

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載

【部門区分】第1部門第1区分

【発行日】平成19年7月26日(2007.7.26)

【公表番号】特表2006-505277(P2006-505277A)

【公表日】平成18年2月16日(2006.2.16)

【年通号数】公開・登録公報2006-007

【出願番号】特願2004-551530(P2004-551530)

【国際特許分類】

C 1 2 N	15/09	(2006.01)
A 6 1 K	39/395	(2006.01)
A 6 1 K	47/48	(2006.01)
A 6 1 K	49/00	(2006.01)
A 6 1 P	35/02	(2006.01)
A 6 1 P	43/00	(2006.01)
C 0 7 K	1/22	(2006.01)
C 0 7 K	16/28	(2006.01)
C 1 2 N	1/15	(2006.01)
C 1 2 N	1/19	(2006.01)
C 1 2 N	1/21	(2006.01)
C 1 2 P	21/08	(2006.01)
G 0 1 N	33/53	(2006.01)
G 0 1 N	33/574	(2006.01)
C 1 2 N	15/02	(2006.01)
C 1 2 N	5/10	(2006.01)
A 6 1 K	38/00	(2006.01)
A 6 1 K	51/00	(2006.01)

【F I】

C 1 2 N	15/00	Z N A A
A 6 1 K	39/395	D
A 6 1 K	39/395	T
A 6 1 K	47/48	
A 6 1 K	49/00	A
A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00	1 0 5
C 0 7 K	1/22	
C 0 7 K	16/28	
C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	
C 1 2 P	21/08	
G 0 1 N	33/53	D
G 0 1 N	33/53	U
G 0 1 N	33/574	D
C 1 2 N	15/00	C
C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 N	5/00	B
A 6 1 K	37/02	
A 6 1 K	49/02	

【手続補正書】

【提出日】平成19年5月25日(2007.5.25)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0120

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0120】

[170] 2. 1. 表面の予測

[171] 構造が解明されている抗体セットの可変領域残基の溶媒露出度を、ネズミ My 9 - 6 抗体可変領域の表面残基を予測するのに用いた。127の独特的な抗体構造ファイルのセット(図3)について、アミノ酸の溶媒露出度を、NCBソフトウェアパッケージ(Pedersenら、1994年、J. Mol. Biol. 235(3): 959-973)を用いて計算した。この127の構造のセットに由来する、最も類似した10の軽鎖及び重鎖アミノ酸配列を、NCB Iウェブサイト [ncbi.nlm.nih.gov/B](http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)L A S T / の配列整列化ソフトウェアを用いて決定した。これらの10の抗体可変領域の各可変領域残基についての平均溶媒露出度を、エクセル集計表を用いて計算し、そして30%よりも大きな平均露出度を伴う位置を、表面残基とみなした。25%~35%の平均露出度を伴う位置を、両側に隣接する2つの同一な残基を有するこれらの構造のみについて、個々の残基の露出度を計算することによって、さらにみなしした。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0137

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0137】

[201] 種々のcDNAクローン及びペプチド配列解析から得た蓄積データは、図8に示される最終的なネズミ My 9 - 6 軽鎖及び重鎖配列を提供した。Kabat及びAbM定義を用いて、3つの軽鎖及び重鎖CDRを同定した(図8及び9)。NCB I Ig Blastデータベースの検索により、mu My 9 - 6 抗体軽鎖可変領域は、マウスIgV-8-27生殖系列遺伝子に由来する可能性が最も高く、一方、重鎖可変領域は、IgVh V102生殖系列遺伝子に由来する可能性が最も高いことが、示唆される(図10)。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0170

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0170】

【図1】[35] 図1は、競合結合実験の結果を示す。¹²⁵I - 標識 My 9 - 6 抗体(3 × 10⁻⁹M)のCD33陽性U-937細胞への結合を、濃度を増加させたMy 9あるいはMy 9 - 6 抗体の存在下で、アッセイした。

【図2】[36] 図2は、軽鎖シグナル配列に対するMy 9 - 6 縮重プライマーを示す。

【図3】[37] 図3は、mu My 9 - 6 可変領域の表面を予測するのに用いたブルックヘブンのデータベースに由来する、127の抗体構造のファイル名を示す。

【図4】[38] 図4は、16のMy 9 - 6 の表面再構築型ならびにキメラ My 9 - 6 抗体を構築するのに用いたPCRプライマーを示す。

【図5】[39] 図5は、ヒト化抗体を構築しそして発現するのに用いたプラスミドを示す。(A) : 軽鎖クローニングプラスミド。(B) : 重鎖クローニングプラスミド。(C) : 哺乳動物抗体発現プラスミド。

【図6】[40] 図6Aは、R T - P C Rにより生成したm u M y 9 - 6軽鎖のc D N Aクローンに由来するアミノ酸配列と比較した、エドマン配列決定の結果を示す。[41]図6Bは、C D R 1及びC D R 2配列をそれぞれ含有する、1 3 1 9 D a及び1 1 2 2 D aのペプチドフラグメントのM S - M S配列解析による結果を示す。C D R配列は、太字で表す。

【図7】[42] 図7は、1 7 8 8 D aペプチドのM S - M S配列解析による結果、及び2つのc D N Aクローンに由来する対応した配列を示す。

【図8-A】[43] 図8Aは、ネズミM y 9 - 6抗体の軽鎖可変領域のc D N A配列及び推定アミノ酸配列(配列番号95)を示す。3つのC D Rを下線で示す。

【図8-B】[44] 図8Bは、ネズミM y 9 - 6抗体の重鎖可変領域のc D N A配列及び推定アミノ酸配列(配列番号96)を示す。3つのC D Rを下線で示す。

【図9】[45] 図9は、K a b a tの定義によって決定された軽鎖及び重鎖C D Rを示す。

【図10】[46] 図10は、8 - 2 7及びV 1 0 2遺伝子の生殖系列配列とともに整列化させた、ネズミM y 9 - 6抗体の軽鎖及び重鎖アミノ酸配列を示す。点(.)は、配列が同一であることを示す。

【図11-A】[47] 図11A及びBは、ブルックヘブンのデータベースに解明されているファイルを有する、m u M y 9 - 6配列に最も相同意の軽鎖(A)及び重鎖(B)抗体配列を示す。配列を、最も相同意のものから最も相同意でないものへの順番で整列化した。

【図11-B】[47] 図11A及びBは、ブルックヘブンのデータベースに解明されているファイルを有する、m u M y 9 - 6配列に最も相同意の軽鎖(A)及び重鎖(B)抗体配列を示す。配列を、最も相同意のものから最も相同意でないものへの順番で整列化した。

【図12】[48] 図12A及びBは、m u M y 9 - 6抗体軽鎖(A)及び重鎖(B)の各K a b a t位置の平均露出度を示す。10の最も相同意の軽鎖及び重鎖配列の各K a b a t位置の相対的な溶媒露出度を、平均しそしてx軸上に表す。

【図13-A】[49] 図13Aは、M Cソフトウェアを用いて計算した、10の最も相同意の軽鎖構造の残基の溶媒露出度を示し、そして、エクセルを用いて作表した各K a b a t位置の平均を示す。この表は、25%よりも大きな平均溶媒露出度である、C D Rでない位置のデータを示す。表面残基を、30%よりも大きな平均溶媒露出度である残基として定義する。25%~35%の平均露出度である位置を、その位置及び両側に隣接する2つの位置にて同一の残基を有する構造のみの平均露出度を計算することによって、さらに解析した。N Aは、同一の隣接する位置が利用可能でないことを指す。位置15及び70は、最終列に与えられた最終的な表面予測に到達するのに、さらに計算を要した。

【図13-B】[50] 図13Bは、M Cソフトウェアを用いて計算した、10の最も相同意の重鎖構造の残基の溶媒露出度を示し、そして、エクセルを用いて作表した各K a b a t位置の平均を示す。この表は、25%よりも大きな平均溶媒露出度である、C D Rでない位置のデータを示す。表面残基を、30%よりも大きな平均溶媒露出度である残基として定義する。25%~35%の平均露出度である位置を、その位置及び両側に隣接する2つの位置にて同一の残基を有する構造のみの平均露出度を計算することによって、さらに解析した。N Aは、同一の隣接する位置が利用可能でないことを指す。

【図14】[51] 図14は、C D R残基から5以内に入るM y 9 - 6フレームワークの表面残基を示す。

【図15】[52] 図15は、K a b a tデータベースから抽出した上位5つのヒト配列を示す。整列化を、S R(P e d e r s e n, 1 9 9 3年)によって行った。C D Rから5以内に入るm u M y 9 - 6の残基を、下線で示す。

【図16-A】[53] 図16A及びBは、16のヒト化M y 9 - 6軽鎖可変領域配列(A)及び16のヒト化重鎖可変領域配列(B)を、マウスM y 9 - 6と整列化させたものを示す。点(.)は、ヒト化型1.0と配列が同一であることを表す。ネズミとヒトのM y

9 - 6 で異なる表面残基を、下線で示す。

【図 16 - B】[53] 図 16 A 及び B は、16 のヒト化 My 9 - 6 軽鎖可変領域配列 (A) 及び 16 のヒト化重鎖可変領域配列 (B) を、マウス My 9 - 6 と整列化させたものを示す。点 (.) は、ヒト化型 1.0 と配列が同一であることを表す。ネズミとヒトの My 9 - 6 で異なる表面残基を、下線で示す。

【図 17】[54] 図 17 は、HL - 60 膜及び HL - 60 全細胞における直接的結合アッセイならびに HL - 60 膜における競合的結合アッセイによって計算された、My 9 - 6 の K_D 値を示す。N = 2 である * を除き、N = 3。

【図 18】[55] 図 18 は、hu My 9 - 6 V1.0 に対する結合曲線を示す。(A) : HL - 60 膜における直接的結合。(B) : HL - 60 全細胞における直接的結合。(C) : HL - 60 膜における競合的結合。

【図 19】[56] 図 19 は、HL - 60 細胞における My 9 - 6 - DM1 及び My 9 - 6 抗体の結合性を比較したものを示す。

【図 20】[57] 図 20 は、CD33 発現ヒト腫瘍細胞に対する My 9 - 6 - DM1 の in vitro 細胞毒性を示す。

【図 21】[58] 図 21 は、HL - 60 異種移植片を有する SCID マウスにおける、My 9 - 6 - DM1 の有効性実験の結果を示す。HL - 60 腫瘍の増殖における、My 9 - 6 - DM1 (A) 及び修飾されていない My 9 - 6 抗体 (C) の効果を、評価した。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした (B、D)。

【図 22】[59] 図 22 は、HL - 60 異種移植片を有する SCID マウスにおいて、My 9 - 6 - DM1 の有効性を非結合型の薬物であるメイタンシンと比較したものを示す (A)。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした (B)。2 例の治療マウスにおいて再発した腫瘍を、My 9 - 6 - DM1 の第二クールで治療した。

【図 23】[60] 図 23 A 及び B は、大きな HL - 60 異種移植片を有する SCID マウスにおいて、My 9 - 6 - DM1 の抗腫瘍有効性を標準的な化学療法と比較したものを示す (A)。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした (B)。2 例の治療マウスにおいて再発した腫瘍を、My 9 - 6 - DM1 の第二クールで再治療した。

【図 24】[61] 図 24 A 及び B は、HL - 60 生存モデルにおいて、My 9 - 6 - DM1 の抗腫瘍有効性をゲムツズマブ・オゾガマイシン及び標準的な化学療法と比較したものを示す。HL - 60 細胞を、SCID マウスに静脈内注射した。示した治療を、細胞注射後第 11 日に開始した。治療は、ゲムツズマブ・オゾガマイシン (1 日 4 回 × 3) を除き、1 日 1 回 × 5 の静脈内投与であった。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】配列表

【補正方法】変更

【補正の内容】

【配列表】

200650527700001.app