

(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 I

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 N 15/00 Z N A A

C O 7 K 16/42 (2006.01)

C O 7 K 16/42

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 U

A 6 1 P 37/08 (2006.01)

A 6 1 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) 国際出願番号 PCT/US2001/002924
 (87) 国際公開番号 W02001/057090
 (87) 国際公開日 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 ウェストブル
 ック アイデックス ドライブ ワン
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (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 04938 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 04074 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。

【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】

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、増量剤、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%に影響を与えていると予測される。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 (I g E) 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。

【 0 0 0 4 】

さらには、I g E 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。I g E 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I g E 分子のF c 領域が肥満細胞上のF c 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I g E 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I g E 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I g E 全体のレベルはアレルギー疾患の診断手段である。I g E 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 (D 9 を基質に結合させ、抗体をD 9 で捕獲させ、ついでマーカーを有するD 9 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 (「 m A b 」) D 9 を用いた。

【 0 0 0 5 】

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I g E の総量を確立した。しかし、I g E 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関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。

【 0 0 0 6 】

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関するが、イヌでは相関しない。

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ビ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I g G 分子が用いられた。例えば、カボン・ディ (Capon, D.) 、チャモウ・エス (Chamow, S.) ら、「Designing CD4 Immuno adhesins」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 Immuno adhesin」Nature 344 : 667 (1990) ; ハーク・フレンドスコ・エム (Haak - Friendscho 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 ; カボン・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。

【 0 0 0 7 】

一般に、I g G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I g G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5 5 9 3 8 6 1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I g G構造の部分であるかわかっていない。

I g E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、I g E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I g E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I g Eレベルを減少させることが望ましい。

10

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。

20

本発明のもう一つ別の目的はI g E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I g Eが組成物と結合することで、このI g E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I g E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I g E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I g E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I g E受容体の合成および発現をダウンレ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I g E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I g E応答が減少または排除される。「遊離した血清I g E」とは、高アフィニティー性I g E受容体に結合することができるI g Eであって、血清中の結合していないI g Eを意味する。

30

【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I g Eの排除を7日間、あるいはさらに短期間維持することで、I g E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。I g E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。

40

好ましい具体例において、本発明のキメラ抗-I g E分子の特異性および構造をI g E + 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I g E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I g Eに特異的に結合するI g E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」)であってもよく、そのmAbはイヌI g Eのエキソン3に対してアフィニティーを有すること

50

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変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、I g G 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I g E が別のI g E 受容体に結合することを妨げることができる。その別のI g E 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るともよい。

【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I g E 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I g E レベルの低下をもたらすことができ、あるいはI g E をB細胞に結合させて、つづいてB細胞のクローン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I g E の結合をもたらし、あるいは治療されるイヌにおけるI g E の産生の阻害をもたらすこともできる。本発明の方法の血清I g E レベルの低下は、I g E と、肥満細胞または好塩基球上にあってもよいI g E 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こ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とを理解するであろう。

【0014】

イヌI g E 受容体：イヌI g E 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I g E 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クローン：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合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なって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I g E 受容体またはイヌの他のI g E 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。

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。

【 0 0 1 6 】

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つの連続領域。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。

【 0 0 1 7 】

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

【 0 0 1 8 】

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変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-IgEモノクローナル抗体の使用が米国特許第5593861号（マエダら）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

【 0 0 1 9 】

本発明のイヌ抗-IgEmAb組成物はイヌおよびマウスIgG1の組換え体またはキメラ構造物であってもよい。該分子は、イヌIgG1不変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IgG1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する。

50

本明細書において使用されるイヌ抗 - I g E m A b、キメラ m A b、組換え m A b 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 - I g E m A b 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 I g E 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 - I g E m A b および受容体は I g E 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、I g E 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。

【 0 0 2 0 】

本発明の具体例において、本発明のキメライヌ抗 - I g E m A b および受容体は、I g E 分子上の結合部位を遮断することにより、さもなければ I g E のその受容体への結合を干渉することにより、I g E が肥満細胞または好塩基球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 - I g E m A b および受容体はまた、血漿中の可溶性 I g E 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 - I g E m A b または受容体は、I g E を B - 細胞と結合させ、I g E + 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 - I g E m A b または受容体はまた、I g E 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、m A b 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 I g E 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 I g E、すなわち遊離した I g E の結合は、通常、エキソン 3 領域の血清 I g E 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 I g E 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 I g E 合成を行うことができる。

【 0 0 2 1 】

もう一つ別の具体例において、本発明のキメライヌ抗 - I g E m A b または受容体は I g G 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 - I g E m A b 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 - I g E m A b 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。

【 0 0 2 2 】

同様に、投与されるキメライヌ抗 - I g E m A b または受容体の用量は、使用される I g E 長鎖イソタイプの特徴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 - I g E m A b 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、有利であると考えられると考慮される。

このキメライヌ抗 - I g E m A b 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 I g E レベルを減少させ、および / または I g E 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。

【 0 0 2 3 】

一般に、本発明の処方、イヌ抗 - I g E m A b 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 - I g E m A b 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増量剤、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 - I g E m A b または受容体は滅菌 P B S 中の蛋白の溶液として処方することができる。

【 0 0 2 4 】

本発明のキメライヌ抗 - I g E m A b または受容体は、I g E 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 m A b または受容体と I g E の間の結合を強化するように投与することができる。これらの方法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 - I g E m A b 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、m A b または受容体は、懸濁液、錠剤、カプセルあるいは経口、経直腸または経膈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 1 5 A . 2 m A b 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。

【 0 0 2 5 】

実施例 I : マウス 1 5 A . 2 可変領域のクローニング

マウスモノクローナル 1 5 A . 2 可変領域を 1 5 A . 2 ハイブリドーマ細胞から R T - P C R によりクローン化した。マウスハイブリドーマ細胞株から I g V h および I g V l の m R N A の逆転写および増幅用の一式の縮重 P C R プライマーからなる市販のキット (ノバゲン (N o v a g e n) 、マディソン、W I 、I g - 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 1 5 A . 2 m R N A をクローン化するためのプライマー源として使用した。I g V h ドメイン用 5 ' および 3 ' プライマーはそれぞれ M u I g V h 5 ' - B および M u I g M v h 3 ' - 1 であった。M u I g V h 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 T C C T (配列番号 2) を有する。M u I g M v h 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。I g V l ドメイン用の 5 ' および 3 ' プライマーはそれぞれ M u I g V l 5 ' - A および M u I g V l 3 ' - 1 であった。1 5 A . 2 の I g V h および I g V l 可変ドメインをコードする m R N A を逆転写し、増幅させ、クローン化した。M u I g V l 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。M u I g V l 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。

【 0 0 2 6 】

P C R 反応は以下のように行った :

酵素 : T a q ポリメラーゼ

1) 9 4 2 0 秒 3 5 サイクル

6 0 5 8 秒

7 2 2 0 秒

2) 4 保持

1 5 A . 2 の I g V h および I g V l 可変ドメインの適当なクローンを、制限酵素分析および D N A 配列分析を用いて同定した。周知のマウス I g V h および I g V l 遺伝子とこれらの D N A 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。

【 0 0 2 7 】

実施例 I I : イヌ I g G 定常領域のクローニング

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 によりクローン化した。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 産生物をクローン化し、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ンを、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 】

機能的クローンの同定

1 5 A . 2 キメラ長および短鎖の機能的クローンを 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ンを、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 GCTGGGTTT TCTCTTTCTC
CTGTCAGTAA CTGCGGGTGT GTTCTCTGAG
GTTTCAGCTGC AGCAGTCTGG ACCTGAGCTG
GTGAAGCCTG GGGCTTCAGT GAAGATATCC
TGCAAGGCTT CTGGTTACTC ATTTACTGAC
TACTTTATGA ACTGGGTGAT GCAGAGCCAT
GGAAAGAGCC TTGAGTGGAT TGGTCGTATT
AATCCTTTCA ATGGTGATCC TTTCTACAAC
CAGAAGTTCA AGGGCAAGGC CACATTGACT
GTAGACAAAT CCTCTAGCAC AGCCACATG
GAGCTCCGGA GCCTGGCATC TGAGGACTCT
GCAGTCTATT ATTGTGCAAG ATTCTACTAC
GGACGTTACT ATGCTATGGA CTA CTGGGGT
CAAGGAACCT CAGTCACCGT CTCCTCAGCC
TCCACCACGG CCCCCTCGGT TTTCCCCTG
GACCCACAGT GCGGGTCCAC TTCCGGCTCC
ACGGTGGCCC TGGCCTGCCT GGTGTCAGGC
TACTTCCCCG AGCCTGTAAC TGTGTCCTGG
AATTCCGGCT CCTTGACCAG CGGTGTGCAC
ACCTTCCCGT CCGACCTGCA GTCCTCAGGG
CTCTACTCCC TCAGCAGCAT GGTGACAGTG
CCCTCCAGCA GGTGGTCCAG CGAGACCTTC
ACCTGCAACG TGGCCACCCC GGCCAGCAAA
ACTAAAGTAG ACAAGCCAGT GCCCAAAGA
GAAAATGGAA GAGTTCCTCG CCCACCTGAT
TGTCCCAAAT GCCCAGCCCC TGAAATGCTG
GGAGGGCCTT CGGTCTTCAT CTTTCCCCCG
AAACCCAAGG ACACCCTCTT GATTGCCCGA

```

10

20

```

ACACCTGAGG TCACATGTGT GGTGGTGGAT
CTGGGACCAG AAGACCCTGA GGTGCAGATC
AGCTGGTTCG TGGACGGTAA GCAGATGCAA
ACAGCCAAGA CTCAGCCTCG TGAGGAGCAG
TTCAATGGCA CCTACCGTGT GGTCAAGTGT
CTCCCCATTG GGCACCAGGA CTGGCTCAAG
GGGAAGCAGT TCACGTGCAA AGTCAACAAC
AAAGCCCTCC CATCCCCGAT CGAGAGGACC
ATCTCCAAGG CCAGAGGGCA GGCCCATCAG
CCCAGTGTGT ATGTCCTGCC GCCATCCCGG
GAGGAGTTGA GCAAGAACAC AGTCAGCTTG
ACATGCCTGA TCAAAGACTT CTTCCACCT
GACATTGATG TGGAGTGGCA GAGCAATGGA
CAGCAGGAGC CTGAGAGCAA GTACCGCACG
ACCCCGCCCC AGCTGGACGA GGACGGGTCC
TACTTCCTGT ACAGCAAGCT CTCTGTGGAC
AAGAGCCGCT GGCAGCGGGG AGACACCTTC
ATATGTGCGG TGATGCATGA AGCTCTACAC
CACAGAAATC CCTCTCCCAT TCTCCGGGTA
AATGA

```

30

40

キメラ15A、2短鎖DNA配列（配列番号4）

ATGGCCTGGA TTTCACTCTT ATTCTCTCTC
 CTGGCTCTCA GCTCAGGGGC CATTTCCCAG
 GCTGTTGTGA CTCAGGAATC TGCACTCACC
 ACATCACCTG GTGAAACAGT CACACTCACT
 TGTCGCTCAA GTACTGGGGC TGTTACAACT
 AGTAACTATG CCAACTGGGT CCAAGAAAAA
 CCAGATCATT TATTCAGTGG TCTAATAGGT
 GGTCCCAACA ACCGAGCTCC AGGTGTTCTT
 GCCAGATTCT CAGGCTCCCT GATTGGAGAC
 AAGGCTGCCC TCACCATCAC AGGGGCACAG
 ACTGAGGATG AGGCAATATA TTTCTGTGCT
 CTATGGTACA GCAACCATTG GGTGTTCTGG
 GGAGGAACCA AACTGACTGT CCTAGGCCAG
 CCCAAGGCCT CCCCCTCGGT CACACTCTTC
 CCGCCCTCCT CTGAGGAGCT CGGCGCCAAC
 AAGGCCACCC TGGTGTGCCT CATCAGCGAC
 TTCTACCCCA GCGGCGTGAC GGTGGCCTGG
 AAGGCAAGCG GCAGCCCCGT CACCCAGGGC
 GTGGAGACCA CCAAGCCCTC CAAGCAGAGC
 AACAACAAGT ACGCGGCCAG CAGCTACCTG
 AGCCTGACGC CTGACAAGTG GAAATCTCAC
 AGCAGCTTCA GCTGCCTGGT CACGCACGAG
 GGGAGCACCG TGGAGAAGAA GGTGGCCCCC
 GCAGAGTGCT CTTAG

10

20

【0032】

実施例IV：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産生するために、バキ
 ュロウィルス発現系を用いた。バキュロウィ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、ファーミンゲン社（PharMin
 gen）（サンディエゴ、CA）のバキュロウィルスに組換えるためのpAcLIC
 バキュロウィルストランスファクター中にクローン化した。キメラ15A、2短鎖D
 NAを、ファーミンゲン社のバキュロウィルスに組換えるためのpAcHisNT-A
 （商標登録）バキュロウィルス輸送ベクター中にクローン化した。両方のウィルス構築物
 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Hi
 gh 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：

30

感染用High Five細胞密度： $1.5 \times 10^6 / \text{ml}$

長鎖ウィルス感染用MOI：10

短鎖ウィルス感染用MOI：3

タンパク質発現の時間：72時間

40

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（MIL
 LIGUARD）（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

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(pH7.2)および4%グリセロール、25mMクエン酸ナトリウム緩衝液(pH2.5)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pH4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(pH7.2)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、0.2μm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：

0.7xPBS

6.5mM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IV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にまとめる。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(Lovallace 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1ng/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ったことを示す。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

15A.2抗体でのエライザ固相捕捉、イヌIgEのエキソン4を認識する別のHRPO接合mAbである14K.2での検出からなる。該アッセイはc15A.2に結合しないすべての血清IgEを検出する。

【0038】

c15A.2と結合した全IgEは、おそらく、再循環するためそのIgEは実験用イヌにおける遊離したIgE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mAb14K.2でのエライザ捕捉およびc15A.2に結合することを阻害しない別の抗イヌIgEmAb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IgE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IgEは約200ng/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IgEを一掃すること；および(2)IgE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IgE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IgE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-IgEmAb15A.2の投与後、血清IgE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VI：c15A.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15A.2の存在を、ポリクロナルヤギ抗イヌIgG接合体により検出する組換えイヌIgE固相を用いてエライザにより調べた。図3は、血清中のc15A.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c15A.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($X \mu g/ml$)である。c15A.2およびイヌIgEの免疫複合体を、14K.2固相のエライザにより測定し、ポリクロナル抗-イヌIgGfc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IgE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的に下降することを示す。28日までは、c15A.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IgE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c15A.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15A.2を投与すると、この反応が増大し、イヌ2002におけるc15A.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

40

【0041】

実施例VII：イヌ抗-IgEmAb15A.2(c15A.2)の投与による好塩基球上の高アフィニティーIgE受容体の発現のレベルへの効果

c15A.2投与開始後の5日、14日、および29日に、10ml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ーIgE受容体mAb9L.4およびPE接合14K.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

50

の数は c 1 5 A . 2 の投与と経時的に減少する。該データは、好塩基球における高アフィニティー I g 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。経時的に血清 I g E の排除が好塩基球上の I g E 受容体の発現の減少をもたらす、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 I g 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 - I g 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 1 0 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 1 0 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的に増加した。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 I g 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 I g E 受容体と I g 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 I g E + B - 細胞を標的とするために設計したキメライヌ抗 - I g 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 I g として含む形態の本発明のイヌ抗 - I g 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 I g 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 - I g E m A b をイヌに投与する。この m A b は血清中の I g E、および肥満細胞または好塩基球上の I g E ではなく、I g E 産生 B - 細胞の表面上の I g E に結合する。それゆえ、I g E 合成は減少または排除される。結果として減じた I g E レベルは肥満細胞 I g 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 I g E 受容体を意味する c R c I g の、昆虫細胞中のクローニングおよび発現

イヌ I g 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。

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ィ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ィルスに感染させた。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 1 0 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 によりクローン化した。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 をファーマーゲン社のバキュロウィルス p A c H i s T N A ベクター中にクローン化した。該ウィルスを 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 9 5 % の純度を有し、将来使用するために - 8 0 °C 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 5 0 % 中和に必要な量の 1 0 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 2 0 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 】

イヌ 1 0 0 1 において、血清 I g E は組換え I g 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 1 0 0 2 において、血清 I g 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 1 0 0 2 において、血清 I g 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 1 0 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 I g E レベルを示す。これらのデータは、循環している I g 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 I g E は利用できないが、おそらく、c R c I g と複合した全 I g 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 I g E を明らかにすること；および (2) I g 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。

10

【 0 0 4 8 】

実施例 X I I : イヌ I g E に結合し、I g 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 I g E に結合し、I g 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、I g E と結合した場合、I g 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 I g E、好ましくは I g E のエキソン 3 に結合可能で、この I g E が I g 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 I g E に結合していてもよい。

それゆえ、別の例において、イヌ I g 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 I g E および、肥満細胞または好塩基球上の I g E ではなく、I g E 産生 B - 細胞の表面上の I g E に結合する。I g 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 I g E レベルは肥満細胞における I g 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。

20

【 0 0 4 9 】

実施例 X I V : イヌ I g E に結合し、I g E 受容体へ結合するのを妨げ、および / または B - 細胞上の I g E に結合し、I g 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 I g E が I g 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 I g 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、I g E 受容体に結合することを阻害する。

30

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 I g E および肥満細胞または好塩基球上の I g E ではなく、I g E 産生 B - 細胞の表面上の I g E に結合する。したがって、I g 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 I g E レベルは肥満細胞中の I g 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。

【 0 0 5 0 】

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。

40

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。本明細書に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】 I g E が組換えイヌ I g E 受容体と結合することを阻害するキメラ 1 5 A . 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 1 5 A . 2 活性に関

50

する経時的データを示す。

【図3】 c15A.2と称される組換えキメラ抗-IgEmAb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IgE）の循環しているIgEレベルに関する経時的データを示す。このmAb15A.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c15A.2と複合したIgE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15A.2活性に関する経時的データを示す。

10

【図6】 キメラ抗-15A.2mAb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、PE-標識した抗-エキソン4イヌIgEmAb14K.2およびFITC-標識した抗-イヌIgE受容体mAb9L.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】 c15A.2mAb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】 cRcIgと称される組換え受容体-IgGアンタゴニストを投与した後の、イヌ1001および1002における循環している遊離したIgE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1001および1002の遊離したIgEおよび全体としてのIgEを示す。

20

【図10】 組換えIgE受容体cRcIgのDNA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

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 1

gggaattcat graattgsac tgggtywtgc tctt 34

<210> 2

<211> 39

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 2

actagtcgac atggactcca ggctcaattt agttttcct 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 ggcttggayt ycwctywtmy tct 33

<210> 5

<211> 35

<212> DNA

10

20

30

<213> Murine

<400> 5

cccaagctta gctcycowgw ggatgggyggy ggraa

35

<210> 6

<211> 1425

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 6

atg	aaa	tgg	agc	tgg	gtt	ttt	ctc	ttt	ctc	ctg	tca	gta	act	gcg	ggt	48
gtg	ttc	tct	gag	gtt	cag	ctg	cag	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	tgc	gtt	ttc	cca	ctg	gac	ccc	agc	tgc	ggg	tcc	act	tcc	ggc	tcc	480
acg	gtg	gcc	ctg	gcc	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	ggt	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	ccg	cca	tcc	cgg	gag	gag	ttg	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

<210> 7

<211> 705

<212> DNA

<213> Mouse

<400> 7

atggcctgga	tttcaactctt	attctctctc	ctggetctca	gctcaggggc	catttcccag	60
gctgttgtga	ctcaggaatc	tgcactcacc	acatcacctg	gtgaaacagt	cacactcact	120
tgtcgctcaa	gtactggggc	tggtacaact	agtaactatg	ccaactgggt	ccaagaaaaa	180
ccagatcatt	tattcaactgg	tctaataagg	ggtecccaaca	accgagctcc	aggtgttcct	240
gccagattct	caggctccct	gattggagac	aaggctgccc	tcaccatcac	aggggcacag	300
actgaggatg	aggcaatata	tttctgtgct	ctatgggtaca	gcaaccattg	ggtgttcggt	360
ggaggaacca	aactgactgt	cctaggccag	ccaaggcct	ccccctcggt	cacactcttc	420
ccgccctcct	ctgaggagct	cggcgccaac	aaggccaccc	tgggtgtgct	catcagcgac	480
ttctacccca	gcggcggtgac	ggtggcctgg	aaggcaagcg	gcagccccgt	caccaggggc	540

10

20

30

gtggagacca ccaagccctc caagcagagc aacaacaagt acgcggccag cagctacctg 600
 agcctgacgc ctgacaagtg gaaatctcac agcagcttca gctgcctggt cagcacgag 660
 gggagcaccg tggagaagaa ggtggccccc gcagagtgc cttag 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 gtg 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 gtg gtg 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

10

20

30

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

10

20

30

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
 <213> Canine IgE

10

<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			
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			
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	

20

30

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 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

<210> 10
 <211> 431
 <212> PRT
 <213> Mouse

<400> 10
 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
 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
 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

10

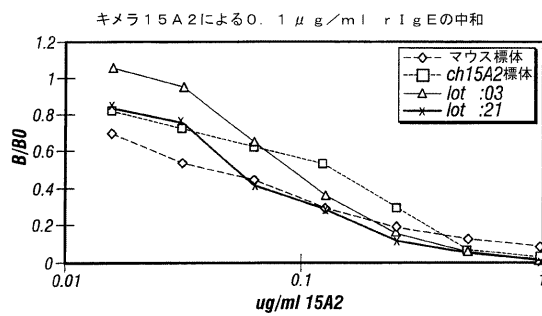
20

30

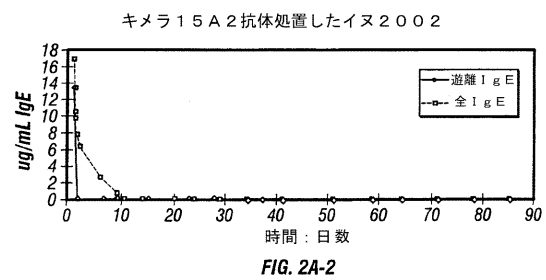
260 265 270
 Thr Ala Lys Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Gly Thr Tyr Arg
 275 280 285
 Val Val Ser Asp Leu Pro Ile Gly His Gln Asp Trp Leu Lys Gly Lys
 290 295 300
 Gln Phe Thr Cys Lys Val Asn Asn Lys Ala Leu Pro Ser Pro Ile Glu
 305 310 315 320
 Arg Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Leu Ala Ile Ala Ser 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 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

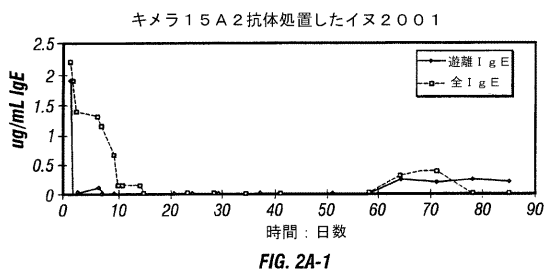
【図 1】



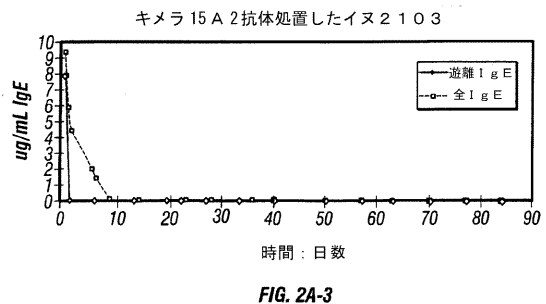
【図 2 A - 2】



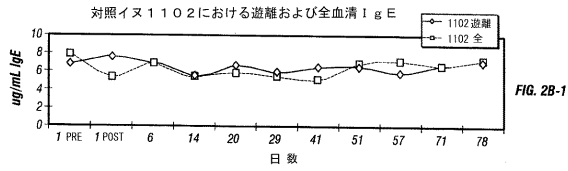
【図 2 A - 1】



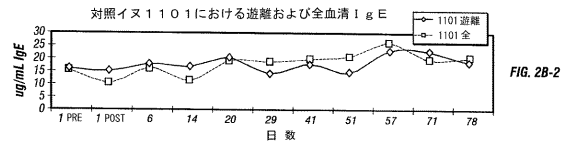
【図 2 A - 3】



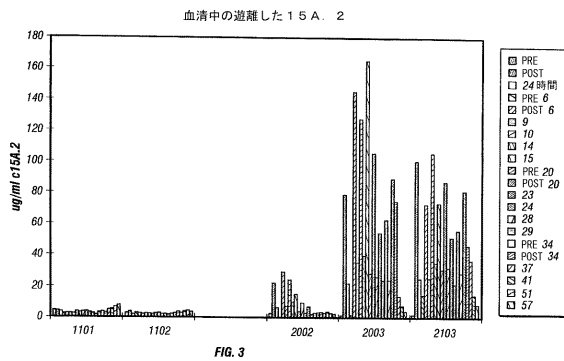
【図 2 B - 1】



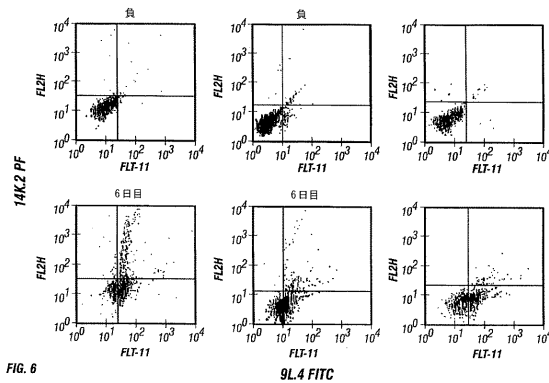
【図 2 B - 2】



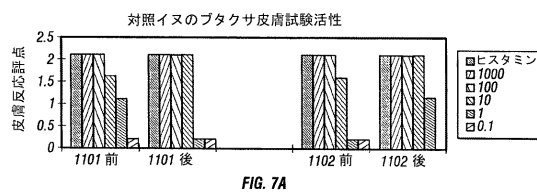
【図 3】



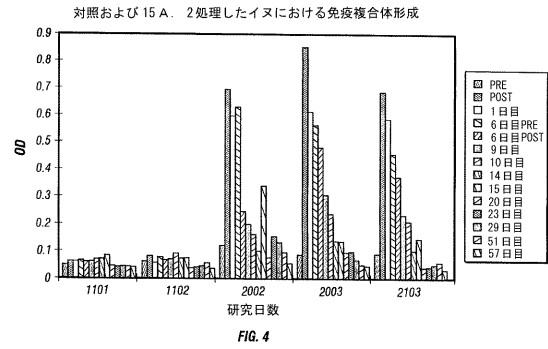
【図 6】



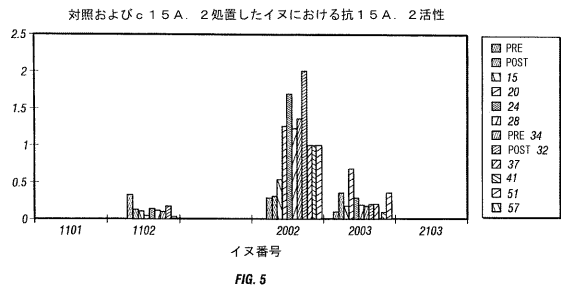
【図 7 A】



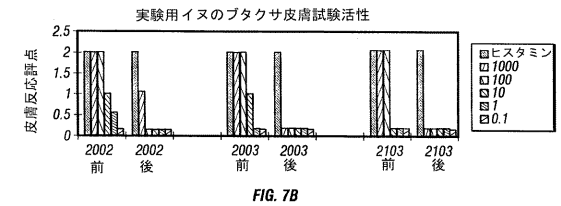
【図 4】



【図 5】



【図 7 B】



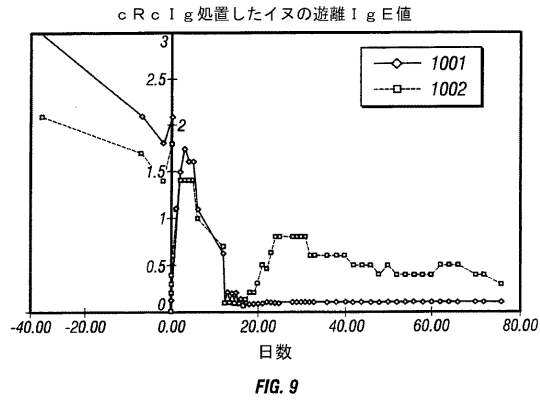
【図 8】

イヌ番号	体重 (g)	血液量 (ml)	I g E 値 (ug/ml)	全遊離 I g E (mg)	10X c15A2 (mg)
2002	9,300g	558 ml	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】



【図 10 B】

5701 I L S D P V Y L T V F T E W L I
CATCCTGAGT GATCCTGTGT ACCTAACAGT CTTACACAGAG TGGCTGATCC
GTAGGACTCA CTAGGACACA TGGATTGTCA GAAGTGTCTC ACCGACTAGG

5751 L Q A S A N V V M E G E S F L I R
TTCAAGCCTC TGCACGCTG GTGATGGAGG GTGAGAGTT CCTCATCAGG
AAGTTCCGGAG ACGGTTCCAC CACTACCTCC CACTCTCGAA GGAGTAGTCC

5801 C H S W K N L R L T K V T Y Y K D
TGCCATAGTT GGAAGAATTT GAGGTCACA AAGGTGACCT ACTACAAGGA
ACGGTATCAA CCTTCATTAA CTCGAGTGT TTCCACTGSA TGATGTTCTT

5851 G I P I R Y W Y E N F N I S I S
TGGCATCCOC ATCAGGTAFT GGTACGAGAA CTTCAACATC TCATTAGCA
ACCGTAGGG TAGTCCATGA CCAATGCTTT GAAGTTGTAG AGTAATCTGT

5901 N V T T K N S G N Y S C S G Q I Q
ACGTACACAC CAAAACAGC GCAACTATT CTGCTCAGG CCACATCCAG
TGCAGTGTG GTTTTGTGCG CCGTTGATAA GGACGAGTCC GGCTAGGTC

5951 Q K G Y T S K V L N I I V K K E P
CAGAAAGGCT ACACCTTAA AGTCTCTAAC ATTATTGTGA AAAAGAGCC
GTCTTTTCOA TGTGGAGATT TCAGGAGTTG TAATAACACT TTTTTCGG

FIG. 10B

【図 10 A】

5401 M P A S M G G P A L L W L A
CCGCGAGATG CCTGTTTCCA TGGGAGGCC TGCCCTGCTG TGGCTAGGCG
GGCGCTCTAC GGACGAGGT ACCCTCCGGG ACGGAGGAC ACCGATCCCG

5451 L L L S S P G V M S S D T L K P T
TGCTGCTCTC CTCTCCAGGT GTCATGTCTAT CAGATACCTTT GAACTCTACA
ACGACGAGAG GAGAGGTCCA CAGTACAGTA GTCTAUGGAA CTTTGGATGT

5501 V S M N P P W N T I L K D D S V T
GTGTCCATGA ACCCGCCATG GAATACAATA TTGAAGGATG ACAGTGTGAC
CACAGGTACT TGGGCGGTAC CTTAAGTTTAT AACTTCTCTAC TGTACACTG

5551 L T C T G N N S L E V D S A V W
TCTTACATGT ACTGGGACA ACTCCCTTGA AGTCAGTCTT GCTGTGTGGC
AGAATGTACA TGACCTTTGT TGAGGGAATC TCAGCTGAGA CGACACACCG

5601 L H N N T T W Q E T T S R L D I N
TCCACACAA CACTACTTGG CAAGACAGA CTTACAGTTT GGACATCAAT
AGGTGTGTGT GTGATGAACC GTTCTCTGCT GAAGTGCAA COTGTAGTTA

5651 K A Q I Q D S G E Y R C R E N R S
AAAGCCAAA TCCAGGACAG TGGGAGGTAC AGGTGTCGGG AAAATPAGATC
TTTCGGGTTT AGGTCTCTGTC ACCCTCATG TCCACAGGCC TTTTATCTAG

FIG. 10A

【図 10 C】

6001 T K Q N K Y S G L H R P P D C P
CACCAAGCAA AACAAAGTACT CCGGCTACA CCGGCCACTT GATTGTCCCA
GTGGTTCGTT TTGTTCTATGA GGCCCGATGT GGCGGTGGA CTAACAGGTT

6051 K C P A P E M L G G P S V F I F P
AATGCCAGC CCTGAAATG CTGGAGGGC CTTGCTGCTT CATCTTTCC
TTACGGGTGC GGGACTTTAC GACCTTCCCG GAAGCCAGAA GTAGAAAGG

6101 P K P K D T L L I A R T P E V T C
CGAARACCA AGGACACCCT CTTGATTGCC CGAACACCTG AGTCTACATG
GGCTTTGGGT TCCTGTGGGA GAACTAACGG GCTTGTGGAC TCCAGTGTAC

6151 V V V D L D P E D P E V Q I S W
TGTGTGTGTG GATCTGGACC CAGAGACCC TGAGGTGACG ATCAGTGTGT
ACACCACCAC CTAGACTGG GTCTTCTGGG ACTCCACGTC TAGTCGACCA

6201 F V D G K Q M Q T A K T Q P R E E
TCGTGACGG TAGCAGATG CAAACAGCA AGACTCAGC TCGTGAGGAG
AGCACCTGCC ATTCTCTAC GTTTGTGCTT TCTGAGTGG AGCACTCCTC

6251 Q F N G T Y R V V S D L P I G H Q
CAGTTCATG GCACCTACCG TGTGTGCTAGT GACCTCCCCA TTGGCACCA
GTCAAGTTAC CGTGGATGCG ACACCACTCA CTGGAGGGGT AACCGTGTGT

FIG. 10C

D W L K G K Q F T C K V N N K A
6301 GGACTGGCTC AAGGGAAGC AGTTACCTG CAAAGTCAAC AACAAAGCCC
 CCTGACCGAG TTCCCTTCG TCAAGTGGAC GTTTCAGTTG TTGTTTCGGG

 L P S P I E R T I S K A R G L A I
6351 TCCCATCCCC GATCGAGAGG ACCATCTCA AGGCCAGAGG GCTGGCCATA
 AGGGTAGGGG CTAGCTCTCC TGGTAGAGT TCCGGTCTCC CGACCGGTAT
 SmaI, XbaI, Aval
 A S V Y V L P P S R E L S K N T
6401 GCCAGTGTGT ATGTCCTGCC GCCATCCGG GAGGAGTTGA GCACAGACAC
 CGGTACACA TACAGGACGG CGGTAGGGCC CTCTCAACT CGTTCTTGTG

 V S L T C L I K D F F P P D I D
6451 AGTCAGCTTG ACATGCCCTGA TCAAGACTT CTTCGCCCTT GACATGATG
 TCAGTCGAC TGTAGGGACT AGTTTCTGAA GAAGGGGGA CTGTAACCTAC

 V E W Q S N G Q Q E P E S K Y R T
6501 TGGAGTGGCA GAGCAATGGA CAGCAGGAGC CTGAGAGTAA GTACGGCAGC
 ACCTACCGT CTCGTACTT GTCGTCTCG GACTCTCATT CATGGCGTGC

 T L P Q L D E D G S Y F L Y S K L
6551 ACCCTGCCCC AGCTGGACGA GGACGGGTCC TACTTCCTGT ACAGCAAGCT
 TGGGACGGGG TCGACCTGCT CCTGCCCAGG ATGAAGGACA TGTCTTTTGA

FIG. 10D

S V D K S R W Q R G D T F I C A
6601 CTCTGTGGAT AAGACCGCT GGACGGGGG AGACACCTTC ATATGTGGG
 GAGACACCTA TTCTCGGGGA CCGTCGCCCC TCTGTGAAG TATACACGCC

 V M H E A L H N H Y T Q K S L S H
6651 TGATGCATGA AGCTCTACAC AACCACTACA CACAGAAATC CCTCTCCCAT
 ACTACGTACT TCGAGATGTG TTGGTGATGT GTGTCTTTAG GGAGAGGGTA

 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 ウェンディ・ダブリュー・リュウ
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、ウィンブルドン・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・クラーク・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. , D B 名)
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus(JDreamII)
PubMed
CAplus/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq