

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4494977号
(P4494977)

(45) 発行日 平成22年6月30日 (2010. 6. 30)

(24) 登録日 平成22年4月16日 (2010. 4. 16)

(51) Int. Cl.		F I	
C 1 2 N	15/09	(2006. 01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A
C 0 7 K	16/28	(2006. 01)	C 0 7 K 16/28
C 0 7 K	19/00	(2006. 01)	C 0 7 K 19/00
A 6 1 K	39/395	(2006. 01)	A 6 1 K 39/395 E
A 6 1 P	35/00	(2006. 01)	A 6 1 P 35/00

請求項の数 5 (全 19 頁)

(21) 出願番号 特願2004-560426 (P2004-560426)
 (86) (22) 出願日 平成15年12月16日 (2003. 12. 16)
 (65) 公表番号 特表2006-521085 (P2006-521085A)
 (43) 公表日 平成18年9月21日 (2006. 9. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2003/014295
 (87) 国際公開番号 W02004/055056
 (87) 国際公開日 平成16年7月1日 (2004. 7. 1)
 審査請求日 平成18年12月12日 (2006. 12. 12)
 (31) 優先権主張番号 60/433, 945
 (32) 優先日 平成14年12月17日 (2002. 12. 17)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591032596
 メルク パテント ゲゼルシャフト ミッ
 ト ベシュレンクテル ハフツング
 Merck Patent Gesell
 schaft mit beschrae
 nkter Haftung
 ドイツ連邦共和国 デー-64293 ダ
 ルムシュタット フランクフルター シュ
 トラーセ 250
 Frankfurter Str. 25
 O, D-64293 Darmstadt
 , Federal Republic o
 f Germany
 (74) 代理人 100123788
 弁理士 宮崎 昭夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 GD2に結合するマウス14. 18抗体のヒト化抗体 (H14. 18) およびそのIL-2融合タンパク質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号5の軽鎖および配列番号6の重鎖を含む、GD2に特異的に結合し免疫機能を刺激するhu14. 18-IL2として示されるヒト化抗体-IL2融合タンパク質。

【請求項2】

請求項1の融合タンパク質をコードする核酸配列を含む配列番号4のヌクレオチド配列を含むベクター。

【請求項3】

請求項1の融合タンパク質と調剤用担体または賦形剤とを含む医薬組成物。

【請求項4】

GD2陽性であるがん患者における、病気の進行を安定化させるための薬剤の製造のための、請求項1に記載の融合タンパク質の使用。

【請求項5】

GD2陽性であるがん患者における、ADCCおよびNK-分解を増加するための薬剤の製造のための、請求項1に記載の融合タンパク質の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は概して改変抗体に関する。より詳細には、本発明は、ヒト細胞表面スフィンゴ糖脂質であるGD2に特異的に結合する、免疫原性が減弱されている改変抗体、およびそ

の治療薬としての使用に関する。

【0002】

(発明の背景)

ここ何年かの間に、抗体をベースにした治療の開発に著しい進歩がある。例えば、試験者は、様々な癌特異的マーカーだけではなく、それらのマーカーに特異的に結合する様々な抗体も同定した。抗体は、選択的に癌細胞を殺す目的で、マーカーを発現する癌細胞に、ある特定の分子、例えば毒素または免疫刺激性部分、例えばサイトカインを送達するのに用いることができる。

【0003】

14.18抗体は、細胞表面スフィンゴ糖脂質であるGD2に対して産生されたマウス由来のモノクローナル抗体である。GD2は、通常、神経細胞の細胞膜外面のみで、かなりのレベルまで発現されるジシアロガングリオシドであるが、神経細胞では、免疫系への曝露が血液脳関門によって制限されている。

10

【0004】

対照的に、多くの腫瘍細胞では、細胞表面にスフィンゴ糖脂質が異常なレベルにまで発現されている。例えば、GD2は、神経芽細胞腫、髄芽腫、星状細胞腫、黒色腫細胞株、小細胞肺癌、骨肉腫、および他の軟組織肉腫を含めた、広範囲の腫瘍細胞の表面に発現される。したがって、GD2は、腫瘍細胞に対して効果的な免疫応答を引き起こし、腫瘍細胞を破壊する目的で、腫瘍細胞を免疫刺激性タンパク質ドメインの標的にするための好都合な腫瘍特異的マーカーである。14.18マウス抗体(m14.18抗体)は、腫瘍細胞をこれらの免疫刺激性タンパク質ドメインの標的にする補助となり得るが、マウス由来のアミノ酸配列によって所望の治療効果が損なわれることがある。

20

【0005】

患者に投与した際、抗体は、宿主哺乳動物内で付随免疫原性(associated immunogenicity)を有することがある。これは、抗体が自家抗体ではないときには、一層起こりやすくなる。この結果、抗体をベースにした治療の有効性が治療抗体に対する免疫原性反応によって制限されることがしばしばある。通常、この免疫原性反応は、その抗体の全部または一部が宿主哺乳動物とは異なる哺乳動物に由来する場合、例えばその抗体がマウスに由来し、かつ受容者がヒトである場合に増強される。

【0006】

ヒトにおける臨床使用では、マウス由来の抗体の免疫原性を減弱させるか、または最小にするために、マウス由来の抗体をヒト抗体により類似するように改変することが有用であり得る。マウス由来の抗体が有する免疫原性は、ヒト抗体の定常部がマウス可変ドメインに融合したキメラ抗体を生成することで減弱させることができる。しかし、残存しているマウス可変ドメインは、通常、依然としてヒトでの免疫原性を有し、したがって、抗体をベースにした治療の有効性を損ない得るものである。

30

【0007】

「ベニアリング(veneering)」および「ヒト化」など、免疫原性を減弱させる一部のアプローチでは、多数のアミノ酸置換の導入が行われ、抗原に対する抗体の結合が破壊されることがある。m14.18抗体は、GD2に中程度の親和性で結合する。したがって、m14.18の、GD2に対する親和性を有意に低下させる変異は、ヒトを治療する目的におけるこの抗体の有効性を低下させることが予想される。したがって、当技術分野では、GD2を効果的に標的にすることができ、かつ、ヒトに投与した際の免疫原性が減弱されている治療抗体が必要とされている。

40

【0008】

(発明の概要)

概括すれば、本発明は、ヒトにおける免疫原性が減弱されているが、m14.18が有するヒトGD2に対する結合親和力をなお保持している改変型m14.18抗体を提供するものである。

【0009】

50

より詳細には、本発明は、ヒトにおける免疫原性を減弱させるために、1つまたは複数のフレームワーク領域にあるいくつかのマウス特異的アミノ酸を、別のアミノ酸で置換したヒト化型 m14.18 抗体 (hu14.18 抗体) を提供する。本発明は、ターゲット免疫療法の効果を増強させるために、1つまたは複数の非免疫グロブリン部分と連結させた hu14.18 抗体の融合タンパク質も提供する。

【0010】

一態様では、本発明は、免疫グロブリン軽鎖可変領域 (V_L 領域) を定義する配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を含めた抗体可変領域を提供する。別の態様では、本発明は、免疫グロブリン重鎖可変領域 (V_H 領域) を定義する配列番号 2 に記載のアミノ酸配列を含めた抗体可変領域に関する。一実施形態では、本発明は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列および配列番号 2 に記載のアミノ酸配列が連結した抗体可変領域を提供する。これらのアミノ酸配列は、ジスルフィド結合またはペプチド結合などによって連結することができる。

10

【0011】

別の態様では、本発明は、少なくとも配列番号 1 のアミノ酸 1~23、配列番号 2 のアミノ酸 1~25、または配列番号 2 のアミノ酸 67~98 を含む、GD2 に特異的に結合する抗体可変領域に関する。これらの配列は、hu14.18 抗体の免疫グロブリン可変領域中のフレームワーク領域を定義する。フレームワーク領域に関しては、以下により詳細に記載する。

【0012】

本発明の一態様は、表面に GD2 を有する細胞を標的にする方法であって、本発明の抗体可変領域を患者に投与することを含む方法に関する。一実施形態では、標的細胞が腫瘍細胞である。本発明のさらに別の態様は、上記抗体可変領域をコードする核酸、またはこの核酸を含有する細胞を含むが、これらのうちいずれを患者に投与することも、また、生体外タンパク質生産に使用することもできる。

20

【0013】

本発明は、本発明の抗体可変領域と、少なくとも CH2 ドメイン 1 つを含む Fc 部分とを含むポリペプチド、上記ポリペプチドをコードする核酸、上記核酸を含む細胞、ならびに、上記ポリペプチド、上記核酸、または上記細胞を患者に投与することによって、表面に GD2 を有する細胞を標的にする方法を提供する。本発明のある実施形態では、上記 Fc 部分が IgG1 に由来する。

30

【0014】

上記抗体可変領域は、Fc 部分を介して、または Fc 部分の介在なしで非免疫グロブリン部分に連結することができる。具体的には、上記非免疫グロブリン部分は、インターロイキン、造血因子、リンフォカイン、インターフェロン、またはケモカインなどのサイトカインであり得る。上記インターロイキンは、例えば、インターロイキン-2 またはインターロイキン-12 であり得る。上記造血因子および上記リンフォカインは、例えばそれぞれ、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (GM-CSF) およびリンフォトキシンであり得る。上記インターフェロンは、例えば、インターフェロン α 、インターフェロン β 、またはインターフェロン γ であり得る。本発明のある実施形態では、上記融合タンパク質が第 2 のサイトカインなどの第 2 の非免疫グロブリン部分を含む。特定の一実施例では、上記融合タンパク質が上記抗体可変領域、IL-2、および IL-12 を含む。

40

【0015】

本明細書に記載された様々な実施形態の諸特徴は、相互に排他的なものではなく、様々な組合せおよび順序で存在し得ることを理解されたい。

【0016】

(図面の説明)

図 1A は、本発明による免疫グロブリン軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0017】

図 1B は、本発明による免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【0018】

50

図2 A ~ Dは、本発明による、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖 - I L - 2 融合タンパク質をコードする核酸構築体を含む発現ベクターのヌクレオチド配列を示す。

【0019】

図3 Aは、本発明による免疫グロブリン軽鎖のアミノ酸配列を示す。

【0020】

図3 Bは、本発明による免疫グロブリン重鎖のアミノ酸配列を示す。

【0021】

(発明の詳細な説明)

本発明は、ヒトでの免疫原性が減弱されているが、依然としてヒトGD2に特異的に結合することができる改変型m14.18抗体を提供する。免疫原性の減弱は、免疫グロブリン可変ドメインにおける、1つまたは複数のアミノ酸配列の改変によって提供される。この抗体は、特にサイトカインまたは他の免疫変調因子に融合された場合に、GD2陽性腫瘍を治療するのに有用である。

10

【0022】

本明細書において、「抗体」および「免疫グロブリン」という用語は、(i)完全な抗体(例えば、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体)、(ii)例えば、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、(Fab')₂フラグメント、Fvフラグメント、一本鎖抗体結合部位、およびsFvを含めた、その抗原結合性部分、(iii)二重特異性抗体およびその抗原結合性部分、ならびに(iv)多重特異性抗体およびその抗原結合性部分を意味すると理解される。

20

【0023】

本明細書において、「特異的に結合する」および「特異的な結合」という用語は、その抗体が特定の抗原に対して少なくとも約 $10^6 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくとも約 $10^7 M^{-1}$ 、より好ましくは少なくともおおよそ $10^8 M^{-1}$ 、そして最も好ましくは少なくとも約 $10^{10} M^{-1}$ の結合親和性を有することを意味すると理解される。

【0024】

本明細書において、「フレームワーク領域」および「FR」という用語は、免疫グロブリン可変領域における、相補性決定領域(CDR)に隣接した領域を意味すると理解される。CDRは、免疫グロブリン可変領域における、主として抗原と相互作用する部分である。図1に示すように、V_H領域およびV_L領域は、両方とも4つのFRを含有し、これらは、アミノ酸配列中の四角で囲まれた部分に位置している。

30

【0025】

詳細には、軽鎖FRは、図1A(配列番号1)に示すアミノ酸配列を参照して、Asp1からCys23まで(huV_LFR1)、His39からHis54まで(huV_LFR2)、Gly62からCys93まで(huV_LFR3)、そしてPhe104からLys113まで(huV_LFR4)のアミノ酸配列によって定義される。重鎖FRは、図1B(配列番号2)に示すアミノ酸配列を参照して、Glu1からSer25(huV_HFR1)まで、Trp36からGly49まで(huV_HFR2)、Arg67からSer98まで(huV_HFR3)、そしてTrp103からSer113まで(huV_HFR4)のアミノ酸配列によ

40

【0026】

本発明のタンパク質配列

本発明は、ヒト細胞表面スフィンゴ糖脂質GD2に、好ましくは特異的に、結合する抗体であって、m14.18抗体に由来する改変領域を有する抗体を主題とする。V_HまたはV_Lアミノ酸配列(あるいはこれら両方)は、ヒトに投与された際の免疫原性を減弱させるために、改変またはヒト化されている。本発明によれば、例えば、deimmunization法を用いることで、m14.18抗体をヒト化することができる。この方法では、MHCクラスII分子に対するペプチドエピトープの結合を減弱させる変異を導入することによって、潜在的なT細胞エピトープの除去または減弱を行う(例えば国際公開第W098/52976号およ

50

び第W000/34317号を参照)。別法では、非ヒトT細胞エピトープに変異を導入し、それらがヒト抗体内に存在するヒト自己エピトープに相当するようにする(例えば米国特許第5712120号を参照)。本発明は、少なくとも1つのヒト化されたFR配列を含み、それによって、ヒトに投与された際の免疫原性が減弱されているV_L領域およびV_H領域を有するGD2抗体を提供する。

【0027】

1. 重鎖および軽鎖可変部

上述のように、hu14.18は、m14.18抗体に由来するヒト化された可変部であって、ヒトGD2抗原に対する特異的結合性を保持する可変部を含む。本発明のある実施形態では、hu14.18抗体のV_L領域は、次のポリペプチドを含む。

【0028】

【化1】

D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C-R-S-S-Q-S-L-V-H-R-
N-G-N-T-Y-L-H-W-Y-L-Q-K-P-G-Q-S-P-K-L-L-I-H-K-V-S-N-R-F-S-G-V-P-
D-R-F-S-G-S-G-S-G-T-D-F-T-L-K-I-S-R-V-E-A-E-D-L-G-V-Y-F-C-S-Q-S-
T-H-V-P-P-L-T-F-G-A-G-T-K-L-E-L-K (配列番号1)

【0029】

特定の実施形態では、hu14.18抗体は、配列番号1の残基1~23、すなわち、
D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C(huV_LFR1)によって定義される軽鎖FR1を含む。

【0030】

本発明の他の実施形態では、hu14.18抗体のV_H領域は、次のポリペプチドを含む。

【0031】

【化2】

E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S-G-S-S-F-T-G-Y-
N-M-N-W-V-R-Q-N-I-G-K-S-L-E-W-I-G-A-I-D-P-Y-Y-G-G-T-S-Y-N-Q-K-F-
K-G-R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-
V-S-G-M-E-Y-W-G-Q-G-T-S-V-T-V-S-S (配列番号2)

【0032】

特定の実施形態では、hu14.18抗体は、配列番号2の残基1~25、すなわち、
E-V-Q-L-V-Q-S-G-A-E-V-E-K-P-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S(huV_HFR1)によって定義される重鎖FR1を含む。

【0033】

本発明のさらに別の実施形態では、hu14.18抗体は、配列番号2の残基67~98、すなわち、
R-A-T-L-T-V-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S(huV_HFR3)によって表される重鎖FR3を含む。

【0034】

以上の実施形態の様々な組合せも、本発明の範囲内にある。例えば、hu14.18抗体は、配列番号1に記載のV_L配列と、配列番号2に記載のV_H配列とを含んでもよい。これらのV_L領域およびV_H領域は、それらの核酸配列がどのように構築されるかに応じて、ジスルフィド結合またはペプチド結合で連結することができる。通常、V領域は、それらの配列が別々のDNA構築体でコードされる場合には、ジスルフィド結合によって連結される。これに対して、V領域は、それらの配列が一本鎖DNA構築体でコードされる場合には、通常、ペプチド結合によって連結される。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 5 】

本発明は、G D 2 に特異的に結合する抗体であって、ヒト化されたV領域の少なくとも一部を含む抗体も企図する。例えば、h u 1 4 . 1 8 抗体は、配列番号1によって定義されるV_L領域と、h u V_H F R 1 および h u V_H F R 2 などのヒト化したF R を少なくとも1つ有するV_H領域とを含むことができる。別法として、本発明の抗体は、配列番号2によって定義されるV_H領域と、h u V_L F R 1 などのヒト化したF R を少なくとも1つ有するV_L領域とを含むことができる。h u 1 4 . 1 8 抗体は、少なくとも1つのヒト化したF R を含むV_H領域、および/または、少なくとも1つのヒト化したF R を含むV_L領域を含むこともできる。

【 0 0 3 6 】

本発明の特定の実施形態では、軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、それぞれ、免疫グロブリンの軽鎖定常領域および重鎖定常領域に結合させることができる。免疫グロブリン軽鎖は、カップ鎖またはラムダ鎖と名付けられた定常領域を有する。本発明の特定の実施形態では、軽鎖定常領域がカップ鎖である。重鎖定常領域と、その様々な改変および組合せとに関しては、以下に詳細に論ずる。

【 0 0 3 7 】

II . F c 部分

本発明の抗体可変領域は、任意選択でF c 部分に融合される。本明細書において、F c 部分は、免疫グロブリン、好ましくはヒト免疫グロブリンの重鎖定常領域に由来するドメインを包含するものであり、これには上記定常領域のフラグメント、類似体、変種、変異体、または誘導体も含まれる。免疫グロブリン重鎖の定常領域は、C H 1、ヒンジ、C H 2、C H 3、および、重鎖のクラスによってはC H 4 ドメインを含めた、重鎖C末端領域の少なくとも一部に相同性を有する天然存在のポリペプチド、または合成によって生成されたポリペプチドと定義される。「ヒンジ」領域は、C H 1 ドメインをF c 部分のC H 2 - C H 3 領域に連結する。全哺乳動物の免疫グロブリン重鎖定常領域は、アミノ酸配列における広範な相同性を示す。これら免疫グロブリン領域のD N A 塩基配列は当技術分野で周知である(例えば、Gilliesら(1989年)、J. Immunol. Meth. 第125巻、191頁参照)。

【 0 0 3 8 】

本発明において、F c 部分は、通常、少なくともC H 2 ドメインを含む。例えば、F c 部分は、免疫グロブリン重鎖定常領域全体(C H 1 - ヒンジ - C H 2 - C H 3) を含むことができる。別法として、F c 部分は、ヒンジ領域、C H 2 ドメイン、およびC H 3 ドメインの全部または一部を含むことができる。

【 0 0 3 9 】

免疫グロブリンの定常領域は、F c 受容体(F c R)結合および補体結合を含めた、多くの重要な抗体エフェクター機能を担っている。重鎖定常領域には、I g A、I g G、I g D、I g E、およびI g Mと分類される5つの主要なクラスがあり、それぞれがイソタイプによって指定される独特のエフェクター機能を有する。

【 0 0 4 0 】

例えば、I g G は、4種のイソタイプ、すなわち 1、2、3、および4に分かれており、それぞれ、I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4としても知られている。I g G 分子は、I g G クラスの抗体に特異的な3クラスのF c 受容体(F c R)、すなわち、F c R I、F c R I I、およびF c R I I Iを含めた複数のクラスの細胞受容体と相互作用できる。I g G がF c R 受容体に結合するのに重要な配列は、C H 2 およびC H 3 ドメインにあると報告されている。

【 0 0 4 1 】

抗体の血清中半減期は、その抗体がF c 受容体(F c R)に結合する能力に影響される。同様に、免疫グロブリン融合タンパク質の血清中半減期も、これらの受容体に結合する能力の欠如に影響を受ける(Gilliesら、Cancer Research(1999年)、第59巻、2159~66頁)。I g G 2 およびI g G 4 のC H 2 およびC H 3 ドメインは、I g G 1 におけるそれらのドメインと比較して、F c 受容体に対する結合親和性が検出不可能であるか、または減弱し

10

20

30

40

50

ている。したがって、I g G 2またはI g G 4イソタイプに由来するC H 2および/またはC H 3ドメインを用いることによって、主題の抗体の血清中半減期を延長することができる。別法として、抗体は、F c受容体に対する結合親和性を減少させるために、I g G 1またはI g G 3由来の、ドメイン内に1つまたは複数のアミノ酸の改変を有するC H 2および/またはC H 3ドメインを含み得る(例えば、米国特許出願公開第2003-0105294-A1号として公開された米国特許出願第09/256156号を参照)。

【 0 0 4 2 】

F c部分のヒンジ領域は、重鎖定常領域C H 1ドメインのC末端に隣接している。ヒンジは、本発明のタンパク質に含まれる場合、天然に存在する免疫グロブリン領域に相同であり、通常、天然の免疫グロブリンと同様に、ジスルフィド結合を介して2本の重鎖を連結するシステイン残基を含む。ヒト免疫グロブリンおよびマウス免疫グロブリンにおけるヒンジ領域の代表的な配列は、ANTIBODY ENGINEERING, a PRACTICAL GUIDE、(Borrebaeck編集、W.H.Freeman and Co.、1992年)に見いだすことができる。

10

【 0 0 4 3 】

本発明に適したヒンジ領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、および他の免疫グロブリンイソタイプに由来することができる。I g G 1イソタイプは、ヒンジ領域に2対のジスルフィド結合を有し、効果的かつ定常的なジスルフィド結合形成が可能となっている。したがって、本発明の好ましいヒンジ領域は、I g G 1に由来するものである。任意選択で、I g G 1ヒンジにおける最初の、最もN末端にあるシステインに変異を導入し、本発明の抗体または抗体融合タンパク質の発現および構築を促進する(例えば、米国特許出願公開第2003-0044423-A1号として公開された米国特許出願第10/093958号を参照)。

20

【 0 0 4 4 】

I g G 1とは対照的に、I g G 4のヒンジ領域は鎖間ジスルフィド結合の形成効率が悪いことが知られている(Angalら(1993年)、Mol. Immunol. 第30巻、105~8頁)。また、I g G 2ヒンジ領域は、組換え型システムでの分泌中に、オリゴマー形成と、場合によっては不正確なジスルフィド結合を促進する傾向にある4対のジスルフィド結合を有す。本発明に適したヒンジ領域の1つは、重鎖由来部分相互の正しいジスルフィド結合形成を促進する変異を優先的に含有するI g G 4ヒンジ領域から得ることもできる(Angalら(1993年)、Mol. Immunol. 第30巻(1)、105~8頁)。別の好ましいヒンジ領域は、最初の2つのシステインがそれぞれ別のアミノ酸、すなわち、一般的な優先度の順で、セリン、アラニン、トレオニン、プロリン、グルタミン酸、グルタミン、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、メチオニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、またはセレノシステインなどに変異しているI g G 2ヒンジに由来するものである(例えば、米国特許出願公開第2003-0044423-A1号を参照)。

30

【 0 0 4 5 】

本発明の抗体可変領域に融合したF c部分は、異なった抗体イソタイプに由来するC H 2および/またはC H 3ドメインならびにヒンジ領域を含有し得る。例えばF c部分は、I g G 2またはI g G 4のC H 2および/またはC H 3ドメインと、I g G 1のヒンジ領域とを含有し得る。そのようなハイブリッドF c部分の構築は、米国特許出願公開第2003-0044423-A1号に記載されている。

40

【 0 0 4 6 】

F c部分は、本発明の抗体可変領域に融合される場合、F c融合タンパク質の血清中半減期を通常延長する1つまたは複数のアミノ酸改変を含有することが好ましい。そのようなアミノ酸改変には、F c受容体結合性または相補体固定活性を、実質上、低減または除去する変異が含まれる。例えば、そのような変異の1タイプは、免疫グロブリン重鎖のF c部分におけるグリコシル化部位を除去する。I g G 1では、グリコシル化部位はA s n 2 9 7である(例えば、米国特許出願公開第2003-0166163-A1号として公開された米国特許出願第10/310719号を参照)。

50

【 0 0 4 7 】

III. 融合接合領域

本発明の抗体可変領域は、任意選択で、非免疫グロブリン部分に直接的に、または、リンカーペプチド(例えば、 $(Gly_4 - Ser)_3$ (配列番号3))を介して間接的に連結または融合させることができる。開示された融合タンパク質の免疫原性は、米国特許出願公開第2003-0166877-A1号に記載されるように、融合接合部または接合部エピトープの、T細胞受容体と相互作用する能力を損なうことによって減弱させることができる。2つのヒトタンパク質、例えば、ヒトFcおよびヒトIL-2の間の融合においてさえ、融合接合部または接合部エピトープ周囲の領域は、通常はヒト体内に存在しないペプチド配列、したがって、免疫原性であり得るペプチド配列を含有する。例えば、接合部エピトープの免疫原性は、融合接合部近傍に1つまたは複数のグリコシル化部位を導入することによって、または、米国特許出願公開第2003-0166877-A1号に記載にされるように、接合部にまたがるT細胞エピトープ候補を同定し、接合部近傍のアミノ酸を改変してT細胞エピトープ候補の、T細胞受容体と相互作用する能力を低減させることによって、減弱させることができる。

10

【 0 0 4 8 】

タンパク質の血清中半減期は、融合接合領域に変異を導入することで延長することもできる。例えば、非免疫グロブリン部分に融合したCH3ドメインを含むタンパク質中では、CH3ドメインのC末端リジンをアラニンなどの別のアミノ酸に改変することができ、これにより、結果として得られた融合タンパク質における血清中半減期の実質的な増加が提供され得る。

20

【 0 0 4 9 】

特定の実施形態では、融合接合部におけるタンパク質分解性切断が望ましい。したがって、遺伝子間領域は、タンパク質分解性切断部位をコードするヌクレオチド配列を含み得る。免疫グロブリンとサイトカインとの間に挿入されるこの部位は、標的部位におけるタンパク分解によってサイトカインの放出が提供されるように設計することができる。例えば、プラスミンおよびトリプシンが、これらのプロテアーゼの接近可能な部位におけるリジン残基およびアルギニン残基の後で切断を行うことが周知である。他の部位特異的エンドプロテアーゼおよびそれらが認識するアミノ酸配列も周知である。

30

【 0 0 5 0 】

IV. hu14.18抗体融合タンパク質を用いたヒト疾患の治療

本発明の抗体可変領域は、診断用薬および/または治療薬に結合させることができる。これら薬剤を抗体に融合させて、融合タンパク質を生成することができる。別法として、これらの薬剤を抗体に化学的に結合させて、免疫複合体を生成することもできる。このような薬剤は、例えば、毒素、放射性標識、イメージング剤、免疫活性化部分、または同様のものであり得る。

【 0 0 5 1 】

本発明の抗体可変領域をサイトカインに結合することができる。好ましいサイトカインには、インターロイキン-2(IL-2)、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-14、IL-15、IL-16、およびIL-18などのインターロイキン、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、およびエリスロポエチンなどの造血因子、TNFなどの腫瘍壊死因子(TNF)、リンフォトキシンなどのリンフォカイン、レプチンなどの代謝過程調節因子、ならびに、インターフェロン、インターフェロン、インターフェロン、およびケモカインなどのインターフェロンが含まれる。抗体-サイトカイン融合タンパク質または免疫複合体は、サイトカイン生物活性を示すことが好ましい。一実施形態では、抗体可変領域はIL-2に融合する。米国特許出願公開第2003-0166163-A1号に記載されるように、毒性を減少させるために、IL-2部分内の数個のアミノ酸を変異させることが好ましい。

40

【 0 0 5 2 】

50

例えば、図3Aおよび3Bは、本発明による抗体融合タンパク質の、特定の実施形態におけるアミノ酸配列を示す。具体的には、図3Aは、可変領域および定常領域を含むヒト化された免疫グロブリン軽鎖のペプチド配列を示す。図3Bは、IL-2に連結されたヒト化された免疫グロブリン重鎖のペプチド配列を示す。これらのポリペプチドは、GD2に特異的に結合して、免疫系を刺激することができるヒト化された抗体融合タンパク質を提供する。

【0053】

任意選択で、タンパク質複合体は、第2のサイトカインなどの第2の薬剤をさらに含む得る。一実施形態では、hu14.18抗体融合タンパク質はIL-12およびIL-2を含む。免疫グロブリンドメインおよび2つの異なるサイトカインを含有するタンパク質複合体の構築に関する詳細が米国特許第6617135号に記載されている。

10

【0054】

本発明の融合タンパク質は、癌などのヒト疾患の治療に有用である。ヒト腫瘍を治療する際には、本発明のV領域を含む抗体-IL-2融合タンパク質を、0.1から100ミリグラム/メーター²/患者の用量を用いて、注入または皮下注射で投与するのが特に有用である。好ましい実施形態では、本発明のV領域を含む抗体-IL-2融合タンパク質を、1から10ミリグラム/メーター²/患者の用量を用いて、より好ましくは約3から6ミリグラム/メーター²/患者の用量を用いて、注入または皮下注射で投与するのが特に有用である。

【0055】

hu14.18-IL-2は、この融合タンパク質の投与後も、IL-2受容体を介してIL-2反応性細胞を活性化する能力を保持し、また、GD2陽性腫瘍細胞に結合して、IL-2をそれらの表面に送達する能力も保持していることが臨床試験によって示されている。さらに、hu14.18-IL-2融合タンパク質を癌患者に投与したところ、驚くほど多数の患者で疾病進行の安定化がもたらされた(実施例1を参照)。

20

【0056】

本発明の医薬組成物は、例えば、丸薬、カプセル、粉末薬、液体、懸濁液、またはこれらに同様のものなど、固形、半固体、または液体剤形の形態で、好ましくは正確な用量の投与に適した単位剤形で使用され得る。この組成物は、従来調剤用担体または賦形剤を含み、さらに、他の医薬品、薬剤、担体、アジュバントなどを含み得る。そのような賦形剤には、例えば、ヒト血清アルブミンまたは血漿タンパク質などの他のタンパク質も含まれ得る。そのような剤形を調製する実際の方法は、公知であるか、または当業者にとって自明なものであろう。投与される組成物または製剤は、いずれの場合でも、治療される対象において期待される効果を発揮するための有効量となる活性成分量を含有しているだろう。

30

【0057】

本発明の組成物の投与は、そのような活性を示す薬剤に是認されている投与方法のいずれを介して行うこともできる。そのような方法には、経口投与、非経口投与、または局所投与、および他の方法による全身性の形態が含まれる。薬学的に許容される担体中での静脈内注入は、好ましい投与方法である(実施例1を参照)。

【0058】

投与される有効化合物の量は、当然ながら、治療される対象、病気の重篤度、投与方法、および処方を行う医師の判断に依存するだろう。

40

【0059】

本発明の核酸

I. hu14.18抗体構築体

本発明は、上記タイプのタンパク質それぞれを発現することができる核酸も主題とする。これらには、例えば、配列番号1に記載のアミノ酸配列；配列番号2に記載のアミノ酸配列；huV_LFR1アミノ酸配列を含むhu14.18抗体V_L領域；huV_HFR1アミノ酸配列を含むhu14.18抗体V_H領域；huV_HFR3アミノ酸配列を含むhu14.18抗体V_H領域；ならびに上記のヒト化されたFR配列を少なくとも1つを含むh

50

u 1 4 . 1 8 抗体と、1つまたは複数の治療薬とを含む融合タンパク質をコードする核酸が含まれる。

【 0 0 6 0 】

本発明の h u 1 4 . 1 8 抗体は、遺伝子工学技法によって、すなわち、本発明の望ましい F R を含有する G D 2 特異的抗体をコードする核酸構築体を構築することによって生成できる。一実施形態では、主題の抗体をコードする遺伝子構築体は、5'から3'の方向に、少なくとも1つのヒト化された F R をその中に含む重鎖可変領域をコードする D N A セグメントと、重鎖定常領域をコードする D N A セグメントとを含む。別の実施形態では、サイトカインをコードする別の D N A セグメントが重鎖定常領域をコードする D N A セグメントの3'末端に融合している。異なった実施形態では、この遺伝子構築体は、5'から3'の方向に、少なくとも1つのヒト化された F R を含む重鎖可変領域をコードする D N A セグメントと、サイトカインをコードする D N A セグメントとを含む。別法として、本発明の核酸は、5'から3'の方向に、少なくとも1つのヒト化された F R をその中に含む軽鎖可変領域をコードする D N A セグメントと、サイトカインをコードする D N A セグメントとを含み得る。ある実施形態では、サイトカインをコードする核酸が定常領域をコードする遺伝子(例えば、C H 3 エキソン)の3'末端に、直接的にまたは遺伝子間領域を介して(例えば、(G l y₄ - S e r)₃(配列番号3)をコードする D N A などの適切なリンカーによって)、インフレームに連結される。

【 0 0 6 1 】

II . h u 1 4 . 1 8 抗体構築体の発現

本発明のタンパク質をコードする核酸は、それが発現される適切な受容細胞内に導入するために、1つまたは複数の発現ベクターに構築または挿入することができる。発現ベクターへの核酸の導入は、標準的な分子生物学技法で実行できる。好ましい発現ベクターには、コードされているタンパク質を細菌または哺乳類のいずれかの細胞内で、それから発現できるベクターが含まれる。

【 0 0 6 2 】

本発明によれば、抗体可変領域の重鎖は、対応する軽鎖と同じ細胞で同時発現されることが好ましい。複数のポリペプチド鎖を含む融合タンパク質には、複数の発現ベクターを用いることができる。例えば2つの発現ベクターを用いた同時形質移入法では、両方のベクターが1つの標的細胞に送達されることが頻繁にある。別法として、同一細胞内での同時発現を行うのに、複数のポリペプチドをコードする単一ベクターを用いるのが有用であるときもある。

【 0 0 6 3 】

例えば、図 2 A ~ D は、本発明による免疫グロブリンの重鎖および軽鎖両方をコードする単一ベクターの核酸配列を示す。このベクターは、免疫グロブリン重鎖の3'末端に融合した I L - 2 をコードする核酸も含む。したがって、細胞に導入された際、このベクターのみで、G D 2 に特異的に結合して免疫機能を刺激するヒト化抗体 - I L - 2 融合タンパク質を提供することができる。

【 0 0 6 4 】

さらに、本発明のタンパク質は、一本鎖分子として発現するのが好都合である場合もある。例えば、抗体可変領域は、一本鎖抗体または s F y として、任意選択で非免疫グロブリンタンパク質と融合させて、発現させることができる。別の実施形態では、重鎖(サイトカインの融合有り、または無し)を対応する軽鎖(または重鎖)(サイトカインの融合有り、または無し)に結合して、1価および2価の免疫複合体を形成させる。

【 0 0 6 5 】

受容細胞系は、骨髄腫(または、ハイブリドーマ)などのリンパ系細胞が好ましい。骨髄腫は、形質移入された遺伝子によってコードされた免疫グロブリンを、合成、構築、および分泌することができ、かつ、タンパク質をグリコシル化することもできる。特に好ましい受容細胞は S p 2 / 0 骨髄腫である。S p 2 / 0 骨髄腫は、通常、内在性免疫グロブリンの生成を行わない。この細胞は、形質移入された場合には、形質移入された遺伝子構築体

10

20

30

40

50

によってコードされた免疫グロブリンのみを生成するだろう。形質移入された骨髄腫は、培養またはマウスの腹膜で増殖させることができる。マウスの腹膜では、分泌された免疫複合体を腹水液から回収することができる。Bリンパ球などの他のリンパ球系細胞も受容細胞として用いることができる。

【 0 0 6 6 】

キメラ I g 鎖をコードする核酸構築体を含むベクターでリンパ系細胞に形質移入を行う方法がいくつかある。リンパ系細胞にベクターを導入する好ましい方法は、スフェロプラスト融合によるものである(例えば、Gilliesら(1989年)、Biotechnol 第7巻、798～804頁)。別法には、エレクトロポレーション法またはリン酸カルシウム沈殿法が含まれる。免疫複合体を生成する他の有用な方法には、上記構築体をコードするRNA配列を調製して、それを適切な生体内または生体外システムで翻訳することが含まれる。一度発現されれば、標準的なタンパク質精製方法で本発明のタンパク質を収集することができる(例えば、米国特許第5650150号参照)。

10

【 0 0 6 7 】

III. 遺伝子療法による癌の治療

本発明の核酸は、癌と、特定の細胞型を免疫系の標的にすることが望ましい他の疾患とを治療するための遺伝子療法薬として用いることができる。例えば、ヒトまたは動物から細胞を取り出すことが可能であり、それらの細胞内に本発明の抗体をコードする1つまたは複数の核酸を形質移入することができる。細胞は、その後ヒトまたは動物に再導入される。形質移入される細胞は、正常細胞であることも、癌細胞であることもある。別法として、核酸は生体内原位置(in situ)で細胞内に導入することもできる。ヒトまたは動物は、その後、癌細胞に対して免疫応答を引き起こし、それによって、癌が治癒されるか、またはその重篤度が軽減され得る。本発明の抗体可変領域は、哺乳類細胞内で発現を促進する適切な調節エレメントに結合され、リン酸カルシウム、「遺伝子銃」、アデノウイルスベクター、カチオン性リポソーム、レトロウイルスベクター、または他のいかなる効率の形質移入法も含めた様々な技法のいずれによっても細胞内に形質移入することができる。

20

【 0 0 6 8 】

本発明の特定の実施形態では、hu14.18抗体は、局所炎症反応、T細胞増殖および活性化の刺激、またはADC活性などの局在化された生物学作用をサイトカインが及ぼすことができるように、生体内でサイトカインを選択的に標的細胞に送達するのに用いられる。この抗体の治療有効量が、標的細胞を内部に有する対象の循環系に投与される。

30

【 0 0 6 9 】

本発明を、非限定実施例によってさらに例証する。

【 0 0 7 0 】

実施例

実施例 1

hu14.18 - IL2の精製および製剤

1つの試験では、hu14.18 - IL2をNS/O細胞から発現させ、組織培養上清を収集し、Abx混合樹脂カラムクロマトグラフィー、組換え型プロテインAクロマトグラフィー、およびQセファロースカラムクロマトグラフィーを順序通りに用いてhu14.18 - IL2タンパク質を精製し、続いてペリコン2接線流ダイアフィルトレーションで製剤緩衝液に緩衝液交換を行った。これらの精製ステップの詳細を以下に記載する。ウイルス不活性化ステップおよび排除ステップは、以下に記載するように、これらのステップの間に組み入れた。ウイルス不活性化ステップおよび排除ステップは、精製それ自体には必要なかったが、規定の要件を満たすために用いられた。

40

【 0 0 7 1 】

hu14.18 - IL-2を含むNS/O組織培養上清2リットルを1M酢酸でpH5.9に調整し、Abxカラム(J.T.Baker社)にかけ; 10mM MES、100mM酢酸ナトリウムpH6.2で洗浄し; 500mM酢酸ナトリウムpH7で溶出した。この物質を組換え型プロテインAカラム(Pharmacia社)に添加し; 100mMリン酸ナトリウム、150mM NaC

50

1 pH 7で洗浄し; 100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl pH 6で洗浄し; 10mMリン酸ナトリウム pH 7で洗浄し; 100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl pH 3.5で溶出した。溶出した物質のpHは4.2であった。ウイルス不活性化を促進するために、このpHを3.8まで低下させ、試料を30分間インキュベートし、その後、1M NaOHでpHを7に中和した。核酸を除去するために、この物質をQセファロースカラム(Pharmacia社)に添加し、100mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl pH 7で洗浄した。核酸はカラムに結合し、一方、タンパク質は、フロースルーおよび洗浄液中に見られた。A280がベースラインに戻るまで、これを反復した。hu14.18-IL2の最終物質が以下の製剤中に含まれるように、ペリコン2ダイアフィルトレーション(Millipore社)をメーカーの指示に従って行った。

1. マンニトール 4%
2. 塩酸アルギニン USP/NF 100mM
3. クエン酸 USP-FCC 5mM
4. ポリソルベート80 0.01% (w.v)

製剤緩衝液のpHを1M NaOHで7に調整した。

【0072】

最終ステップとして、この製剤を、180000ダルトンの分子量カットオフを有するViresolve(登録商標)180膜(Millipore社)を通して濾過した。これには、この物質を「ポリッシュ」する効果があり、その結果、凝集した二量体および高次オリゴマーが除去された。

【0073】

実施例2

第I相臨床試験で観測されたhu14.18-IL-2融合タンパク質の抗腫瘍活性 hu14.18-IL-2の安全および有効性を評価するために、第I相臨床試験を行った。適格患者は、外科的および医学的に不治であると考えられメラノーマを有することが組織学的に確認されていた。これらの患者は測定可能または評価可能な転移性疾患を有してもよく、また、遠隔転移または領域再発疾患の外科切除後に疾患の証跡が無くてもよかった。複数(2つ以上)の局所または領域再発を伴う患者は、患者にリンパ節関与の以前の証跡があり、かつ各再発が少なくとも2カ月までの期間内に分離された場合にのみ含まれた。すべての患者は、適切な骨髄機能(総白血球(WBC) > 3500/ml、または総顆粒球 > 2000/ml、血小板 > 100000/ml、およびヘモグロビン > 10.0g/dlで定義する)、適切な肝機能[アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(ALT) < 3x正常値、および総ビリルビン < 2.0mg/dlで定義する]、および適切な腎臓機能(血清クレアチニン < 2.0mg/dl、またはクレアチニンクリアランス > 60ml/分間で定義する)を有する必要があった。すべての患者は、皮質脳波検査(ECOG)パフォーマンスステータスが0または1であり、少なくとも12週間の平均余命があった。試験前4週間以内に事前に化学療法、放射線治療、または他の免疫抑制療法を受けた患者は除外した。患者は、試験を開始する前に少なくとも4週間治療され、安定している場合には、以前に中枢神経系(CNS)転移があってもよかった。すべての患者からインフォームドコンセントを得た。

【0074】

この第I相試験は、非盲検非ランダム化用量増大試験として設計され、この検査では、3~6人の患者グループに、次の用量レベル、すなわち、0.8、1.6、3.2、4.8、6.0または7.5mg/m²/日のhu14.18-IL-2を投与した。hu14.18-IL-2は、入院患者ベースで投与し、各コース第1週中に3日間連続して4時間の静脈内(IV)注入を行った。hu14.18-IL-2融合タンパク質は、4%マンニトール、100mMアルギニンHCl、5mMクエン酸、および0.01% Tween 80 pH 7を含む製剤中で患者に投与した。患者は、第3の注入終了後約24時間安定であった場合には退院させた。有害事象および毒性は、IL-2に関するNCI共通毒性規準(NCI Common Toxicity Criteria)(バージョン2.0)およびウイスコンシン大学総合癌センター毒性評価基準(University of Wisconsin Comprehensive Cancer Center Toxicity Grading Scale)(パフォーマンスステータス、体重増、および体温)に従ってグレード付けした。用量制限毒性(D

10

20

30

40

50

LT)は、グレード3のリンパ球減少、高ビリルビン血症、低リン酸血症、または高血糖以外のグレード3またはグレード4の毒性の発生と定義した。最大耐量(MTD)は、コース1で6人の患者のうちの2人がDLTを有する用量レベルと定義した。グレード3の治療関連毒性を有した患者は、コース2で50%用量低減での治療が再開可能となる前に、少なくともグレード1にまで回復している必要があった。25%の疾病進行を有した患者は試験から除外した。コース2の投与は、疾患が安定していた患者に実施した。

【0075】

hu14.18-IL-2の薬物動態特性をこれらの患者で評価した。最初の4時間注入を行った直後(1日、コース1)にhu14.18-IL-2レベルを33人の患者すべての連続試料で評価した際、半減期が3.7時間であることが判明した(+/-0.9時間のSD)。これは2成分の半減期(IL-2の約45分間、およびキメラm14.18抗体の3日間)の間の中間であり、マウスで観測されたキメラm14.18-IL-2の半減期に匹敵する値である。これらの患者の血清からhu14.18-IL-2が除去された後には、IL-2成分もhu14.18抗体成分も検出できなかった。コース1におけるピーク血清および曲線下面積(AUC)は、用量依存性の増加を有意に示した($p < 0.001$)。

10

【0076】

33人の患者をこの試験で治療した。表1に臨床転帰を記載する。2人の患者(6%)は、コース1の3日間のうち最初の2日間のみを終了した。これらの患者(用量レベル3)のうち1人は、治療2日目にグレード3の高ビリルビン血症を有し、もう1人の患者(用量レベル6)は、グレード3の低酸素症と治療の留保を必要とする低血圧を有した。これらの患者は両者とも疾患の進行があり、治療の第2コースを受けなかった。19人の患者(58%)は、治療の第1コースの後、疾患が安定しており、治療の第2コースを受けた。5人の患者(全患者の15%)は、コース1における有害事象によりコース2で、50%の用量低減を必要とした。17人の患者(全患者の52%)は、コース2を終了した。1人の患者(用量レベル4)は、コース2で最終注入を受けるのを拒絶し、1人の患者(用量レベル6)は、コース2における最終注入が低血圧のため留保された。8人の患者(全患者の24%)は、2コースの治療後も疾患が安定していた。この結果は、hu14.18-IL-2が驚くほど多数の患者で疾病進行の安定化を引き起こしたことを示す。

20

【0077】

33人の患者のうちの8人が2コースの治療後も疾患の安定を維持しており、これら8人の患者のうちの4人は、プロトコール治療終了以来20~52カ月の間、進行性疾患の証拠は認められないままである(1人は安定した疾患を有し、3人は疾患に関して証拠がない)。

30

【0078】

33人の患者のうち5人は、再発または転移の外科切除後、測定可能な疾患がない状態で試験に参加した。これらの5人の患者のうち2人は疾病進行を有したが、残りの3人の患者は疾患の証拠は認められないままであった(20~52カ月)。これらの結果は、免疫療法による介入から臨床利益を得る可能性が最も高いのは、全身腫瘍組織量が低い患者であるという仮説と一致するものである。さらにもう1人の患者が、2コースの治療後、肺小節で目標とする減少に達したが、総合的な疾患応答は、遠位結節の成長によって、疾病進行として評点された。hu14.18-IL-2治療の後、その結節は切除され、患者は、3年間以上、疾病進行がない状態のままでいた。

40

【0079】

【表 1】

臨床成果

	患者数
コース 1 を終了した患者	31
コース 1 の後も疾患が安定	19
コース 2 で 50% 用量低減	5
コース 2 を終了した患者	17
コース 2 の後も疾患が安定	8

10

【0080】

第 I 相臨床試験における hu14.18-IL-2 による生体内免疫刺激

hu14.18-IL-2 で治療された患者に関して、免疫刺激の指標も検査した。末梢血リンパ球減少が 2～4 日目に起こり、この後、5～22 日目には反跳性リンパ球増多症が起こった。これらの変化は両方とも用量依存性であった(それぞれ、 $p < 0.01$ および $p < 0.05$)。5、8、15 および 22 日目におけるリンパ球数は、コース 1 のベースラインより有意に大きかった。コース 2 のベースラインリンパ球数(コース 1 の 29 日目)は、コース 1 のベースラインリンパ球数より増加しており、これは第 1 コースの治療の効果が 29 日目でもまだ存在していることを示す。さらに、これら 12 人の患者の、コース 2 における 5、8 および 15 日目のリンパ球数は、コース 1 における 5、8、および 15 日目の対応する値より大きかった。

20

【0081】

リンパ球細胞表面表現型は、hu14.18-IL-2 治療第 1 週後に CD16+ および CD56+ リンパ球(ナチュラルキラー(NK)細胞マーカー)の拡張を示した。この効果は、コース 1 の 29 日目(コース 2、1 日目)でもなお残っていた。患者 19～33(4.8～7.5 mg/m²/日の投与を受けた)では、リンパ球細胞表面表現型を 1 および 8 日目に加えて、15 および 22 日目にも測定した。この分析は、CD56 細胞および CD56/CD16 同時発現細胞の増加が、8、15 および 22 日目にも有意に上昇した($p < 0.01$)状態のままであったことを実証した。

【0082】

免疫活性化の尺度として、患者 13～33 における C 反応性タンパク質(CRP)レベルと、コース 1 を終了した 31 人の患者における可溶性 IL-2 受容体(sIL-2R)レベルとを得た。各コースでのベースラインと比較して、コース 1 およびコース 2 の両方で、治療 3～5 日目に平均 CRP の有意な増大があった。CRP におけるこの増大は、各治療コースにおける 8 日目までにベースラインレベルまで戻っていた。sIL-2R レベルは、コース 1 およびコース 2 の両方で、ベースラインより有意に増大していた。この増大は、hu14.18-IL-2 注入の 24 時間後に開始し、8 日目の後まで持続した。sIL-2R の増大は用量依存性($p = 0.014$)であることが判明した。両コースで同じ用量を受けた患者の、コース 2 における 1～5 日目の sIL-2R 値は、コース 1 における対応する値と比較して増大していた($p < 0.05$)。

30

40

【0083】

GD2 を発現し、かつ hu14.18-IL-2 に結合する LA-N-5 神経芽腫細胞系を、コース 1 を終了した 31 人の患者から得た末梢血単核細胞(PBMC)における、IL-2 で活性化された NK 機能と、抗体依存性細胞傷害(ADCC)とを評価するのに用いた。リンパ球に媒介された殺作用は、これらの 2 つのアッセイにおける 1 日目と比較して、8 日目から有意に増大した。コース 2 でコース 1 と同じ用量を受けた 12 人の患者は、コース 1 で得られた結果と極めて同様の ADCC 結果を示した。コース 2 でコース 1 と異なっていることが判明した唯一のパラメータは、1 日目における IL-2 の存在下で増大している殺作用であるが、これは、このアッセイで増大した殺作用が 29 日目(コース 2、1 日目)でも高いまま残っていたことを示すものである。

50

【0084】

LA-N-5標的は、新たなNK細胞に比較的抵抗力があるので、IL-2によって増大した殺作用およびADCCを測定するのに有用である。しかし、培養液(生体外IL-2の増補なし)中の新たなPBMCによって媒介された、LA-N-5に対する弱い殺作用は、8日目でも1日目と比べて有意に大きくはなかった。

【0085】

NKに対する感受性を有するK562標的細胞系を用いて、1、8、15および22日目に、患者19~33の標準的なNKアッセイを行った。培養液中、またはIL-2の存在下でテストした際、NKによるK562標的細胞の溶解が、1日目と比較して8および22日目に有意に増大していることが観測された。選択された患者から得た血清試料は、機能的IL-2活性および機能的抗GD2抗体を測定するためにも評価された。

10

【0086】

IL-2反応性のTf-1b細胞系は、hu14.18-IL-2注入後に得た患者血清によって、IL-2-誘発増殖を示した。4時間の注入後、最初の4時間では、増殖における進行性の増大が見られた。この注入の16時間後までに、値はベースラインに戻った。これは、hu14.18-IL-2の血清中半減期が約4時間であることと一致している。これらのタイムポイントから得た血清試料は、フローサイトメトリーでもそのIL-2成分およびその抗GD2抗体活性を保持する完全なhu14.18-IL-2免疫サイトカイン(IC)が存在するかどうか検査した。M21細胞系(GD2陽性)に結合可能なhu14.18-IL-2が、IC注入後の患者血清試料の中で検出可能であった。M21に結合可能なICの量は、4時間の注入後、最初の4時間では増加し、その後減少した。これは再度、半減期が約4時間であることと一致しているものである。最後に、hu14.18-IL-2の投与によって、ADCCを実現するのに必要である条件と一致した条件が生体内でもたらされるかどうかを判定するために、患者から得た被検物を用いて生体外分析を行った。8日目に得たPBMCは、細胞障害性アッセイにhu14.18-IL-2を添加した際の、GD2+標的細胞に対するADCCの増大を示す。この同じADCCアッセイを8日目に得たPBMCを用いて行ったが、hu14.18-IL-2をアッセイに添加する代わりに、hu14.18-IL-2投与前または後に得た患者からの血清を添加した。コース2の8日目の患者から得たPBMCは、hu14.18-IL-2投与後に得られた血清の存在下で、注入前に得た血清で観測された殺作用と比べて増大した、LA-N-5細胞系に対する殺作用を媒介することが可能であった。したがって、IV投与後に患者体内で循環しているhu14.18-IL-2は、同じ患者からのhu14.18-IL-2によって生体内で活性化されたPBMCでADCCを促進することが可能であった。

20

30

【0087】

要約すれば、これらの結果は、このhu14.18-IL-2療法に付随して、リンパ球数の増加、CD16+およびCD56+PBMCの比率増大、NK溶解の増大、およびADCCの増大を含めた免疫変化があったことを示す。免疫活性化の追加証拠には、CRPおよびsIL-2Rの血清中レベルの増大が含まれていた。血清およびPBMCの実験室分析は、IV投与後における患者の血清中で循環するhu14.18-IL-2分子が、IL-2受容体を介してIL-2反応性細胞を活性化する能力を保持し、かつ、フローサイトメトリーで検出されるように、GD2陽性腫瘍細胞に結合して、IL-2をそれらの細胞表面に送達する能力を保持していることを示した。hu14.18-IL-2分子がNKおよびADCC機能を生体外で媒介する能力に基づいて、NK細胞は生体内でも活性化される。その上、これらの患者に投与されたhu14.18-IL-2によって生体内で活性化されたNK細胞は、同じ患者の血清中で循環するhu14.18-IL-2によって促進されたADCCを媒介することが可能であった。したがって、免疫活性化を実現する条件は、この試験中の全患者で実現された。

40

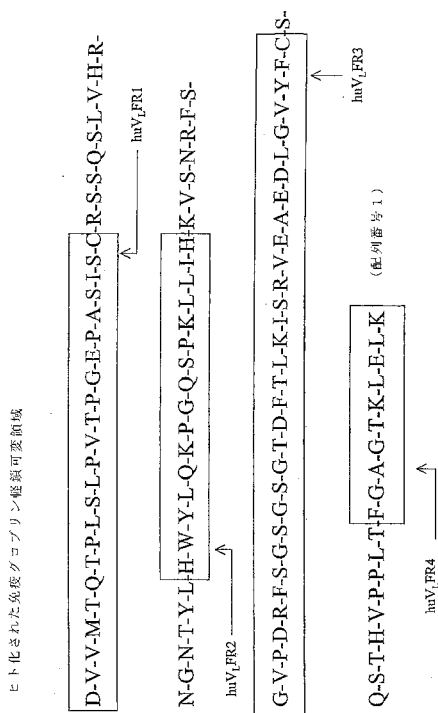
【図面の簡単な説明】

【0088】

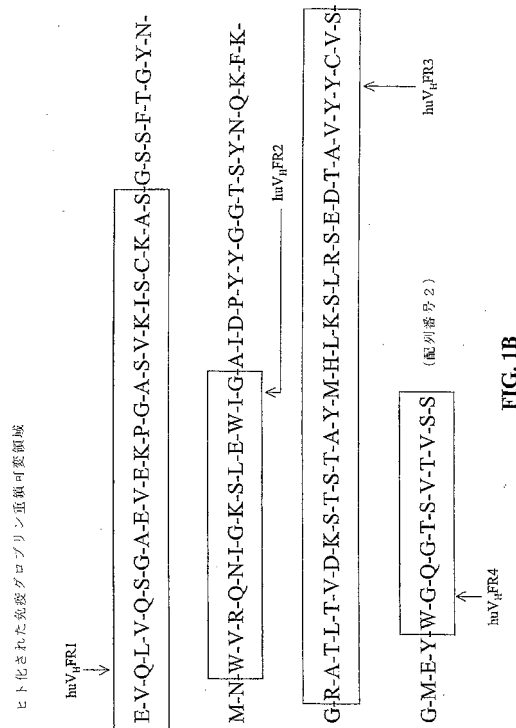
50

- 【図 1 A】本発明による、免疫グロブリン軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。
- 【図 1 B】本発明による、免疫グロブリン重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。
- 【図 2 A】本発明による、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖 - I L - 2 融合タンパク質をコードする核酸構築体を含む発現ベクターのヌクレオチド配列を示す。
- 【図 2 B】本発明による、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖 - I L - 2 融合タンパク質をコードする核酸構築体を含む発現ベクターのヌクレオチド配列を示す。
- 【図 2 C】本発明による、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖 - I L - 2 融合タンパク質をコードする核酸構築体を含む発現ベクターのヌクレオチド配列を示す。
- 【図 2 D】本発明による、免疫グロブリン軽鎖および免疫グロブリン重鎖 - I L - 2 融合タンパク質をコードする核酸構築体を含む発現ベクターのヌクレオチド配列を示す。
- 【図 3 A】本発明による免疫グロブリン軽鎖のアミノ酸配列を示す。
- 【図 3 B】本発明による免疫グロブリン重鎖のアミノ酸配列を示す。

【図 1 A】



【図 1 B】



【 図 2 A 】

Expression Vector Nucleotide Sequence

GTGACATGATTTGAGTACTGTTAATAAGTAATCAATACGGGGTCTTAGTTCATAGGCCAT
ATTAGGATTCGCGGTACATAACTAGGTTAATCGGCTAATCGGCTGAGTAAATCGGCTGAGC
GCCCATGACGTCATATGAGTATGTTCCTCAATAGTAAGGCAATAGGGCACTTCCATGAGGTC
AATGGTGGAGTATTACGGTAACTGGCCCTCGCCAGTACATCAAGTGTATCATATGCAAGATA
GCGCCCATTTGAGCTGATAGCGGTAATCGGCGCTGCGATATGCGCCAGTACATGACCTTAT
GGGACTTCTGATGCGTACATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
CGGACTCATCAATGGCGGTGATGCGGTTGACATACCGGGGATTCGACGTTCCAGGCTGAGG
CGTCAATGGGAGTTTGTGTCACCAAAATCAAGGGACTTCCAAAATGTGTGTAACAACATCGCC
CCATTAAGCGAAATGGCGGTAGCGGTGTACGCTGGGAGGCTCATATAAGCAGAGCTCTCTGGC
TAAGTACAGAACCCACTGCTTAACCTGGGTAATCGSAAATTAATGATGACTACTATAGGAGAGC
TAGATAAGAGTTCGCTGTAGGCTGT
GTGAGGGAGGAGATGTGACAGGGAGCAGGAGCACTGAATCCATGTGCTATCCGATGATTCGGC
ATGGGTGAGGAGATGGGCTTATCTCCAGCATGGGGCCCTGGGGTGAATACTGTTTAGAGGGA
GFTTCCAGATGGGAAACATGTGCTATATTAAGATATGAAATGAAATGGATGCTGTGATGTTGAT
ATGCTTTAGAGTGTGATGAGTACGATGCTGCAATTCATTTTGTGTAAAGAGAGATTTTAAAGCTA
AAAAATGTTATGTAATAAATAAAGCATCAGGTTGAAATAAAAAAATAAAGAGATGTTCAATG
AATTTGTGTATAATGTTATGTTCTCTCATTTGTTTCAAGTCTTAAAGGACGCTGGTGTAGGAG
CAGACCCGCTGTCTGCGGCTGACCGCGGAGGCGCGCTCCATCTCCGCAAGATCTAGTCAAG
AGTGTGTACACCGTTATGGAAGCACTTATACATTTGTAAGTCTGCAAGGCAAGCGAGCTGCGA
AAGCTCTGATTCACAAAGTTTCCAAACGATTTCTGGGGTCCAGCAGGTTTCAAGTGGAGTGA
TCAGGACAGATTCACACTAAGTACAGAGGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGT
TCTCAAGTACAGATTTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
AGTGTGTACAGGTTTCAAGAGAGCTAAAGACTATGCAAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ACTAAGCTGGGGTCCCGCAATCTAACTGCTGAGGGGTGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAG
AAGACTTGGATTTACTGCAAGTCCAGAAAGACTAAAGGCTCAAGGCTGCAAGAGGCT
CCAAACAAACAAATTTAGAACCTTAAATGAAATAGGGGAGGAGTGGAGGAAAGCTCAAAACAA
AGATTTTAAATAGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTCTTAAAGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ACCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ATGAGCAAGTGAATGTAATGTAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CCAAAGTACAGTGGAGTGGATGACCCGCTCCAAATCGGCTAATCCAGGAGATGTTGTCACAGAG
GACAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAG
AGAAACAAAGTCTAGGCTGCGAAAGTCCAGGCTGCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGG
TCCAACGGGAGGAGTGTAGAGGAGAAAGTCCCGCCACTGCTCCAGTCTCCAGCTGCTGACCCCT
TCCATCTTGGCTCTGACCCCTTTTCCAGAGGGGAGCTACCCCTATGCGGCTCTCCAGCTACT
CTTGCCTCAACCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AAAGTGAATCTTTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ACTACTCAATTTCTCTTACGAGTAACTTGTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AATCACTCTCTCTTATTTTACCTATCATCTCTGCAAGGCAAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTG
AGGCTCATAGTCTTCTTAAAGGTTGACAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GAATCAACAGGCAAAATTTTCAAGAGGAAAGTCTGCTAATAAGAGATCATTCATTGCAACA
TGATATAAATAACACAACTAAAGGAAATTAAGCAATAAAGGAAATAGGAAATGTTAAAGTTC
ATCATGCTAGCTTAAAGGATGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TATCTG
ATTAAGAACTTCAATAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CCGCAATCCACTCTAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AATTAAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGGCTG
AAGCCCAATAGGAGCTTCCATGAGCTCAATGGTGGATTTAAAGGCTAAATGCGGCTGCTGCTG
AGTACATCAAGTATCATATGCAAGTACGCGCCCTATGAGCTCAATGAGGCTAAATGCGCCG

FIG. 2A

【 図 2 B 】

CTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTCTGTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTC
ATGCTTATACCAATGGTATGGGGTTTGGCACTACATCAATGGGGTGGATAGCGGTTTGAATCA
CGGGGATTTCCAAAGTCTCCACCCCTTGGAGTCAATGGGAGTGTGTTTGGGACCAAAATCAACGG
GACTTCCAAAATGTTGTAAACAACCTGCGCCATTGACGCAAAATGGGCGTACGGCTGTACGGTG
GGAGGCTTATTAAGCAAGAGCTCTGGGTTGATCTTTAGAGGAGGAGTGAAGGAGGAAATGGTCTA
TAAATACGACTACTATAGGAGAGCAACCGTCTGAGGCTGATAGTGTGCTTGTAGGCTGT
TTGTTGCTGATGTTTGGTACTTCTGGTGAAGAGAGGAGGAGTGAAGGAGGAAATGGTCTA
CGAGGAGGAGTGAATCCCATTTGCTTATTCATGTACTGTGGCATGGGTGAGGAGAGATGGTCTTATC
TCAAGATGGGCTTCTGGGCTGCTGGGTTGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATGATG
AATGAAGTATGAAATGGTGTGCTGGGATGCTTAAGTAAATGCTTAAAGTAAATGCTTAAAGTAA
GCAATTCACCTTTTGTGTAAGAGAGATTTTAAAGGCTAATAAAAAATGTTAATGAAATGTTCAATG
AATTTGTGTATAATGTTATGTTCTCTCATTTGTTTCAAGTCTTAAAGGACGCTGGTGTAGGAG
CAGACCCGCTGTCTGCGGCTGACCGCGGAGGCGCGCTCCATCTCCGCAAGATCTAGTCAAG
AGTGTGTACACCGTTATGGAAGCACTTATACATTTGTAAGTCTGCAAGGCAAGCGAGCTGCGA
AAGCTCTGATTCACAAAGTTTCCAAACGATTTCTGGGGTCCAGCAGGTTTCAAGTGGAGTGA
TCAGGACAGATTCACACTAAGTACAGAGGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGT
TCTCAAGTACAGATTTCTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
AGTGTGTACAGGTTTCAAGAGAGCTAAAGACTATGCAAGTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCT
ACTAAGCTGGGGTCCCGCAATCTAACTGCTGAGGGGTGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAGTGGAG
AAGACTTGGATTTACTGCAAGTCCAGAAAGACTAAAGGCTCAAGGCTGCAAGAGGCT
CCAAACAAACAAATTTAGAACCTTAAATGAAATAGGGGAGGAGTGGAGGAAAGCTCAAAACAA
AGATTTTAAATAGCTTGTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GTCTTAAAGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ACCATCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ATGAGCAAGTGAATGTAATGTAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CCAAAGTACAGTGGAGTGGATGACCCGCTCCAAATCGGCTAATCCAGGAGATGTTGTCACAGAG
GACAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAGGCAAG
AGAAACAAAGTCTAGGCTGCGAAAGTCCAGGCTGCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGGCTGCGAGG
TCCAACGGGAGGAGTGTAGAGGAGAAAGTCCCGCCACTGCTCCAGTCTCCAGCTGCTGACCCCT
TCCATCTTGGCTCTGACCCCTTTTCCAGAGGGGAGCTACCCCTATGCGGCTCTCCAGCTACT
CTTGCCTCAACCGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AAAGTGAATCTTTCAGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
ACTACTCAATTTCTCTTACGAGTAACTTGTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AATCACTCTCTTATTTTACCTATCATCTCTGCAAGGCAAGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CTG
AGGCTCATAGTCTTCTTAAAGGTTGACAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GAATCAACAGGCAAAATTTTCAAGAGGAAAGTCTGCTAATAAGAGATCATTCATTGCAACA
TGATATAAATAACACAACTAAAGGAAATTAAGCAATAAAGGAAATAGGAAATGTTAAAGTTC
ATCATGCTAGCTTAAAGGATGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TATCTG
ATTAAGAACTTCAATAAATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CCGCAATCCACTCTAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AATTAAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGGCTG
AAGCCCAATAGGAGCTTCCATGAGCTCAATGGTGGATTTAAAGGCTAAATGCGGCTGCTGCTG
AGTACATCAAGTATCATATGCAAGTACGCGCCCTATGAGCTCAATGAGGCTAAATGCGCCG

FIG. 2B

【 図 2 C 】

AAAGCATGATCCAACTAACCTGATTAATAAAGTCTGCGAGGGTCCAGACATGATAAAGTACA
TTGATGATTTGGACACCAACACTGAGTGTGCACTGTAATAAAAAATGCTTATTTGTGAAATTTGTG
ATGCTATGCTTATTTGTAACCAATAGAACGCTGCAATAAACAAGTAAAGAAACAACAATAATGATTC
ATTTATGTTTCAAGGTTCAAGGGGAGGTGGGAGGTTTAAAGCAAGTAAACAACCTTCAAAAT
GTGATGCTGCTGATTTGATGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GCACTG
GCGGCTG
GTGATACTG
AAATACCGCACAGATGGTAAAGGAAATAAACCAGTACAGGCGCTCTGCGCTCTCCGCTCACTG
ACTCGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
TATCCACAGATCAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GAAAGCTAAAGGCGCGTCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
AAATGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGCTG
AATGAGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
CGCTG
AAGCCCAATAGGAGCTTCCATGAGCTCAATGGTGGATTTAAAGGCTAAATGCGGCTGCTGCTG
AGTACATCAAGTATCATATGCAAGTACGCGCCCTATGAGCTCAATGAGGCTAAATGCGCCG

FIG. 2C

【 図 3 A 】

D-V-V-M-T-Q-T-P-L-S-L-P-V-T-P-G-E-P-A-S-I-S-C-R-S-S-Q-S-L-V-H-R-N-G-N-T-Y-
L-W-Y-L-Q-K-P-G-Q-S-P-K-L-L-H-K-V-S-N-R-F-S-G-V-P-D-R-F-S-G-S-G-S-G-T-
D-F-T-L-K-L-S-R-V-E-A-E-D-L-G-V-Y-F-C-S-Q-S-T-H-V-P-P-L-T-F-G-A-G-T-K-L-E-
L-K-R-T-V-A-P-S-V-F-L-F-P-P-S-D-E-Q-L-K-S-G-T-A-S-V-V-C-L-J-L-N-F-Y-P-R-
E-A-K-V-Q-W-K-V-D-N-A-L-Q-S-G-N-S-Q-E-S-V-T-E-Q-D-S-K-D-S-T-Y-S-L-S-S-T-
L-T-L-S-K-A-D-Y-E-K-H-K-V-Y-A-C-E-V-H-Q-L-S-S-P-V-T-K-S-F-N-R-G-E-C
(配列番号 5)

FIG. 3A

【 図 2 D 】

GTITTCCTACCATAATACCAGATTTGTTTACTCTCCACTGAAGAGGTTGTGGTCTTCTTGGG
AGTACTTGAAGCTGTTCTGAGGCGGAGCGAGGTTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTG
GGACAGCGGACGATGAGTCAATGGTGAACCAATGAGGGCACAAGCTAGCTTGTGCAAAAAG
CTAGGCTCCTAAAATAAAGGCTCTCACTACTCTGGAATAGCTCAGAGGCGAGGGCGCTGGCCG
TCTGCTAAAATGCAAAAATGAGGCTGCTGAGGCTGCTGAGGCTGCTGAGGCTGCTGAGGCTGCTG
GGGCGGATGAGGCGGATTTAGGCTGCTGAGGCTGCTGAGGCTGCTGAGGCTGCTGAGGCTGCTG
TACTTCTG
TTGCTG
(SEQ ID NO. 4)

FIG. 2D

【 図 3 B 】

ヒト化された免疫グロブリン重鎖

FIG. 3B

【 3 B 】

ヒト化された免疫グロブリン重鎖-1-1-2

E-V-Q-L-Y-Q-S-G-A-E-V-E-K-F-G-A-S-V-K-I-S-C-K-A-S-G-S-S-F-T-G-Y-N-M-L-N-W-V-R-Q-N-I-G-K-S-L-E-W-I-G-
 A-I-D-P-Y-G-G-T-S-Y-N-Q-K-F-K-G-R-A-T-L-T-Y-D-K-S-T-S-T-A-Y-M-H-L-K-S-L-R-S-E-D-T-A-V-Y-Y-C-V-S-
 G-M-E-Y-W-G-Q-G-T-S-V-T-V-S-S-A-S-T-K-G-P-S-V-F-P-L-A-P-S-S-K-S-T-S-G-G-T-A-A-I-G-C-L-V-K-D-Y-F-P-
 E-P-V-T-V-S-W-N-S-G-A-L-T-S-G-V-H-T-F-P-A-V-I-Q-S-S-G-L-Y-S-L-S-S-V-V-T-V-P-S-S-L-Q-T-Q-T-Y-I-C-N-
 V-N-H-K-P-S-N-T-K-V-D-K-R-V-E-P-K-S-C-D-K-T-H-T-C-P-P-C-P-A-P-E-L-L-G-G-P-S-V-F-L-F-P-K-P-K-D-T-L-
 M-I-S-R-T-P-E-Y-T-C-V-V-D-V-S-H-E-D-P-E-V-K-F-N-W-Y-Y-D-G-Y-E-V-H-N-A-K-T-K-P-R-E-Q-Y-N-S-T-Y-
 R-V-V-S-V-L-T-V-I-L-H-Q-D-W-L-N-G-K-E-Y-K-C-K-V-S-N-K-A-L-P-A-P-I-E-K-T-I-S-K-A-K-G-Q-P-R-E-P-Q-Y-Y-
 T-L-P-P-S-R-E-M-T-K-N-Q-V-S-I-T-C-L-V-K-G-F-Y-P-S-D-I-A-V-E-W-E-S-N-G-Q-P-E-N-N-Y-K-T-T-P-P-V-L-D-
 S-D-G-S-F-F-L-Y-S-K-L-T-Y-D-K-S-R-W-Q-Q-G-N-V-F-S-C-S-V-M-H-E-A-L-H-N-H-Y-T-Q-K-S-L-S-L-S-P-G-A-P-
 T-S-S-T-K-K-T-Q-I-Q-L-E-H-L-L-D-L-Q-M-H-L-N-G-I-N-N-Y-K-N-P-K-L-T-R-M-L-T-F-K-F-Y-M-P-K-K-A-T-
 E-L-K-H-L-Q-C-L-E-E-E-L-K-P-L-E-E-V-L-N-L-A-Q-S-K-N-F-H-L-R-R-D-L-I-S-N-I-N-V-I-V-L-E-L-K-G-S-E-T-T-
 F-M-C-E-Y-A-D-E-T-A-T-V-E-F-L-N-R-W-I-T-T-C-Q-S-I-S-T-L-T (配列番号6)

FIG. 3B

【配列表】

0004494977000001.xml

フロントページの続き

- (74)代理人 100106138
弁理士 石橋 政幸
- (74)代理人 100120628
弁理士 岩田 慎一
- (74)代理人 100127454
弁理士 緒方 雅昭
- (72)発明者 ジリーズ、 スティーブン ディー .
アメリカ合衆国 01741 マサチューセッツ州 カーライル サンセット ロード 159
- (72)発明者 口、 キン - ミン
アメリカ合衆国 02420 マサチューセッツ州 レキシントン キャロル レーン 6

審査官 滝口 尚良

- (56)参考文献 特表2004-532620(JP, A)
特表平09-508272(JP, A)
国際公開第97/002290(WO, A1)
国際公開第97/044362(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 16/00-16/46
C12N 15/00-15/90
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
UniProt/GeneSeq
PubMed
WPI
BIOSIS(STN)
CAplus(STN)
MEDLINE(STN)