可変領域ドメインとから製造されるキメラを包含しうる。

50

本明細書において使用されるイヌ抗 - IgE mAb、キメラmAb、組換えmAbおよび受容体なる語は、そのいずれのおよびすべての保守的変種を包含し、本発明の範囲内にあると考えられる。

キメライヌ抗 - IgE mAb または受容体の投与がイヌアレルギーの治療方法にて有用であることが本発明の特徴である。本発明の組成物の投与がイヌにおける血清 IgE レベルを低下させることも本発明の特徴である。

本発明のキメライヌ抗 - IgE mAb および受容体は IgE とその受容体の間の相互作用を中断または遮断することができる。一般に、IgE とその受容体の間の干渉は、アレルギー症状を惹起する、または惹起する可能性のあるアレルゲンの型とは無関係である。

【0020】

本発明の具体例において、本発明のキメライヌ抗 - IgE mAb および受容体は、IgE 分子上の結合部位を遮断することにより、さもなければ IgE のその受容体への結合を干渉することにより、IgE が肥満細胞または好塩基球上にあるその受容体への結合を遮断することによって作用することができる。本発明のキメライヌ抗 - IgE mAb および受容体はまた、血漿中の可溶性 IgE を結合させ、ついで正常な体内機構により循環系からその複合体を除去することにより作用することもできる。本発明の他の具体例において、キメライヌ抗 - IgE mAb または受容体は、IgE を B - 細胞と結合させ、IgE + B - 細胞のクローン集団を排除することにより作用してもよい。本発明のキメライヌ抗 - IgE mAb または受容体はまた、IgE 産生を阻害することにより作用してもよい。特定の理論により拘束するつもりはないが、mAb または受容体は B 細胞に結合し、細胞のアポトーシスを誘発するか、または IgE 合成をダウンレギュレートまたは排除する阻害シグナルに至ることができる架橋事象を誘発すると考えられる。加えて、血清 IgE 、すなわち遊離した IgE の結合は、通常、エキソン 3 領域の血清 IgE と結合することのできるもう一つ別の制御分子を B 細胞上の IgE に結合させ、その後、かかる結合に付随かつ由来する負のシグナルを介して IgE 合成を行うことができる。

【0021】

もう一つ別の具体例において、本発明のキメライヌ抗 - IgE mAb または受容体は IgG 長鎖配列を含むか、または上記配列と一緒に処方し、該分子のインビボでの半減期を長くし、またはその活性を増強することもできる。

アレルギー症状に罹患しているイヌの治療方法またはイヌにおけるアレルギー症状の予防方法は、一般に、治療量のキメライヌ抗 - IgE mAb または受容体を治療される動物に投与することを含む。キメライヌ抗 - IgE mAb または受容体の正確な投与量および投与変数は当業者に公知の方法と矛盾しない方法にて確立されるであろう。これは以下の 1 またはそれ以上の因子を考慮することを含むが、このような列挙は代表的なものを意図するものであり、当業者に公知の、または知られるようになる他の変数を排除することを意図とするものではない：アレルギー症状の存在および重度、イヌの種類、個々の患者の状態、デリバリー部位、投与方法および期間、当業者に公知の、または将来公知となる可能性のある他の因子。

【0022】

同様に、投与されるキメライヌ抗 - IgE mAb または受容体の用量は、使用される IgE 長鎖イソタイプの特性および他の因子の事項に依存しているかもしれない。例えば、これらの事項は結合活性およびインビボでの血漿中半減期、処方中のキメライヌ抗 - IgE mAb または受容体の濃度、投与経路、投与部位および速度、ならびに治療される患者の臨床耐性を包含する。この列挙は限定を意図するものではなく、当業者は他の因子も関連しており、有利であると考えることができると考えられる。

このキメライヌ抗 - IgE mAb または受容体の治療量を、アレルギー症状を緩和または抑制し、および / または血清 IgE レベルを減少させ、および / または IgE 産生または活性を抑制するのに十分な投与量および期間、投与することができる。

【0023】

一般に、本発明の処方は、イヌ抗 - IgE mAb または受容体の安定および効能のある形

10

20

30

40

50

態の調製に干渉しない量の他の成分を含有していてもよい。キメライヌ抗 - Ig EmAb または受容体と共に投与されるいずれの付加成分も効果的で安全な医薬処方に適する量にて配合することができる。当業者に知られている医薬賦形剤も本発明の組成物の一部を形成することができる。例えば、かかる賦形剤として、セイラインおよび他の非経口用溶液、バッファーおよび安定化剤、ならびに種々の適当な增量剤、緩衝化剤、酸化防止剤、共溶媒および配合するのが有利であると当業者にわかっている他の成分が挙げられる。好ましい具体例において、イヌ抗 - Ig EmAb または受容体は滅菌 PBS 中の蛋白の溶液として処方することができる。

【0024】

本発明のキメライヌ抗 - Ig EmAb または受容体は、IgE とその受容体の間の結合を破壊し、遮断するか、そうではなく干渉するように投与することができ、あるいは投与される mAb または受容体と IgE の間の結合を強化するように投与することができる。これらの方は当業者に明らかであろう。好ましい具体例において、キメライヌ抗 - Ig EmAb または受容体は皮下的、筋肉内または静脈内投与することができる。別法として、mAb または受容体は、懸濁液、錠剤、カプセルあるいは経口、経直腸または経膣投与用の坐剤に処方して投与することができる。

以下の実施例を用いて 15A.2mAb のクローニング、発現および精製を説明するが、これに限定されるものではない。

【0025】

実施例 I : マウス 15A.2 可変領域のクローニング

マウスモノクローナル 15A.2 可変領域を 15A.2 ハイブリドーマ細胞から RT - PCR によりクローニングした。マウスハイブリドーマ細胞株から IgVh および IgVl の mRNA の逆転写および增幅用の一式の縮重 PCR プライマーからなる市販のキット（ノバゲン（Novagen）、マディソン、WI、Ig - プライム・キット）を、短および長可変ドメインをコードする 15A.2 mRNA をクローニングするためのプライマー源として使用した。IgVh ドメイン用 5' および 3' プライマーはそれぞれ Mu IgVh 5' - B および Mu IgMvh 3' - 1 であった。Mu IgVh 5' - B は 1 つのチューブ中の 2 つのプライマーの混合物（ノバゲンにより提供）であって、配列 G G G A A T T C A T G R A A T G S A S C T G G G T Y W T Y C T C T T (配列番号 1) および配列 A C T A G T C G A C A T G G A C T C C A G G C T C A A T T T A G T T T C C T (配列番号 2) を有する。Mu IgMvh 3' - 1 は配列 C C C A A G C T T A C G A G G G G G A A G A C A T T T G G G A A を有する。IgVl ドメイン用の 5' および 3' プライマーはそれぞれ Mu IgVl 5' - A および Mu IgVl 3' - 1 であった。15A.2 の IgVh および IgVl 可変ドメインをコードする mRNA を逆転写し、増幅させ、クローニングした。Mu IgVl 5' - A は配列 G G G A A T T C A T G G C C T G G A Y T Y C W C T Y W T M Y T C T を有する。Mu IgVl 3' - 1 は配列 C C C A A G C T T A G C T C Y T C W G W G G A I G G Y G G R A A を有する。

【0026】

PCR 反応は以下のように行った：

酵素 : Taq ポリメラーゼ

1) 94 20 秒 35 サイクル
60 58 秒
72 20 秒
2) 4 保持

15A.2 の IgVh および IgVl 可変ドメインの適当なクローニングを、制限酵素分析および DNA 配列分析を用いて同定した。周知のマウス IgVh および IgVl 遺伝子とこれらの DNA 配列の比較により、それらをマウスモノクローナル抗体可変ドメインに相当するとして確認した。

【0027】

実施例 II : イヌ IgG 定常領域のクローニング

10

20

30

40

50

イヌのイムノグロブリン短および長定常領域を、イヌのリンパ球細胞から R T - P C R によりクローニングした。イヌ I g G の定常ドメインの配列に準じた P C R プライマーを、イムノグロブリンの定常ドメインをコードしている m R N A の逆転写および P C R 増幅に用いた (M a e d a らにより、米国特許第 5 5 9 3 8 6 1 号に開示)。 P C R 反応条件は前記した通りであった。 P C R 産生物をクローニングし、 D N A 配列分析を行った。イムノグロブリンドメインの適当なクローニングを、制限酵素分析および D N A 配列分析を用いて同定した。周知のイムノグロブリン遺伝子とこれらの D N A 配列の比較により、それらをイヌイムノグロブリンの定常ドメインに相当するとして確認した。

【 0 0 2 8 】

実施例 I I I : マウス / イヌキメラ 1 5 A . 2 の全長のクローニング

10

キメラモノクローナル抗体の調製のための慣用法を、マウス / イヌキメラ 1 5 A . 2 モノクローナル抗体遺伝子の全長を構築するために用いた。マウス 1 5 A . 2 可変領域をコードしている配列および適当なイヌ定常領域をコードしている配列を P C R であわせてクローニングした。 D N A 配列分析によるキメラ遺伝子の検証後、適当なマウス / イヌキメラ 1 5 A . 2 短鎖遺伝子およびマウス / イヌ 1 5 A . 2 長鎖遺伝子を、キメラタンパク質の発現およびタンパク質産生のために選択した。

【 0 0 2 9 】

機能的クローニングの同定

1 5 A . 2 キメラ長および短鎖の機能的クローニングを C O S 細胞一過的発現系を用いて同定した。全長長鎖および全長短鎖を p c D N A 3 . 1 ベクター (インビトロゲン (I n v i t r o g e n) 、カールスバッド、 C A) 上の C M V プロモーターの正しい方向にて下流にクローニングした。タンパク質上のイムノグロブリンのリーダーシグナルは、細胞から培地上清中にタンパク質を分泌させる。両方の D N A を C O S 細胞に同時にトランスフェクションさせることにより、細胞中の機能的キメラ抗体の一過的遺伝子発現、タンパク質産生および集合が認められた。 I g E 結合エライザおよび抗イヌ I g G エライザを、細胞培地上清中の機能的抗体活性を検出するために用いた。最もよい結合活性を与えるクローニングを、バキュロウィルス発現系においてキメラモノクローナル抗体産生用ベクターを構築するために用いた。長鎖および短鎖両方の配列を以下に示す :

20

【 0 0 3 0 】

キメラ15A. 2長鎖DNA配列(配列番号3)

ATGAAATGGA	GCTGGGTTTT	TCTCTTCTC	
CTGTCAGTAA	CTGCGGGTGT	GTTCTCTGAG	
GTTCAGCTGC	AGCAGTCTGG	ACCTGAGCTG	
GTGAAGCCTG	GGGCTTCAGT	GAAGATATCC	
TGCAAGGCTT	CTGGTTACTC	ATTTACTGAC	
TACTTTATGA	ACTGGGTGAT	GCAGAGCCAT	
GGAAAGAGCC	TTGAGTGGAT	TGGTCGTATT	
AATCCTTCA	ATGGTGATCC	TTTCTACAAAC	
CAGAAGTTCA	AGGGCAAGGC	CACATTGACT	10
GTAGACAAAT	CCTCTAGCAC	AGCCCACATG	
GAGCTCCGGA	GCCTGGCATC	TGAGGACTCT	
GCAGTCTATT	ATTGTGCAAG	ATTCTACTAC	
GGACGTTACT	ATGCTATGGA	CTACTGGGGT	
CAAGGAACCT	CAGTCACCGT	CTCCTCAGCC	
TCCACCACGG	CCCCCTCGGT	TTTCCCAC TG	
GACCCCAGCT	GCGGGTCCAC	TTCCGGCTCC	
ACGGTGGCCC	TGGCCTGCCT	GGTGTCAAGGC	
TACTTCCCCG	AGCCTGTAAC	TGTGTCCCTGG	
AATTCCGGCT	CCTTGACCAAG	CGGTGTGCAC	
ACCTTCCC GT	CCGACCTGCA	GTCCTCAGGG	20
CTCTACTCCC	TCAGCAGCAT	GGTGACAGTG	
CCCTCCAGCA	GGTGGTCCAG	CGAGACCTTC	
ACCTGCAACG	TGGCCCACCC	GGCCAGCAAA	
ACTAAAGTAG	ACAAGCCAGT	GCCCAAAAGA	
AAAAATGGAA	GAGTTCTCG	CCCACCTGAT	
TGTCCCAAAT	GCCCAGCCCC	TGAAATGCTG	
GGAGGGCCTT	CGGTCTTCAT	CTTTCCCCCG	
AAACCCAAGG	ACACCCCTTT	GATTGCCGA	
ACACCTGAGG	TCACATGTGT	GGTGGTGGAT	30
CTGGGACCAAG	AAGACCCCTGA	GGTGCAGATC	
AGCTGGTTCG	TGGACGGTAA	GCAGATGCAA	
ACAGCCAAGA	CTCAGCCTCG	TGAGGAGCAG	
TTCAATGGCA	CCTACCGTGT	GGTCAGTGT C	
CTCCCCATTG	GGCACCCAGGA	CTGGCTCAAG	
GGGAAGCAGT	TCACGTGCAA	AGTCAACAAAC	
AAAGCCCTCC	CATCCCCGAT	CGAGAGGACC	
ATCTCCAAGG	CCAGAGGGCA	GGCCCATCAG	
CCCAGTGTGT	ATGTCTGCC	GCCATCCCCG	
GAGGAGTTGA	GCAAGAACAC	AGTCAGCTTG	
ACATGCCTGA	TCAAAGACTT	CTTCCCCACCT	40
GACATTGATG	TGGAGTGGCA	GAGCAATGGA	
CAGCAGGAGC	CTGAGAGCAA	GTACCGCACG	
ACCCCGCCCC	AGCTGGACGA	GGACGGGTCC	
TACTTCCTGT	ACAGCAAGCT	CTCTGTGGAC	
AAGAGCCGCT	GGCAGCGGGG	AGACACCTTC	
ATATGTGCGG	TGATGCATGA	AGCTCTACAC	
CACAGAAATC	CCTCTCCCAT	TCTCCGGGTA	
AATGA			

キメラ 15A. 2 短鎖DNA配列 (配列番号4)

ATGGCCCTGGA TTTCACTCTT ATTCTCTCTC
 CTGGCTCTCA GCTCAGGGGC CATTCCCAG
 GCTGTTGTGA CTCAGGAATC TGCACTCACC
 ACATCACCTG GTGAAACAGT CACACTCACT
 TGTGCTCAA GTACTGGGC TGTTACAAC
 AGTAACATATG CCAACTGGGT CCAAGAAAAA
 CCAGATCATT TATTCACTGG TCTAATAGGT
 GGTCCCAACA ACCGAGCTCC AGGTGTTCC
 GCCAGATTCT CAGGCTCCCT GATTGGAGAC 10
 AAGGCTGCC TCACCATCAC AGGGGCACAG
 ACTGAGGATG AGGCAATATA TTTCTGTGCT
 CTATGGTACA GCAACCATTG GGTGTTCGGT
 GGAGGAACCA AACTGACTGT CCTAGGCCAG
 CCCAAGGCCT CCCCCCTCGGT CACACTCTTC
 CCGCCCTCCT CTGAGGAGCT CGGCGCCAAC
 AAGGCCACCC TGGTGTGCCT CATCAGCGAC
 TTCTACCCCA GCGGCGTGAC GGTGGCCTGG
 AAGGCAAGCG GCAGCCCCGT CACCCAGGGC
 GTGGAGACCA CCAAGCCCTC CAAGCAGAGC
 AACAAACAAGT ACGCGGCCAG CAGCTACCTG
 AGCCTGACGC CTGACAAGTG GAAATCTCAC
 AGCAGCTTCA GCTGCCTGGT CACGCACGAG
 GGGAGCACCG TGGAGAAGAA GGTGGCCCC
 GCAGAGTGCT CTTAG

【0032】

実施例Ⅴ：昆虫細胞におけるキメラ 15A. 2 の発現

キメラ 15A. 2 マウス/イヌモノクローナル抗体をより大規模に產生するために、バキュロウイルス発現系を用いた。バキュロウイルス発現は一般的な操作であって、該方法は当業者において周知である。15A. 2 長鎖DNAを、ファーミングン社 (Pharmingen) (サンディエゴ、CA) のバキュロウイルスに組換えるための pAcLIC 30 バキュロウイルストラ NS ファーベクター中にクローニ化した。キメラ 15A. 2 短鎖DNAを、ファーミングン社のバキュロウイルスに組換えるための pAcH1s NT-A (商標登録) バキュロウイルス輸送ベクター中にクローニ化した。両方のウイルス構築物の組換え体および増幅物を昆虫 SF-9 細胞中で増幅した。キメラ 15A. 2 を昆虫 High Five 細胞を用いて発現させた。感染条件は以下の通りであった：

感染用 High Five 細胞密度 : 1.5 × 10⁶ / ml

長鎖ウイルス感染用 MOI : 10

短鎖ウイルス感染用 MOI : 3

タンパク質発現の時間 : 72 時間

15A. 2 を細胞培地中で発現および分泌させた。

【0033】

キメラ 15A. 2 タンパク質の精製

一般的な精製スキームは以下の通りである：

1. 細胞浄化 :

15A. 2 タンパク質を含む細胞培地上清を、感染後 72 時間で回収した。該上清をミリポア (Millipore) (ベッドフォード、MA) の細胞浄化用のミリガード (MilliGuard) (商標登録) カートリッジ濾過システムを通して濾過した。また、0.2 μm の孔の大きさを有し、低タンパク質吸着の高い処理能力のフィルターであって、高圧力に耐えることができる別の濾過システムも適当であろう。次いで、不純物を除去し

10

20

30

40

50

た上清をカラムクロマトグラフィーで濃縮した。

【0034】

2. タンパク質 A のカラムクロマトグラフィー：

濃縮した試料を、 PBS 緩衝液で平衡にしたタンパク質 A カラムに装填した。 15A.2 タンパク質を 4% グリセロール、 PBS (pH 7.2) および 4% グリセロール、 25 mM クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 2.5) を混合することにより得られた pH 勾配液により溶出させた。該タンパク質は約 pH 4 で溶出した。

【0035】

3. イオン交換カラムクロマトグラフィー：

タンパク質 A で精製した 15A.2 を、 4% グリセロール、 PBS (pH 7.2) で平衡にした Q セファロース (商標登録) (ファルマシア (Pharmacia) 、ウプサラ、スウェーデン) カラムに装填し、混入したタンパク質、 DNA 、 RNA 、ウィルスなどを除去した。また、精製したタンパク質から DNA 、 RNA 、エンドトキシンおよび別の負に帯電した物質を除去する類似のイオン交換樹脂を利用してよい。流出物を回収した。

4. 滅菌：

Q を流出した 15A.2 を濃縮し、 0.2 μm のフィルターを通して濾過することにより滅菌した。最終的な緩衝液の成分は以下の通りである：

0.7 × PBS

6.5 mM クエン酸ナトリウム

4% グリセロール

pH : 約 7.0

該タンパク質は、 SDS-PAGE タンパク質ゲルにより示されるように、少なくとも 95% の純度を有し、将来使用するために -80 で保管した。

【0036】

実施例 V : 組換えイヌ抗 - IgE mAb (c15A.2) : インビトロおよびインビボの IgE 活性の効果

実施例 I V で得た精製した c15A.2 を、インビトロでのイヌ IgE 受容体へのイヌ IgE の結合能力について試験を行った (図 1) 。 2002 、 2003 および 2103 で示される 3 匹のイヌの血清中の IgE を中和するために必要な c15A.2 の量を血清中和アッセイにより調べ、それを図 8 に示す。 40 日の実験期間での時間経過および事象を図 2a および 2b にまとめた。イヌをラブレース・レスピレイトリー・リサーチ・インスティテュート (Lovelace Respiratory Research Institute) (アウバカーキ、 NM) 産のブタクサに感作させ、その効能をアレルゲンの投与後に皮下皮膚反応を生じるイヌの能力により評価して試験する実験に用いた。

c15A.2 をイヌ 2002 、 2003 および 2103 に 5 日おきに 8 回連続して投与した。最初の処置での c15A.2 の投与量は、投与を開始する 3 日前に測定した遊離した血清 IgE 濃度の 10 倍の濃度に相当していた。 1 および 2 回の投与は遊離した血清 IgE 濃度の 10 倍を与えた。後のすべての投与は遊離した血清 IgE 濃度の 5 倍とした。 30 分間にわたって静脈内注入することにより、 10 倍または 5 倍の血清 IgE 濃度をデリバリーするために必要な濃度に、試験物質を滅菌 PBS で希釈した。

【0037】

図 2a は、 c15A.2 mAb の投与量に基づく、各々のイヌにおける時間に対する遊離および全血清 IgE のレベルを示す。次いで、付加的な c15A.2 を 5 日おきに合計して 40 日間連続して投与した。血清 IgE レベルを当業者により周知である標準的なエライザ法によりアッセイする。 IgE レベルが約 1 ng / ml 以下では、一般的にエライザ法で検出されないと考えられている。

図 2a はまた、実験用イヌにおける遊離した IgE が 60 分以内で検出されないレベルにまで低下し、 40 日の処理期間の間に戻らなかつことを示す。生理食塩水を与えただけの対照イヌ 1101 および 1102 における遊離した血清 IgE のレベルはこの期間の間著しく変化しなかった (図 2b) 。これらの実験において使用したアッセイは、マウス c

10

20

30

40

50

15 A. 2 抗体でのエライザ固相捕捉、イヌ Ig E のエキソン 4 を認識する別の HRP O 接合 mAb である 14 K. 2 での検出からなる。該アッセイは c15 A. 2 に結合しないすべての血清 Ig E を検出する。

【0038】

c15 A. 2 と結合した全 Ig E は、おそらく、再循環するためその Ig E は実験用イヌにおける遊離した Ig E よりゆっくり低下し、結局は循環から一掃される。ここで使用したアッセイは mAb 14 K. 2 でのエライザ捕捉および c15 A. 2 に結合することを阻害しない別の抗イヌ Ig E mAb での検出からなる。イヌ 2003 および 2103 において、遊離および全血清 Ig E は、組換え抗体の最終投与後、60 日間以上アッセイで検出されないままである。イヌ 2002 において、キメラ抗体の投与を中断した後 30 日で、遊離した血清 Ig E は約 200 ng / ml で検出することができ、観測の残りの 30 日間このレベルを保ったままであった。

10

【0039】

これらのデータは、本発明の組換え抗体の、(1) 血清中に循環している Ig E を一掃すること；および(2) Ig E を補充する過程に影響を及ぼす方法を示すこと、における効果を示す。これらの結果から、血清 Ig E が短い半減期、おそらく、約 2 日のオーダーの半減期を有することがわかり、組換え体またはキメラ分子も同様にインビボで相対的に短い半減期を示していてもよいという意外なものである。処置していない動物において、循環している血清 Ig E は 4 ないし 5 日おきに完全に補充されると考えられており、さらに、本発明のイヌ抗 - Ig EmAb 15 A. 2 の投与後、血清 Ig E レベルは、キメラ抗体の投与後 18 日で検出したレベル未満に抑えられたままであった。

20

【0040】

実施例 V I : c15 A. 2 の浄化値

イヌ 2002、2003 および 2103 の血清における本発明の遊離したキメラ 15 A. 2 の存在を、ポリクロナールヤギ抗イヌ Ig G 接合体により検出する組換えイヌ Ig E 固相を用いてエライザにより調べた。図 3 は、血清中の c15 A. 2 レベルが、投与の周期の各々の 5 日間の最初と最後に常に、上昇および下降することを示す。遊離した c15 A. 2 は、注入後 24 日の実験用イヌ血清においてまだ検出可能 (X µg / ml) である。c15 A. 2 およびイヌ Ig E の免疫複合体を、14 K. 2 固相のエライザにより測定し、ポリクロナール抗 - イヌ Ig G f c 接合体により検出した。図 4 に要約したこれらのデータは、複合した Ig E は、処置の早い時期では高い濃度で検出されるが、複合体レベルはやがて経時に下降することを示す。28 日までは、c15 A. 2 を与えたイヌにおいて免疫複合体は検出されない。この結果は、該複合体が血清イムノグロブリンの循環しているプールから一掃され、この時間枠において新しい Ig E の合成が減少し、排除されていることを示唆する。対照イヌでは変化は観察されなかった。イヌ 2003 および 2103 において、キメラモノクローナル抗体 c15 A. 2 に対する免疫反応は観察されなかった。第一の注入後 28 日で、イヌ 2002 において試験物質に対する免疫反応が観察された。図 5 に示すデータは、より多くのキメラ 15 A. 2 を投与すると、この反応が増大し、イヌ 2002 における c15 A. 2 のより短い血清中半減期で一定の役割を果たしうる(図 3)ことを示す。

30

【0041】

実施例 V I I : イヌ抗 - Ig EmAb 15 A. 2 (c15 A. 2) の投与による好塩基球上の高アフィニティ - Ig E 受容体の発現のレベルへの効果

c15 A. 2 投与開始後の 5 日、14 日、および 29 日に、10 ml の全血を摂取した。末梢血の白血球の半精製個体群を密度勾配遠心分離により調製し、2 次元フローサイトメトリー解析用試薬で染色した。これらの実験において用いた試薬は FITC 接合、抗イヌ高アフィニティ - Ig E 受容体 mAb 9L. 4 および PE 接合 14 K. 2 であった。これらの抗体用に 2 重染色し、図 6 のドットプロット図の 4 つの象限(右上が第 1 象限)中にある細胞種は好塩基球である。

図 6 のデータはイヌ 2002 のものであって、代表例である。象限中の 2 重染色した細胞

40

50

の数は c 1 5 A . 2 の投与と経時に減少する。該データは、好塩基球における高アフィニティー Ig E 受容体の発現レベルが実験用イヌ 2 0 0 2 への c 1 5 A . 2 の投与から 2 9 日後には 9 0 % 以上減少することを示唆する。経時に血清 Ig E の排除が好塩基球上の Ig E 用受容体の発現の減少をもたらし、皮膚肥満細胞においても同様の反応を反映するかもしれない。高アフィニティー Ig E 受容体の肥満細胞での発現の減少はアレルゲンに対する皮膚試験の反応性の減少または排除をもたらすであろう。

【 0 0 4 2 】

実施例 V I I I : イヌ抗 - Ig E m A b 1 5 A . 2 を投与したブタクサ皮膚試験反応性に対する効果

ブタクサに感作したイヌにエバンスブルー色素の P B S 中 0 . 5 % 溶液を 0 . 2 m l / k g で注入し、次いで、10 分後にアレルゲンで攻撃した。1 0 0 0 P M U / m l で開始する P B S 中のブタクサアレルゲンの 5 回連続して 10 倍に希釈したものを調製し、胴体の毛をそった部分に 1 0 0 μ l 皮下注入した。生理食塩水 (P B S) は負の対照として供し、ヒスタミン (P B S 中 0 . 2 7 5 μ g / m l のヒスタミン希釈体 1 0 0 μ l) は正の対照として供した。反応性を 10 分後に測定し、皮膚における腫れおよび青色素の拡散をヒスタミンの対照と比較した。2 の評価は該反応がヒスタミン反応に対する大きさおよび色に相当するアレルゲン希釈体に与えた。1 の評価はヒスタミン対照の半分であった反応に与え、0 の評価は反応が負の対照である生理食塩水に相当した場合に与えた。2 0 0 2 、 2 0 0 3 および 2 1 0 3 の 3 つの実験用イヌおよび 1 1 0 1 および 1 1 0 2 の 2 つの対照イヌを、c 1 5 A . 2 を投与する一週間前、次いで、最終投与から 3 日および 7 日後に前記した通りに皮膚試験を行った。図 7 は、対照イヌにおいてブタクサアレルゲンに対する皮膚反応が研究を通して一様であったことを示す。対照イヌ 1 1 0 2 において、ブタクサ皮膚反応は実際のところ経時に増加した。実験用イヌ 2 0 0 3 および 2 1 0 3 において、c 1 5 A . 2 の投与後 4 0 日間でブタクサ感作は少なくとも 7 日間完全になくなかった。イヌ 2 0 0 2 だけが、注入後 3 日目に最も高いブタクサ濃度でのブタクサ感作を示し、反応は色素の拡散から 1 の評価を得た。対照イヌを観察および記録した評価 1 においてみられた特徴的な腫れを有するわけではなかった。イヌ 2 0 0 2 に注入後 7 日で、1 の反応評価を 1 0 0 0 P M U / m l 、 1 0 0 P M U / m l および 1 0 P M U / m l のスポットに与えた。腫れることなく色の拡散のみあった。イヌ 2 0 0 2 において、この皮膚試験期間で検出できない遊離または全 Ig E があるという事実が得られたならば、観察された皮膚反応は肥満細胞上の高アフィニティー Ig E 受容体と Ig E との架橋によるものではないと思われる。これらを試験手順に伴う別の皮膚反応の結果としてもよい。

【 0 0 4 3 】

実施例 I X : 長期血清安定性、免疫原性の喪失および Ig E + B - 細胞を標的とするために設計したキメライヌ抗 - Ig E m A b

イヌの配列から選ばれた分子のかなりの部分を Ig として含む形態の本発明のイヌ抗 - Ig E m A b を提供し、それゆえ、より大きな血清安定性、免疫原性の喪失およびより効果的に Ig E + B - 細胞を標的とすることが期待できることを、当業者は理解するであろう。

それゆえ、もう一つ別の例において、長期血清安定性およびそれに対する免疫反応を誘発不能にするように操作されたキメライヌ抗 - Ig E m A b をイヌに投与する。この m A b は血清中の Ig E 、および肥満細胞または好塩基球上の Ig E ではなく、 Ig E 産生 B - 細胞の表面上の Ig E に結合する。それゆえ、 Ig E 合成は減少または排除される。結果として減じた Ig E レベルは肥満細胞 Ig E 受容体発現の減少および伴うアレルギー反応の減少の原因となる。

【 0 0 4 4 】

実施例 X : 組換えイヌ Ig E 受容体を意味する c R c Ig の、昆虫細胞中のクローニングおよび発現

イヌ Ig E 受容体の - サブユニットの少なくとも一部に相当すると考えられている配列が、 G E N B A N K データベースの受入番号 D 1 6 4 1 3 に示されている。

10

20

30

40

50

c R c I g 受容体は、イヌ I g E のエキソン 2 および 3 に架橋している I g E に結合する受容体の ドメインからなる。受容体の I g G 長鎖部分は c 1 5 A . 2 のエキソン 2 および 3 と同様である。

キメラ I g E 受容体 c R c I g をコードしている D N A を標準的な操作を用いてバキュロウイルス遺伝子に導入した。H i g h F i v e 昆虫細胞菌株を、c R c I g を産生するバキュロウイルスに感染させた。c R c I g タンパク質をタンパク質 A のクロマトグラフィーにより細胞培地から精製し、続いて、イオン交換クロマトグラフィーにより混入しているタンパク質を除去した。組換え I g E 受容体である c R c I g の D N A 配列を、対応する翻訳とともに、図 10 に示す。

【 0 0 4 5 】

実験に用いた I g E 受容体は c R c I g と称される組換えキメラ受容体であり、イヌ I g G C H 2 および C H 3 ドメインに融合した可溶性高アフィニティー I g E 受容体の ユニットからなる。膜貫通ドメインを欠く可溶性 サブユニットを G e n e B a n k で利用できる情報を用いて P C R によりクローニングした。I g G C H 2 および C H 3 ドメインは C h e m o - S e r o パテントにより請求された D E 9 4 の配列の一部であった。可溶性受容体および D E 9 4 C H 2 / C H 3 を P C R により結合させ、全長 c R c I g を形成した。

全長 c R c I g をファーミング社のバキュロウイルス p A c H i s T N A ベクター中にクローニングした。該ウイルスを s f - 9 細胞を用いて増幅させた。c R c I g タンパク質を秘密形態で産生し、48 時間、M O I (感染の多重度) 5 で、H i g h F i v e 細胞中で発現させた。該タンパク質を C H 2 / C H 3 ドメインのタンパク質 A カラムへの結合に基づいて精製した。詳細な精製スキームは実施例 I V に示す 1 5 A . 2 のものと同様である。

精製した c R c I g を 2 . 9 m g / m l に濃縮し、0 . 2 μ m のフィルターユニットを通して濾過することにより滅菌した。最終的な緩衝液成分は以下の通りである：

0 . 7 x P B S

6 . 5 m M クエン酸ナトリウム

1 5 % グリセロール

p H : 約 7 . 0

該タンパク質は、S D S - P A G E タンパク質ゲルにより示されるように、少なくとも 95 % の純度を有し、将来使用するために - 8 0 で保管した。

【 0 0 4 6 】

実施例 X I : インビボおよびインビトロでの I g E 活性に対する組換えイヌ I g E 受容体の効果

血清 I g E レベルを、前記した通りに、エライザにより測定した。実施例 X で得られた精製した c R c I g をインビトロで、イヌ I g E 受容体とイヌ I g E の結合を妨げるその能力の試験をした。血清 I g E を中和させるのに必要な c R c I g 量を、インビトロで、イヌ血清に対する精製した c R c I g の滴定により測定した。次いで、精製した c R c I g を静脈内注射によりボーラスで投与した。

それゆえ、組換えイヌ I g E 受容体 c R c I g を、イヌ 1 0 0 1 および 1 0 0 2 に静脈内ボーラス投与した。c R c I g 量は、インビトロで結合する組換え受容体の 50 % 中和に必要な量の 10 倍 (イヌ 1 0 0 2 において、1 4 1 m g s ; 2 m g / m l で 7 . 0 8 m l) または 20 倍 (イヌ 1 0 0 1 において、2 2 0 m g s ; 2 m g / m l で 1 1 . 0 4 m l) に相当した。次いで、付加的な c R c I g を各々のイヌに第 1 3 日目ないし 1 7 日目に 5 日連続して 2 m g / m l で 5 m l の投与量でボーラス投与した。図 9 は時間に対する各々のイヌにおける遊離した血清 I g E のレベルを示す。いずれのイヌにおいても、0 日目の c R c I g の最初の投与後に、I g E は急速に循環して戻った。血清 I g E レベルは、一般的に、当業者に周知の標準的なエライザ法によりアッセイされる。I g E レベルは、一般的に、約 1 n g / m l 以下だとエライザ法では検出できないと考えられている。

【 0 0 4 7 】

10

20

30

40

50

イヌ 1001において、血清 Ig E は組換え Ig E 受容体の最終投与から 2 ヶ月を超えてもアッセイにより検出できなかった。イヌ 1002において、血清 Ig E レベルは組換え受容体の最終投与の一定の期間経過後には、検出可能なレベルに戻った。しかしながら、イヌ 1002において、血清 Ig E レベルは増加したが、0 日目の組換え受容体の投与前に示していた高いレベルまでは戻らなかった。図 10 は、各々のイヌにおける実験期間中の全および遊離した血清 Ig E レベルを示す。これらのデータは、循環している Ig E を血清から速やかに除去することができなかったことを示す。遊離した血清 Ig E は利用できないが、おそらく、cRcIg と複合した全 Ig E はまだ循環していた。

これらのデータは、(1) 血清の循環している Ig E を明らかにすること；および(2) Ig E を補充する過程に影響を及ぼす方法を示すことにおいて、本発明の組換え抗体の効果を示す。

【0048】

実施例 X II：イヌ Ig E に結合し、Ig E 受容体に結合することを妨げ、および／または B - 細胞上の Ig E に結合し、Ig E の合成に影響を及ぼすペプチド
ペプチドはコンビナトリアルペプチドライブラリー由来であって、Ig E と結合した場合、Ig E 受容体に結合するのを妨げるアミノ酸配列を含むと当業者により認識されているであろう。次いで、それらは Ig E、好ましくは Ig E のエキソン 3 に結合可能で、この Ig E が Ig E 受容体に結合するのを妨げることができるアミノ酸配列のペプチドである。また、それらは B - 細胞上の Ig E に結合していてもよい。

それゆえ、別の例において、イヌ Ig E に結合するペプチドをイヌに投与する。該ペプチドは血清中の Ig E および、肥満細胞または好塩基球上の Ig E ではなく、Ig E 産生 B - 細胞の表面上の Ig E に結合する。Ig E 合成を減少させるか、または排除する。結果として減じた Ig E レベルは肥満細胞における Ig E 受容体の発現の減少およびそれに伴うアレルギー反応の減少を引き起こす。

【0049】

実施例 X IV：イヌ Ig E に結合し、Ig E 受容体へ結合するのを妨げ、および／または B - 細胞上の Ig E に結合し、Ig E 合成に影響を及ぼす小分子

小有機分子はコンビナトリアルライブラリーに由来し、アッセイでスクリーニングし、よって Ig E が Ig E 受容体に結合することを阻害する能力で小有機分子を単離すると、当業者は認識している。それゆえ、それらは Ig E、好ましくはエキソン 3 内の領域に結合していてもよく、Ig E 受容体に結合することを阻害する。

別の例において、小分子をイヌに投与する。小分子は血清中の Ig E および肥満細胞または好塩基球上の Ig E ではなく、Ig E 生成 B - 細胞の表面上の Ig E に結合する。したがって、Ig E 合成を減少させるか、または排除する。結果として減じた Ig E レベルは肥満細胞中の Ig E 受容体発現の減少およびそれに伴うアレルギー反応の減少を引き起こす。

【0050】

おわりに

本明細書および請求の範囲で用いる単数形「a」、「and」および「the」は特に明記のない限り複数形を包含する。例えば、「処方」なる用語は、異なる処方の混合物を包含し、「治療法」なる用語は同等の工程および当業者により周知の方法を包含する。

特に記載がない限り、本明細書で用いたすべての技術および特定の用語は当業者により一般的に理解すると同じ意味を有する。本明細書で記載したものと類似または同等の方法および物質のいずれも、本発明の実施または試験に使用でき、本明細書に記載した好ましい方法および物質である。本明細書に記載した全ての刊行物は出典明示により本明細書の一部とする。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 Ig E が組換えイヌ Ig E 受容体と結合することを阻害するキメラ 15A.2 の能力を示す。

【図 2】 1 のコースのキメラ抗体を投与した後の、イヌにおける c 15A.2 活性に關

10

20

30

40

50

する経時的データを示す。

【図3】 c 1 5 A . 2 と称される組換えキメラ抗 - I g E m A b を投与した後の、2匹の対照および3匹の実験用のイヌにおける（遊離の、および合計の I g E ）の循環している I g E レベルに関する経時的データを示す。この m A b 1 5 A . 2 およびその特異性は 1999 年 3 月 30 日出願の係属している特許出願番号 09 / 281760 に開示されている。

【図4】 8つのコースのキメラ抗体を投与した後の、3匹のイヌにおける c 1 5 A . 2 と複合した I g E の循環に関する経時的データを示す。

【図5】 キメラ抗体を投与した後の、実験用イヌの血清中に観察される抗 - キメラ 1 5 A . 2 活性に関する経時的データを示す。 10

【図6】 キメラ抗 - 1 5 A . 2 m A b を投与する最初のコースから 4 日後の、第 2 のコースから 3 日後の、および第 5 のコースから 5 日後の、P E - 標識した抗 - エキソン 4 イヌ I g E m A b 1 4 K . 2 および F I T C - 標識した抗 - イヌ I g E 受容体 m A b 9 L . 4 で二重染色した、イヌからのフローサイトメトリーデータを示す。

【図7】 c 1 5 A . 2 m A b の投与前、8つのコースを投与した 3 日および 8 日後の、イヌにおけるラグウェード (Ragweed) 皮膚試験反応性に関する経時的データを示す。

【図8】 c R c I g と称される組換え受容体 - I g G アンタゴニストを投与した後の、イヌ 1 0 0 1 および 1 0 0 2 における循環している遊離した I g E レベルの経時的データを示す。

【図9】 実験の時間経過にわたる実験用イヌ 1 0 0 1 および 1 0 0 2 の遊離した I g E および全体としての I g E を示す。 20

【図10】 組換え I g E 受容体 c R c I g の D N A 配列（配列番号 5 ）と対応する翻訳（配列番号 6 ）を示す。図の最後に 4 個のアミノ酸を付加した、その対応するヌクレオチドを欠くのが配列番号 7 である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> IDEXX LABORATORIES, INC.

<120> CANINE ALLERGY THERAPEUTIC RECOMBINANT
CHIMERIC ANTI-IgE MONOCLONAL ANTIBODY

<130> 036040036PC01

<140> TO BE ASSIGNED
<141> 2001-01-30<150> 09/592,998
<151> 2000-06-12

10

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1
<211> 34
<212> DNA
<213> Mouse

<400> 1

gggaattcat graattgsac tgggtywtyc tctt

34

<210> 2
<211> 39
<212> DNA
<213> Mouse

<400> 2

actagtcgac atggactcca ggctcaattt agtttcct

39

<210> 3
<211> 32
<212> DNA
<213> Mouse

<400> 3

cccaagctta cgagggggaa gacatttggg aa

32

<210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Mouse

<400> 4

gggaattcat ggcctggayt ycwctywtmy tct

33

<210> 5
<211> 35
<212> DNA

30

20

<213> Murine

<400> 5

cccaagctta gctcytcwgw ggatgggygy ggraa

35

<210> 6

<211> 1425

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 6

atg aaa tgg agc tgg gtt ttt ctc ttc ctg tca gta act gcg ggt	48
gtg ttc tct gag gtt cag ctg cag tct gga cct gag ctg gtg aag	96
cct ggg gct tca gtg aag ata tcc tgc aag gct tct ggt tac tca ttt	144
act gac tac ttt atg aac tgg gtg atg cag agc cat gga aag agc ctt	192
gag tgg att ggt cgt att aat cct ttc aat ggt gat cct ttc tac aac	240
cag aag ttc aag ggc aag gcc aca ttg act gta gac aaa tcc tct agc	288
aca gcc cac atg gag ctc cgg agc ctg gca tct gag gac tct gca gtc	336
tat tat tgt gca aga ttc tac tac gga cgt tac tat gct atg gac tac	384
tgg ggt caa gga acc tca gtc acc gtc tcc tca gcc tcc acc acg gcc	432
ccc tcc gtt ttc cca ctg gac ccc agc tgc ggg tcc act tcc ggc tcc	480
acg gtg gcc ctg tgc ctg gtg tca ggc tac ttc ccc gag cct gta	528
act gtg tcc tgg aat tcc ggc tcc ttg acc agc ggt gtg cac acc ttc	576
ccg tcc gac ctg cag tcc tca ggg ctc tac tcc ctc agc agc atg gtg	624
aca gtg ccc tcc agc agg tgg tcc agc gag acc ttc acc tgc aac gtg	672
gcc cac ccg gcc agc aaa act aaa gta gac aag cca gtg ccc aaa aga	720
gaa aat gga aga gtt cct cgc cca cct gat tgt ccc aaa tgc cca gcc	768
cct gaa atg ctg gga ggg cct tgc gtc ttc atc ttt ccc ccg aaa ccc	816
aag gac acc ctc ttg att gcc cga aca cct gag gtc aca tgt gtg gtg	864
gtg gat ctg gga cca gaa gac cct gag gtg cag atc agc tgg ttc gtg	912
gac ggt aag cag atg caa aca gcc aag act cag cct cgt gag gag cag	960
ttc aat ggc acc tac cgt gtg gtc agt gtc ctc ccc att ggg cac cag	1008
gac tgg ctc aag ggg aag cag ttc acg tgc aaa gtc aac aac aaa gcc	1056
ctc cca tcc ccg atc gag agg acc atc tcc aag gcc aga ggg cag gcc	1104
cat cag ccc agt gtg tat gtc ctg cgg cca tcc cgg gag gag ttt agc	1152
aag aac aca gtc agc ttg aca tgc ctg atc aaa gac ttc ttc cca cct	1200
gac att gat gtg gag tgg cag agc aat gga cag cag gag cct gag agc	1248
aag tac cgc acg acc ccg ccc cag ctg gac gag gac ggg tcc tac ttc	1296
ctg tac agc aag ctc tct gtg gac aag agc cgc tgg cag cgg gga gac	1344
acc ttc ata tgt gcg gtg atg cat gaa gct cta cac aac cac tac aca	1392
cag aaa tcc ctc tcc cat tct ccg ggt aaa tga	1425

10

20

30

<210> 7

<211> 705

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 7

atggcctgga ttctacttctt attctctctc ctggctctca gctcaggggc catttccca	60
gtgttgtgtga ctcaggaaatc tgcactcacc acatcacatc gtgaaacagt cacactcact	120
tgtcgctcaa gtactggggc ttttacaact agtaactatg ccaactgggt ccaagaaaaa	180
ccagatcatt tatttactgg tctaaatagggt ggtcccaaca accgagctcc aggtgttctt	240
cccaagattct caggctccctt gattggagac aaggctgccc tcaccatcac aggggcacag	300
actgaggatg aggcaatata ttctgtgtctt ctatggtaca gcaaccattt ggtgttcgggt	360
ggagggacca aactgactgtt cctaggccag cccaaaggccctt cccctcggtt cacacttcc	420
ccgcctccctt ctgaggagctt cggccccaac aaggccaccc ttgggtgtccatcagcgac	480
ttcttacccca gccccgtgac ggtggcctgg aaggcaagcg gcagcccccg cacccaggc	540

gtggagacca ccaagccctc caagcagacg aacaacaagt acgcggccag cagctacccg	600
agccgtacgc ctgacaatgc gaaatctac agcagcttca gctgcctggc cacgcacgag	660
gggagcaccg tggagaagaa ggtggccccc gcagagtgtcttag	705
<210> 8	
<211> 1300	
<212> DNA	
<213> Baculovirus	
<220>	
<221> CDS	
<222> (8)...(1300)	
<223> Canine IgE	
<400> 8	
ccgcgag atg cct gct tcc atg gga ggc cct gcc ctg ctg tgg cta gcg	49
Met Pro Ala Ser Met Gly Gly Pro Ala Leu Leu Trp Leu Ala	
1 5 10	
ctg ctg ctc tcc tct cca ggt gtc atg tca tca gat acc ttg aaa cct	97
Leu Leu Leu Ser Ser Pro Gly Val Met Ser Ser Asp Thr Leu Lys Pro	
15 20 25 30	
aca gtg tcc atg aac ccg cca tgg aat aca ata ttg aag gat gac agt	145
Thr Val Ser Met Asn Pro Pro Trp Asn Thr Ile Leu Lys Asp Asp Ser	
35 40 45	
gtg act ctt aca tgt act cgg aac aac tcc ctt gaa gtc gac tct gct	193
Val Thr Leu Thr Cys Thr Arg Asn Asn Ser Leu Glu Val Asp Ser Ala	
50 55 60	
gtg tgg ctc cac aac aac act act tgg caa gag acc act tca cgt ttg	241
Val Trp Leu His Asn Asn Thr Thr Trp Gln Glu Thr Thr Ser Arg Leu	
65 70 75	
gac atc aat aaa gcc caa atc cag gac agt ggg gag tac agg tgt cgg	289
Asp Ile Asn Lys Ala Gln Ile Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Arg	
80 85 90	
gaa aat aga tcc atc ctg agt gat cct gtc tac cta aca gtc ttc aca	337
Glu Asn Arg Ser Ile Leu Ser Asp Pro Val Tyr Leu Thr Val Phe Thr	
95 100 105 110	
gag tgg ctg atc ctt caa gcc tct gcc aac gtc gtc atg gag ggt gag	385
Glu Trp Leu Ile Leu Gln Ala Ser Ala Asn Val Val Met Glu Gly Glu	
115 120 125	
agc ttc ctc atc agg tgc cat agt tgg aag aat ttg agc ctc aca aag	433
Ser Phe Leu Ile Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Leu Ser Leu Thr Lys	
130 135 140	
gtg acc tac tac aag gat ggc atc ccc atc agg tac tgg tac gag aac	481
Val Thr Tyr Tyr Lys Asp Gly Ile Pro Ile Arg Tyr Trp Tyr Glu Asn	
145 150 155	
ttc aac atc tcc att agc aac gtc aca acc aaa aac agc ggc aac tat	529
Phe Asn Ile Ser Ile Ser Asn Val Thr Thr Lys Asn Ser Gly Asn Tyr	

160	165	170	
tcc tgc tca ggc cag atc cag cag aaa ggc tac acc tct aaa gtc ctc Ser Cys Ser Gly Gln Ile Gln Gln Lys Gly Tyr Thr Ser Lys Val Leu			577
175	180	185	190
aac att att gtg aaa aaa gag ccc acc aag caa aac aag tac tcc ggg Asn Ile Ile Val Lys Lys Glu Pro Thr Lys Gln Asn Lys Tyr Ser Gly			625
195	200	205	
cta cac cgc cca cct gat tgt ccc aaa tgc cca gcc cct gaa atg ctg Leu His Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu			673
210	215	220	
gga ggg cct tcg gtc ttc atc ttt ccc ccg aaa ccc aag gac acc ctc Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu			721
225	230	235	
ttg att gcc cga aca cct gag gtc aca tgt gtg gtg gat ctg gac Leu Ile Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp			769
240	245	250	
cca gaa gac cct gag gtg cag atc agc tgg ttc gtg gac ggt aag cag Pro Glu Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln			817
255	260	265	270
atg caa aca gcc aag act cag cct cgt gag gag cag ttc aat ggc acc Met Gln Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr			865
275	280	285	
tac cgt gtg gtc agt gac ctc ccc att ggg cac cag gac tgg ctc aag Tyr Arg Val Val Ser Asp Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys			913
290	295	300	
ggg aag cag ttc acc tgc aaa gtc aac aac aaa gcc ctc cca tcc ccg Gly Lys Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro			961
305	310	315	
atc gag agg acc atc tcc aag gcc aga ggg ctg gcc ata gcc agt gtg Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Leu Ala Ile Ala Ser Val			1009
320	325	330	
tat gtc ctg ccg cca tcc cgg gag gag ttg agc aag aac aca gtc agc Tyr Val Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser			1057
335	340	345	350
ttg aca tgc ctg atc aaa gac ttc ttc ccc cct gac att gat gtg gag Leu Thr Cys Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu			1105
355	360	365	
tgg cag agc aat gga cag cag gag cct gag agt aag tac cgc acg acc Trp Gln Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr			1153
370	375	380	
ctg ccc cag ctg gac gag gac ggg tcc tac ttc ctg tac agc aag ctc Leu Pro Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu			1201
385	390	395	

tct gtg gat aag agc cgc tgg cag cgg gga gac acc ttc ata tgt gcg 1249
 Ser Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala
 400 405 410

gtg atg cat gaa gct cta cac aac cac tac aca cag aaa tcc ctc tcc 1297
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 415 420 425 430

cat 1300
 His

<210> 19
 <211> 431
 <212> PRT 10
 <213> Canine IgE

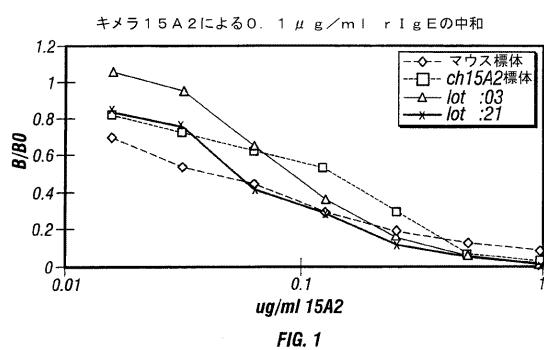
<400> 9
 Met Pro Ala Ser Met Gly Gly Pro Ala Leu Leu Trp Leu Ala Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Ser Ser Pro Gly Val Met Ser Ser Asp Thr Leu Lys Pro Thr Val
 20 25 30
 Ser Met Asn Pro Pro Trp Asn Thr Ile Leu Lys Asp Asp Ser Val Thr
 35 40 45
 Leu Thr Cys Thr Arg Asn Asn Ser Leu Glu Val Asp Ser Ala Val Trp
 50 55 60
 Leu His Asn Asn Thr Thr Trp Gln Glu Thr Thr Ser Arg Leu Asp Ile
 65 70 75 80
 Asn Lys Ala Gln Ile Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Arg Glu Asn
 85 90 95 20
 Arg Ser Ile Leu Ser Asp Pro Val Tyr Leu Thr Val Phe Thr Glu Trp
 100 105 110
 Leu Ile Leu Gln Ala Ser Ala Asn Val Val Met Glu Gly Glu Ser Phe
 115 120 125
 Leu Ile Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Leu Ser Leu Thr Lys Val Thr
 130 135 140
 Tyr Tyr Lys Asp Gly Ile Pro Ile Arg Tyr Trp Tyr Glu Asn Phe Asn
 145 150 155 160
 Ile Ser Ile Ser Asn Val Thr Thr Lys Asn Ser Gly Asn Tyr Ser Cys
 165 170 175
 Ser Gly Gln Ile Gln Gln Lys Gly Tyr Thr Ser Lys Val Leu Asn Ile
 180 185 190 30
 Ile Val Lys Lys Glu Pro Thr Lys Gln Asn Lys Tyr Ser Gly Leu His
 195 200 205
 Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly
 210 215 220
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile
 225 230 235 240
 Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Leu Asp Pro Glu
 245 250 255
 Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln
 260 265 270
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg
 275 280 285
 Val Val Ser Asp Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys

<p>290 295 300</p> <p>Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu 305 310 315 320</p> <p>Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Leu Ala Ile Ala Ser Val Tyr Val 325 330 335</p> <p>Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr 340 345 350</p> <p>Cys Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln 355 360 365</p> <p>Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Leu Pro 370 375 380</p> <p>Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val 385 390 395 400</p> <p>Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met 405 410 415</p> <p>His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser His 420 425 430</p> <p> <210> 10 <211> 431 <212> PRT <213> Mouse</p> <p> <400> 10</p> <p>Met Pro Ala Ser Met Gly Gly Pro Ala Leu Leu Trp Leu Ala Leu Leu 1 5 10 15</p> <p>Leu Ser Ser Pro Gly Val Met Ser Ser Asp Thr Leu Lys Pro Thr Val 20 25 30</p> <p>Ser Met Asn Pro Pro Trp Asn Thr Ile Leu Lys Asp Asp Ser Val Thr 35 40 45</p> <p>Leu Thr Cys Thr Arg Asn Asn Ser Leu Glu Val Asp Ser Ala Val Trp 50 55 60</p> <p>Leu His Asn Asn Thr Thr Trp Gln Glu Thr Thr Ser Arg Leu Asp Ile 65 70 75 80</p> <p>Asn Lys Ala Gln Ile Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Arg Glu Asn 85 90 95</p> <p>Arg Ser Ile Leu Ser Asp Pro Val Tyr Leu Thr Val Phe Thr Glu Trp 100 105 110</p> <p>Leu Ile Leu Gln Ala Ser Ala Asn Val Val Met Glu Gly Glu Ser Phe 115 120 125</p> <p>Leu Ile Arg Cys His Ser Trp Lys Asn Leu Ser Leu Thr Lys Val Thr 130 135 140</p> <p>Tyr Tyr Lys Asp Gly Ile Pro Ile Arg Tyr Trp Tyr Glu Asn Phe Asn 145 150 155 160</p> <p>Ile Ser Ile Ser Asn Val Thr Thr Lys Asn Ser Gly Asn Tyr Ser Cys 165 170 175</p> <p>Ser Gly Gln Ile Gln Gln Lys Gly Tyr Thr Ser Lys Val Leu Asn Ile 180 185 190</p> <p>Ile Val Lys Lys Glu Pro Thr Lys Gln Asn Lys Tyr Ser Gly Leu His 195 200 205</p> <p>Arg Pro Pro Asp Cys Pro Lys Cys Pro Ala Pro Glu Met Leu Gly Gly 210 215 220</p> <p>Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Leu Ile 225 230 235 240</p> <p>Ala Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Leu Asp Pro Glu 245 250 255</p> <p>Asp Pro Glu Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asp Gly Lys Gln Met Gln</p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
--	-------------------------------

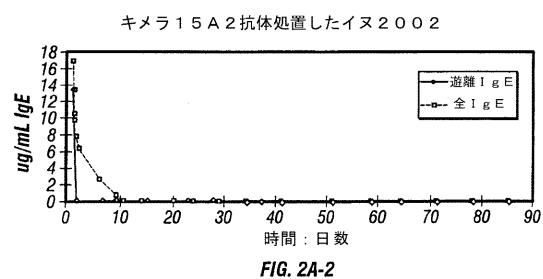
260 265 270
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg
 275 280 285
 Val Val Ser Asp Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys
 290 295 300
 Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 305 310 315 320
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Leu Ala Ile Ala Ser Val Tyr Val
 325 330 335
 Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Leu Ser Lys Asn Thr Val Ser Leu Thr
 340 345 350
 Cys Leu Ile Lys Asp Phe Phe Pro Asp Ile Asp Val Glu Trp Gln
 355 360 365
 Ser Asn Gly Gln Gln Glu Pro Glu Ser Lys Tyr Arg Thr Thr Leu Pro
 370 375 380
 Gln Leu Asp Glu Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val
 385 390 395 400
 Asp Lys Ser Arg Trp Gln Arg Gly Asp Thr Phe Ile Cys Ala Val Met
 405 410 415
 His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser His
 420 425 430

10

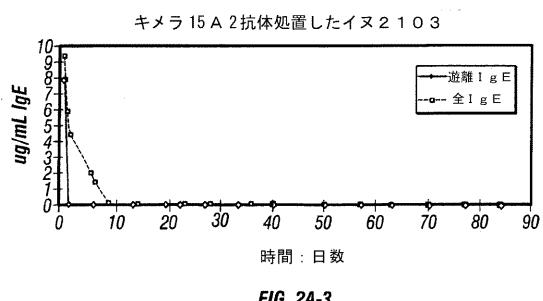
【図1】



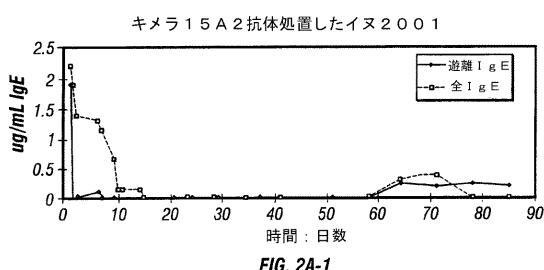
【図2A-2】



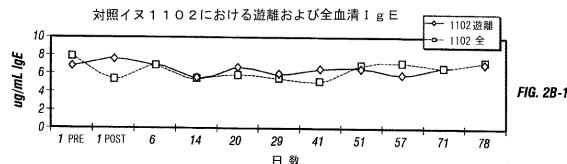
【図2A-3】



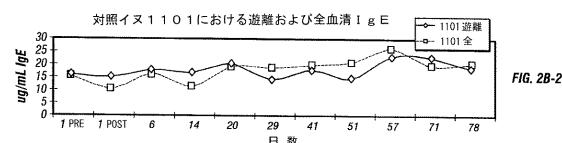
【図2A-1】



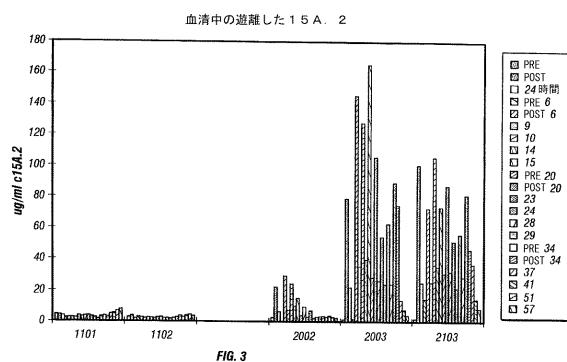
【図2B-1】



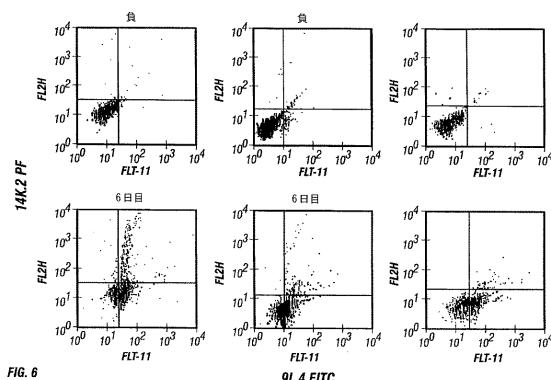
【図2B-2】



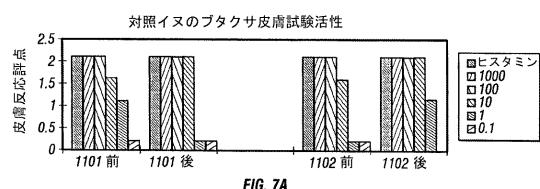
【図3】



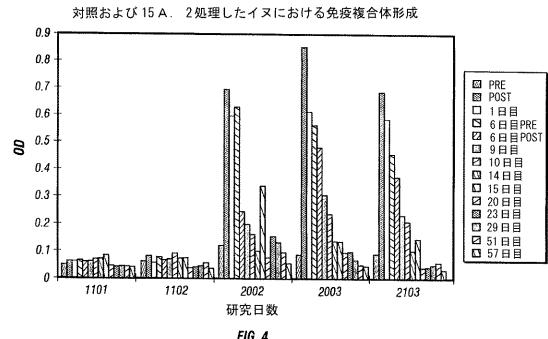
【図6】



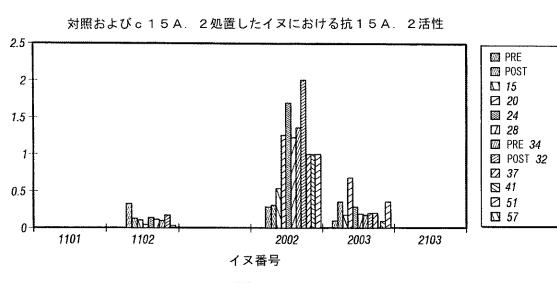
【図7A】



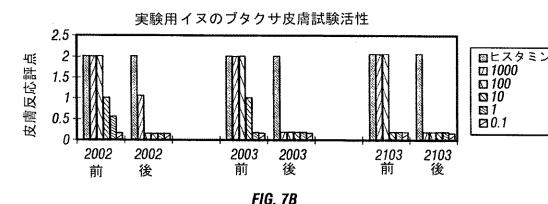
【図4】



【図5】



【図7B】



【図8】

イヌ番号	体重(g)	血液量(ml)	1g E 値(ug/ml)	全遊離IgE(mg)	10X c15A2(mg)
2002	9,300g	558ml	1.61	0.898mg	8.98mg
2003	12,200g	732ml	9.71	7.11mg	71.1mg
2103	8,000g	480ml	8.14	3.91mg	39.1mg
合計					119.18mg
** イヌ血液量 : 体重の 6 %					

FIG. 8

【図9】

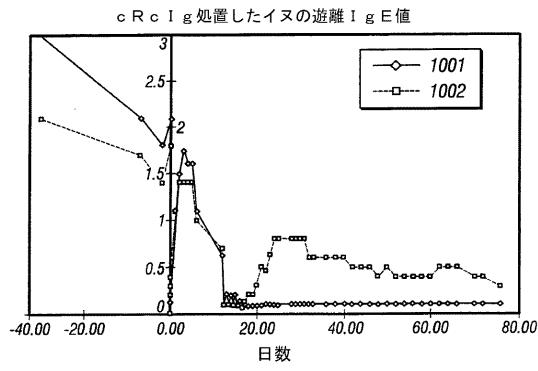


FIG. 9

【図10B】

5701 I L S D P V Y L T V F T E W L I
GTTAGGACTCA CTAGGACACA TGGATGTCGA GAAAGTCCTC ACGGACTAGG
5751 L Q A S A N V V M E G E S F L I R
TTCAAGCCTC TGCAACTG GTGATGGAG GTGATGAGCTT CCTGATCAGG
AAGTGGAG ACCTGGAC CACGGTCA CACTCTCGA GGAGCTAGTC
5801 C H S W K N L R L T K V T Y Y K D
TGCCATAGTT GGAGGAAATT GAGGTCAACA AAGGTGACCT ACTACAAAGGA
ACGGATCAA CCTCTCAA CTCCGAGTGT TTCCACTGGA TGATGTTCT
5851 G I P I R Y W Y E N F N I S I S
TGGCATCCCC ATAGGACT GGTAGGAGA CTTCACATC TCCATTAGCA
ACCGTAGGGG TAGTCATGA CCATGCTCTT GAGGTTGAG AGGTATCGT
5901 N V T T K N S G N Y S C S G Q I Q
ACGTCACAC CAAAAACAGC GGCACATT CCTGNCAGG CCACATCCAG
TGAGGTTG GTTGTGCG CGCTGATAA GGACGAGTCC GGTTAGGTC
5951 Q K G Y T S K V L N I I V K K E P
CAGAAAGGCT ACACCTCAA AGTCCTCAA ATTATGTA AAAAGAGCC
GTCTTTCGA TGTGGAGTT TCAGGAGTGT TATTAACACT TTITCTGG

FIG. 10B

【図10C】

6001 T K Q N K Y S G L H R P P D C P
CCCCAGCAA AACAAACTACT CGGCCCTACA COGGCACCT GATGTCACA
GTGGTCTGTT TTGTCATGA GGCGGATGT GSCGGGGAA CTACAGGGT
6051 K C P A P E M L G G P S V F I F P
AATGCCAGC CCTGAAATG CTGGAGGC CTTCGCTCTT CATOTTCCC
TTACGGTCTG GGGACTTAC GACCCCTCG GAGGCCAGA GTGAAAGGG
6101 P K P K D T L L I A R T P E V T C
CGAACACCA AGGACACCTT CTGTGSGA GAACTACCG CGAACACCTG AGGCACATG
GGCTTGGGT TCTGTGSGA GAACTACCG GCTGTGAC TCCAGTGTAC
6151 V V D L D P E D P E V Q I S W
TGTGGTGTG GATCTGGACC CAGAGACCC TGAAGTCAG ATCAGCTGT
ACACCAACAC CTAGACCTGG GTCTCTGG ACTCACGTC TAGICGACCA

FIG. 10C

【図10A】

10 A
5401 M P A S M G G P A L L W L A
CCGCGAGATG CCGCTCTCA TGCCCTGCTG TGCTAGGC
GGCGCTCTAC GGCGAAGGT ACCCTCCGGG ACCGAGGAC ACCGATCCCG
5451 L L S S P G V M S S D T L K P T
TGCTGCTCTC CTCTCCAGT GTCATGCTT CAGATGCTT GAAACCTCA
ACGACGAGAG GAGGGTCA CAGTCAGGA GTCTATGAA CTTGGATGT
5501 V S M N P P W N T I L K D D S V T
GTGTCATGA ACCGGCATG GAATAAATAA TIGAAGGATG ACACTGAGC
CAGAGTACT TGGCGGTAC CTATGTTA ACTCUCCTTA ACTCGACTCT
5551 L T C T G N N S L E V D S A V W
AGAATGTCAGA TGACCCCTGT TGAGGAACT TCAGCTGAGA CGCACACCG
5601 L H N N T T W Q E T T S R I D I N
TCCACBACAA CACTACTG CAAGAGACA CPTCACGTT GGATCATAT
AGGTGGTGT GTGATGAAAC GTTCCTCTGT GAAGTGGAA CCCTGATGTA
5651 K A Q I Q D S G E Y R C R E N R S
ANAGCCAAA TCCAGGAGAG TGGGAGTAC AGTGTGGGG AAATAGTC
GTCAAAATTAC CGTGGATGGC ACACCAAGTCAC CNGGAGGGT AACCGGTGCT
TTTCGGGTT AGGTGGTGTG ACCCCCTCATG TCCACACCC TTTPATCATG

FIG. 10A

6301 D W L K G K Q F T C K V N N K A [CCTGACCGAG TICCCCTTCG TCAAATGGAC AGTTCACCTG CAAAGTCAAC AACAAAGCCC 1 0 D]
 6351 L P S P I E R T I S K A R G L A I AGGGTAGGGG CTAGCTTCG ACCATCTCCG AGCCAGAGG GCTGGCCATA CGACCGCAT 1 0 D]
 6401 A S V Y V L P P S R E E L S K N T GCGAGTGT ATTCCTGC GCATCCCG GAGGAGTGA GCAGAACAC CGGTACACCA TAGAGGGG CGGTAGGGC CTCCTCAACT CGTTCTCTG SmaI, XbaI, AvrI

FIG. 10D

6451 AGTCAGCTTG ACATGCTGA TCAAAGACT CTICCCCTCT GACATTGATG TCAGTCGAAC TGAACGAACT AGTTCCTGAA GAAGGGGGAA CTGTAACATAC 1 0 D]
 6501 V E W Q S N G Q Q P E S K Y R T TGGAGTGGCA GAGCAATGG CAGCAGGAGC CTGAGGTAA GTACCTCATI CATGGCTGC ACCTAACCGT CTCGTTACT GTCGTCCCTCG GACTCTCATI CATGGCTGC 1 0 D]
 6551 T' L P Q L D E D G S Y F L Y S K J ACCCTGCCCA AGCTGGAGA GGACGGCTTC TACTCTCTGT ACAGCAAGCT TGGACGGGG TGGACCTCTC CCTGACCCAGG ATGAAAGGACA TGTCGTTGAG S P G K

FIG. 10E

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 7 1
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	9/08	
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08	

(72)発明者 ウエンディ・ダブリュー・リュー

アメリカ合衆国4 4 1 2 2 オハイオ州シェイカー・ハイツ、ワインブルドン・ロード2 4 0 3 6番

(72)発明者 ブライオン・マーマー

アメリカ合衆国0 4 0 9 2 メイン州カンバーランド、リンデン・コート2番

(72)発明者 ホンリアン・グオ

アメリカ合衆国0 4 0 7 4 メイン州スカーバーロウ、トーマス・ドライブ1 1番

(72)発明者 ユージーン・アール・クラー・ザ・サード

アメリカ合衆国0 4 1 0 4 メイン州ポートランド、ヒギンズ・ストリート3 1番

審査官 高山 敏充

(56)参考文献 欧州特許出願公開第0 0 9 5 7 1 1 1 (E P , A 1)

特開平0 4 - 0 4 0 8 9 4 (J P , A)

特開平0 3 - 1 2 3 4 8 9 (J P , A)

特開平0 3 - 0 8 3 5 7 9 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00-15/90

JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)

PubMed

CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIplus(STN)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq