

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2006-515750

(P2006-515750A)

(43) 公表日 平成18年6月8日(2006.6.8)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 B O 6 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 B O 6 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 C O 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 H O 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2004-562588 (P2004-562588)
 (86) (22) 出願日 平成15年12月22日 (2003.12.22)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年7月26日 (2005.7.26)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/041393
 (87) 国際公開番号 W02004/058191
 (87) 国際公開日 平成16年7月15日 (2004.7.15)
 (31) 優先権主張番号 60/435,154
 (32) 優先日 平成14年12月20日 (2002.12.20)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 592221528
 バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド
 アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02142、ケンブリッジ、ケンブリッジ センター 14
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多価リンホトキシンβレセプターアゴニストおよびそれを使用する治療

(57) 【要約】

ヒトリンホトキシンベータ受容体に特異的な多価抗体構築物、並びに対象における癌の治療および腫瘍容量の抑制におけるその使用を開示する。本発明はヒトリンホトキシンベータ受容体 (L T - - R) アゴニストである多価抗体構築物を提供する。1つの実施形態において、多価抗体構築物は L T - - R エピトープに特異的な抗原認識部位少なくとも1つを含む。特定の実施形態においては、抗原認識部位少なくとも1つは s c F v ドメイン上に位置し、別の実施形態においては全ての抗原認識部位は s c F v ドメインに位置する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

リンホトキシン - レセプター (L T - R) エピトープに対して特異的な抗原認識部位を少なくとも 1 つ含む、多価抗体。

【請求項 2】

少なくとも 1 つの抗原認識部位が、 s c F v ドメイン上に位置する、請求項 1 に記載の多価抗体。

【請求項 3】

全ての抗原認識部位が、 s c F v ドメイン上に位置する、請求項 1 に記載の多価抗体。

【請求項 4】

前記抗体構築物が、単一特異性である、請求項 1 に記載の多価抗体。

【請求項 5】

前記抗体構築物が、 C B E 1 1 が結合するエピトープに対して特異的である、請求項 4 に記載の多価抗体。

【請求項 6】

前記抗体構築物が、4 価である、請求項 5 に記載の多価抗体。

【請求項 7】

前記抗体構築物が、 B H A 1 0 エピトープに対して特異的である、請求項 4 に記載の多価抗体。

【請求項 8】

前記抗体構築物が、4 価である、請求項 7 に記載の多価抗体。

【請求項 9】

少なくとも 1 つの抗原認識部位が、 s c F v ドメイン上に位置する、請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の多価抗体。

【請求項 10】

全抗原認識部位が、 s c F v ドメイン上に位置する、請求項 4 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の多価抗体。

【請求項 11】

前記抗体構築物が、二重特異性である、請求項 1 に記載の多価抗体。

【請求項 12】

前記抗体構築物が B K A 1 1、C D H 1 0、B C G 6、A G H 1、B D A 8、C B E 1 1 および B H A 1 0 よからなるリンホトキシン - レセプター (L T - R) エピトープの群の少なくとも 2 つのメンバーに対して特異的である、請求項 11 に記載の多価抗体。

【請求項 13】

前記抗体構築物が、C B E 1 1 エピトープおよび B H A 1 0 エピトープに対して特異的である、請求項 12 に記載の多価抗体。

【請求項 14】

前記抗体構築物が、4 価である、請求項 13 に記載の多価抗体。

【請求項 15】

前記抗体構築物が、2 つの C B E 1 1 特異的抗原認識部位および 2 つの B H A 1 0 特異的認識部位を有する、請求項 14 に記載の多価抗体。

【請求項 16】

少なくとも 1 つの抗原認識部位が、 s c F v ドメイン上に位置する、請求項 11 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の多価抗体。

【請求項 17】

全抗原認識部位が、 s c F v ドメイン上に位置する、請求項 11 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の多価抗体。

【請求項 18】

癌の処置のための医薬の調製のための、請求項 1 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の抗体の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 19】

請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項の多価抗体構築物の有効量および薬学的に受容可能なキャリアを含有する、薬学的組成物。

【請求項 20】

被験体に請求項 19 の組成物の有効量を投与する工程を包含する、該被験体における癌を治療する方法。

【請求項 21】

該前記被験体が、ヒトである、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

配列番号 1 を含む核酸。

10

【請求項 23】

配列番号 3 を含む核酸。

【請求項 24】

配列番号 5 を含む核酸。

【請求項 25】

配列番号 7 を含む核酸。

【請求項 26】

配列番号 9 を含む核酸。

【請求項 27】

配列番号 2 を含むポリペプチド。

20

【請求項 28】

配列番号 4 を含むポリペプチド。

【請求項 29】

配列番号 6 を含むポリペプチド。

【請求項 30】

配列番号 8 を含むポリペプチド。

【請求項 31】

配列番号 10 を含むポリペプチド。

【請求項 32】

請求項 22 ~ 31 に記載の核酸のいずれか 1 つを含む、発現ベクター。

30

【請求項 33】

請求項 32 に記載の発現ベクターを含む、細胞。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

(関連出願)

本出願は 2002 年 12 月 20 日に出願された米国特許出願 60 / 435154 の優先権を主張する。本出願はまた 2002 年 12 月 20 日に出願された米国特許出願 60 / 435185 に関連する。これ等の特許および特許出願の各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

40

【0002】

(発明の分野)

本発明は免疫学および癌の診断および治療の分野に属する。特に治療方法において化学療法剤と組み合わせた多価リンホトキシンベータ受容体 (LT - R) アゴニスト抗体構築物の製造および使用に関する。

【背景技術】

【0003】

(背景)

リンホトキシンベータ受容体 (LT - R) は、免疫系における発達において、および、濾胞性樹状細胞を含む免疫系における細胞の多数および乾湿細胞型の多数の機能的維

50

持において、十分検討された役割を有する腫瘍壊死因子ファミリーのメンバーである (Matsumoto ら, 1996, Immunol. Rev. 156: 137)。LT-R に対する既知のリガンドには LT 1/2 および LIGHT と称される第 2 のリガンドが包含される (Mauri ら, 1998, Immunity 8: 21)。可溶性リガンドまたはアゴニスト抗受容体モノクローナル抗体のいずれかによる LT-R の活性化は特定の癌の死滅を誘導することがわかっている (Browning, J. L. ら, (1996), J. Exp. Med. 183: 867-878 および米国特許 6,312,691 号)。

【0004】

本発明は多価の LT-R アゴニストおよびその治療上の使用を提供する。

10

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0005】

(発明の要旨)

本発明はヒトリンホトキシンベータ受容体 (LT-R) アゴニストである多価抗体構築物を提供する。1つの実施形態において、多価抗体構築物は LT-R エピトープに特異的な抗原認識部位少なくとも1つを含む。特定の実施形態においては、抗原認識部位少なくとも1つは scFv ドメイン上に位置し、別の実施形態においては全ての抗原認識部位は scFv ドメインに位置する。

【0006】

本発明はリンホトキシン-ベータ受容体 (LT-R) エピトープに特異的な抗原認識部位少なくとも1つを含む多価抗体を提供する。1つの実施形態においては、抗原認識部位少なくとも1つは scFv ドメイン上に位置する。別の実施形態においては、全ての抗原認識部位が scFv ドメイン内に位置する。更に別の実施形態においては、抗体構築物は、例えば CBE11 が結合するエピトープに対して単一特異性である。更に別の実施形態においては、本発明の多価抗体は4重特異性である。更に別の実施形態においては、抗体構築物は BHA10 エピトープに特異的である。本発明の更に別の実施形態においては抗体構築物は二重特異性である。1つの実施形態においては、抗体構築物は CBE11 特異的抗原認識部位2つおよび BHA10 特異的認識部位2つを有する。

20

【0007】

抗体構築物は二価、三価、四価または五価であってよい。特定の実施形態においては、抗体構築物は単一特異性である。1つの実施形態において、抗体構築物は CBE11 が結合するエピトープに対し手特異的であり、そして一部の実施形態においては4価である。別の実施形態においては、抗体構築物は BHA10 が結合するエピトープに対して特異的であり、そして一部の実施形態においては4価である。特定の実施形態においては、抗原認識部位の少なくとも1つが scFv ドメイン内に位置する。特定の実施形態においては、全ての抗原認識部位が scFv ドメイン内に位置する。他の抗体構築物はヒト LT-R 受容体上の異なるエピトープに対して多重特異性であってよい。特定の実施形態においては、抗体構築物は二重特異性である。他の実施形態においては、抗体構築物は BKA11、CDH10、BCG6、AGH1、BDA8、CBE11 および BHA10 よりなるリンホトキシン-ベータ受容体 (LT-R) エピトープの群のメンバー少なくとも2つに対して特異的である。1つの実施形態においては、抗体構築物は CBE11 および BHA10 が結合するエピトープに対して特異的であり、そして特定の実施形態においては、4価である。1つの実施形態においては、抗体構築物は CBE11 特異的抗原認識部位2つおよび BHA10 特異的認識部位2つを有する。多重特異性抗体構築物のいずれかにおいて、抗原認識部位少なくとも1つは scFv ドメイン上に位置し、そして特定の実施形態においては、全ての抗原認識部位が scFv ドメイン上に位置する。

30

40

【0008】

本発明は更に配列番号1~10を含む抗体構築物並びにこれをコードする核酸およびベクター、およびその核酸およびベクターを含む宿主細胞を提供する。

50

【0009】

別の特徴において、本発明は対象となる抗体構築物および薬学的に受容可能なキャリアを含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態においては、医薬組成物は更に有効量の化学療法剤を含んでよく、ここで該組成物の対象への投与により腫瘍の超相加作用的抑制がもたらされる。別の特徴において、本発明は対象となる多価抗体構築物の有効量および薬学的に受容可能なキャリアを含むか、これを負荷されることができ、これを負荷されることができ、ここで該装置を用いた構築物および薬剤の投与により腫瘍の超相加作用的抑制がもたらされる。

【0010】

別の特徴において、本発明は対象となる抗体構築物の有効量を対象に投与することを含む対象における癌の治療のための方法を提供する。特定の実施形態においては、対象はヒトである。本発明はまた対象に対象となる抗体構築物の有効量を投与する工程を含む対象における腫瘍容量の抑制の方法を提供する。特定の実施形態においては、腫瘍容量の抑制方法は対象となる抗体構築物有効量および化学療法剤を対象に投与することを含み、ここで該構築物および該薬剤の投与は腫瘍の超相加作用的抑制をもたらす。

10

【0011】

本発明は更に、対象となる医薬組成物または薬剤送達装置および場合によりその使用説明書を含むキットを提供する。このようなキットの使用は例えば治療用途を包含する。特定の実施形態においては、何れかのキットに含有される対象となる組成物は凍結乾燥されており、使用前に再水和する必要がある。

20

【0012】

1つの実施形態においては、本発明の多価抗体を含む医薬組成物は更に化学療法剤有効量を含み、ここで該組成物の投与により腫瘍の超相加作用的抑制がもたらされる。本発明はまた本発明の多価抗体構築物の有効量および薬学的に受容可能なキャリアを含む医薬組成物を記載する。1つの実施形態においては、医薬組成物は更に化学療法剤の有効量を含み、ここで該組成物の投与により腫瘍の超相加作用的抑制がもたらされる。

【0013】

本発明は本発明の多価抗体構築物の有効量および薬学的に受容可能なキャリアを含むか、これを負荷されることができ、これを負荷されることができ、ここで該装置を用いた該構築物および該薬剤の投与により腫瘍の超相加作用的抑制がもたらされる。

30

【0014】

本発明はまた本発明の多価抗体を含む組成物を含む、対象における癌の治療のためのキットを包含する。1つの実施形態においては、キットはまた取扱説明書を含む。別の実施形態においては、キットは化学療法剤を含む。

【0015】

本発明はまた本発明の多価抗体構築物の有効量を対象に投与する工程を含む該対象における腫瘍容量を抑制する方法を記載する。

40

【0016】

本発明の他の特徴および利点は以下の詳細な説明および請求項から明らかにされる。

【0017】

(発明の詳細な説明)

(1. 定義)

簡便のために、本発明を更に説明する前に、明細書、実施例および請求項中で使用する特定の用語をここに定義する。

【0018】

特段の記載が無い限り単数表記は複数表記を包含するものとする。

【0019】

50

「投与する」という用語は例えば医薬組成物、対象の系に対し、または対象の特定の領域に対し、又は対象に対し、治療薬を包含する本発明の化合物の送達のための何れかの方法を包含する。「全身投与」、「全身に投与する」、「末梢投与」および「末梢に投与する」という表現は本明細書においては、患者の系内に進入し、これにより代謝および他の同様の過程に付されるように、中枢神経系へ直接ではない化合物、薬剤または他の物質の投与、例えば皮下投与を意味する。「非経腸投与」および「非経腸的に投与する」とは、通常は注射による、経腸的および局所的な投与以外の投与の様式を意味し、そして例えば、静脈内、筋肉内、動脈内、硬膜内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、脊髄内および胸骨内の注射および注入を包含する。

10

【0020】

本明細書においては「抗体」という用語は完全な、未損傷の抗体、およびFab、Fab'、F(ab)₂、Fvおよびその他のフラグメントを意味する。完全な、未損傷の抗体には、例えばモノクローナル抗体、例えばネズミモノクローナル抗体、キメラ抗体、抗イディオタイプ抗体、抗-抗-イディオタイプ抗体、および、ヒト化抗体、並びにその多価の形態が包含される。「免疫グロブリン」または「抗体」（本明細書においては、互換的に使用する）とは、2つの重鎖および2つの軽鎖よりなる基本的な4ポリペプチド鎖構造を有する抗原結合蛋白を指し、ここで該鎖は例えば抗原を特異的に結合する能力を有する鎖間のジスルフィド結合により安定化されている。重鎖および軽鎖は共にドメイン内に折り込まれる。「ドメイン」という用語は例えば プリーツシートおよび/または鎖内ジスルフィド結合により安定化されたペプチドループを含む（例えば3~4ペプチドループを含む）重鎖または軽鎖のポリペプチドの球状の領域を指す。ドメインは更に本明細書においては、「定常」ドメインの場合は種々のクラスのメンバーのドメイン内の配列の変異の相対的欠如、または、「可変」ドメインの場合は種々のクラスのメンバーのドメイン内の顕著な変異に基づいて、「定常」または「変異」とされる。軽鎖上の「定常」ドメインは「軽鎖定常領域」、「軽鎖定常ドメイン」、「CL」領域または「CL」ドメインとも互換的に称される。重鎖上の「定常」ドメインは「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「CH」領域または「CH」ドメインとも互換的に称される。軽鎖上の「可変」ドメインは「軽鎖可変領域」、「軽鎖可変ドメイン」、「VL」領域または「VL」ドメインとも互換的に称される。重鎖上の「可変」ドメインは「重鎖定常領域」、「重鎖定常ドメイン」、「CH」領域または「CH」ドメインとも互換的に称される。

20

30

【0021】

「領域」という用語は抗体鎖の部分または区分を指し、そして、本明細書において定義する定常または可変ドメイン、並びに該ドメインのより異なる部分または区分を包含する。例えば、軽鎖可変ドメインまたは領域は本明細書において定義するとおり「フレームワーク領域」即ち「FR」内に展開している「相補性決定領域」即ち「CDR」を包含する。

【0022】

免疫グロブリンまたは抗体は単量体または多量体の形態で存在できる。「抗原結合フラグメント」という用語は免疫グロブリンまたは抗体のポリペプチドフラグメントを指し、抗原に結合するか、または、抗原結合（即ち特異的結合）のための未損傷の抗体と（即ち自身の誘導元である未損傷の抗体と）競合する。「コンホーメーション」という用語は蛋白またはポリペプチド（例えば抗体、抗体鎖、そのドメインまたは領域）の3次構造を指す。例えば「軽（または重）鎖のコンホーメーション」という表現は、軽（または重）鎖の可変領域の3次構造を指し、そして、「抗体コンホーメーション」または「抗体フラグメントコンホーメーション」という表現は抗体またはそのフラグメントの3次構造を指す。

40

【0023】

結合フラグメントは、組み換えDNA法によるか、または、未損傷の免疫グロブリンの酵素的または化学的切断により製造する。結合フラグメントにはFab、Fab'、F(

50

a b ')₂、F a b c、F v、単一鎖および単一鎖抗体が包含される。「二重特異性」または「2官能性」の免疫グロブリンまたは抗体以外については、免疫グロブリンまたは抗体はその結合部位の各々を同一としていると理解される。「二重特異性」または「2官能性の抗体」は2つの異なる重/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工のハイブリッド抗体である。二重特異性抗体はハイブリドーマの融合またはF a b ' フラグメントの連結を含む種々の方法により製造できる。例えばS o n g s i v i l a i & L a c h m a n n , C l i n . E x p . I m m u n o l . 7 9 : 3 1 5 - 3 2 1 (1 9 9 0) ; K o s t e l n y ー , J . I m m u n o l . 1 4 8 , 1 5 4 7 - 1 5 5 3 (1 9 9 2) を参照できる。

【0024】

10

「抗体構築物」という用語は抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメインから得られる抗原結合フラグメント2つ以上を含む組み換え分子を指し、そして、5種のI gクラス(例えばI g A、I g D、I g E、I g GおよびI g M)の何れかから選択される抗体の定常領域の全体または部分を含んでよい。例えば、抗体構築物は単一の鎖可変フラグメントをそのC末端において自身の重鎖が含んでいる抗体から作成してよい。別の例においては、抗体構築物は単一鎖の可変フラグメントを自身のカルボキシおよびアミノ末端において含む抗体の2つの重鎖の定常領域の全体または部分から作成してよい。これ等の構築物の各々の例を図6に模式的に示す。別の例においては、抗体構築物は可変領域2つ以上を有する重鎖2つおよび可変領域1つ以上を有する軽鎖2つを含んでよく、ここで重鎖2つはジスルフィド結合または他の共有結合により連結されている。別の例においては、抗体構築物は可変領域2つ以上を含む重鎖2つを含んでよく、ここで重鎖2つはジスルフィド結合または他の共有結合により連結されている。これ等の構築物の各々の例を図7に模式的に示す。本発明の抗体構築物の別の例は本発明の詳細な説明および実施例に記載するとおりである。

20

【0025】

「抗原」という用語は本明細書においては特定の抗体と反応する分子を意味する。

【0026】

「抗原結合部位」または「抗原認識部位」という用語は抗原上のエピトープに特異的に結合する抗体の領域を指す。

【0027】

30

「癌」または「新生物」という用語は一般的には何れかの悪性新生物または細胞の自発的成育または増殖を指す。用語は本明細書においては、完全に生育した悪性新生物並びに前悪性の患部の両方を包含するものとする。例えば「癌」を有する対象は腫瘍または白血病のような白血球増殖を有することができる。特定の実施形態においては、癌を有する対象は腫瘍、例えば固形腫瘍を有する対象である。固形腫瘍を包含する癌は例えば非小細胞肺癌(N S C L C)、精巣癌、肺癌、卵巣癌、子宮癌、子宮頸癌、膵臓癌、結腸直腸癌(C R C)、乳癌並びに前立腺、胃、皮膚、腹部、食道および膀胱の癌を包含する。

【0028】

「化学療法剤」という用語は外来の細胞または腫瘍細胞のような悪性細胞により誘発される疾患を治療するために使用される何れかの小分子または組成物を指す。化学療法剤の非限定的な例は、DNA合成を途絶する薬剤を包含し、そしてトポイソメラーゼIの阻害剤であり、アルキル化剤であり、または、植物アルカロイドである。「DNA合成を途絶する薬剤」という用語はDNA合成の過程を低減するか抑制することができる何れかの分子または化合物を指す。DNA合成を途絶させる薬剤の例は、ヌクレオシド類縁体、例えばピリミジンまたはプリン類縁体、例えばゲムシタピン、またはアントラサイクリン化合物、例えばアドリアマイシン、ダウノムブシン、ドキシソルピシンおよびイダムピシン、および、エピドポフィロトキシン、例えばエトポシドおよびテニポシドである。「トポイソメラーゼI阻害剤」という用語はトポイソメラーゼI酵素の生物学的活性を抑制または低減する分子または化合物を指す。カンプトサルが挙げられる。「アルキル化剤」という用語は蛋白または核酸のような他の分子の親核基(例えばアミン、アルコール、フェノー

40

50

ル、有機および無機の酸)と反応し、これによりアルキル基(例えばエチルまたはメチル基)を付加させることができる何れかの分子または化合物を指す。化学療法剤として使用されるアルキル化剤の例はビスルファン、クロラムブシル、シクロホスファミド、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、チオテパ、種々のニトロソ尿素化合物および白金化合物、例えばシスプラチンおよびカルボプラチンを包含する。「植物アルカロイド」という用語は生物学的に活性であり細胞毒性である植物に由来するアルカリ性の窒素含有分子のファミリーに属する化合物を指す。植物アルカロイドの例はタキサン類、例えばタキソール、ドセタキセルおよびパクリタキセル、および、ビンカ類、例えばビンブラスチン、ピンクリスシンおよびビノレルピンを包含する。

【0029】

「キメラ抗体」という用語は自身の軽鎖および重鎖の遺伝子が種々の種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから遺伝子工学により典型的には構築されている抗体を指す。例えばマウスモノクローナル抗体の遺伝子の可変(V)セグメントをヒト定常(C)セグメント、例えばIgG1およびIgG4に連結してよい。ヒトアイソタイプIgG1が好ましい。即ち典型的なキメラ抗体はマウス抗体由来のVまたは抗原結合ドメインおよびヒト抗体由来のCまたはエフェクタードメインよりなるハイブリッド蛋白である。

10

【0030】

「有効量」という用語は例えばインビトロまたはインビボのいずれかで腫瘍の容量を低減することを包含する所望の結果をもたらすために十分な本発明の化合物を含む化合物、物質または組成物の量を指す。本発明の医薬組成物の有効量は患者における癌の発達を軽減、安定化、防止または遅延させることを含む所望の臨床結果をもたらすために十分な医薬組成物の量である。何れの場合においても本発明の化合物の有効量は1回以上の投与において投与することができる。これ等上記したインジケータの検出および測定は当業者の知るとおりであり、例えば腫瘍付加の低減、腫瘍大きさの抑制、二次腫瘍の増殖の低減、腫瘍組織における遺伝子発現、バイオマーカーの存在、リンパ節の関与、組織学的等級および核の等級である。

20

【0031】

「エピトープ」という用語は優先的および特異的に抗体または抗体構築物が結合する抗原の領域である。モノクローナル抗体は分子的に定義することができる分子の単一の特異的なエピトープに優先的に結合する。本発明においては、多重エピトープは多重特異性抗体により認識されることができる。

30

【0032】

「腫瘍容量の抑制」という用語は、腫瘍の容量の低減または減少の何れかを指す。

【0033】

「ヒト化免疫グロブリン」または「ヒト化抗体」という用語はヒト化免疫グロブリンまたは抗体鎖少なくとも1つ(即ちヒト化軽鎖または重鎖の少なくとも1つ)を含む免疫グロブリンまたは抗体を指す。「ヒト化免疫グロブリン鎖」または「ヒト化抗体鎖」(すなわち「ヒト化免疫グロブリン軽鎖」または「ヒト化免疫グロブリン重鎖」という用語は、ヒトの免疫グロブリンおよび抗体に実質的に由来する可変のフレームワーク領域および非ヒトの免疫グロブリンまたは抗体に実質的に由来する相補性決定領域(CDR)(例えば少なくとも1つのCDR、好ましくは2つのCDR、より好ましくは3つのCDR)を含み、そして、更に定常領域(例えば軽鎖の場合は少なくとも1つの定常領域またはその区分、および好ましくは重鎖の場合は3つの定常領域)を含む可変の領域を有する免疫グロブリンまたは抗体の鎖(即ちそれぞれ軽鎖または重鎖)を指す。「ヒト化可変領域」(例えば「ヒト化軽鎖可変領域」または「ヒト化重鎖可変領域」という用語は、ヒト免疫グロブリンまたは抗体に実質的に由来する可変フレームワーク領域および非ヒト免疫グロブリンまたは抗体に実質的に由来する相補性決定領域(CDR)を含む可変の領域を指す。

40

【0034】

「リンホトキシン-ベータ受容体(LT-R)アゴニスト」という用語はLT-

50

- R、細胞表面 L T - - R クラスティングおよび / または L T - - R シグナリングに結合するリガンドを増強できる何れかの薬剤を指す。

【 0 0 3 5 】

「多価抗体」または「多価抗体構築物」という表現は抗原認識部位 1 つより多くを含む抗体または抗体構築物を指す。例えば「2 価」抗体構築物は抗原認識部位 2 つを有し、「4 価」抗体構築物は抗原認識部位 4 つを有する。「単一特異性」、「二重特異性」、「三重特異性」、「4 重特異性」等の用語は本発明の多価抗体構築物中に存在する異なる抗原認識部位特異性の数（抗原認識部位の数とは異なる）を指す。例えば、「単一特異性」抗体構築物の抗原認識部位は全て同じエピトープに結合する。「二重特異性」抗体構築物は第 1 のエピトープに結合する抗原認識部位少なくとも 1 つおよび第 1 のエピトープとは異なる第 2 のエピトープに結合する抗原認識部位少なくとも 1 つを有する。「多価単一特異性」抗体構築物は全てが同じエピトープに結合する複数の抗原認識部位を有する。「多価 2 重特異性」抗体構築物は複数の抗原認識部位を有し、その一部の数量は第 1 のエピトープに結合し、一部の数量は第 1 のエピトープとは異なる第 2 のエピトープに結合する。「二重特異性 - 1」（「B S - 1」とも称する）、「二重特異性 - 2」（「B S - 2」とも称する）、「単一特異性 - 1」（「M S - 1」とも称する）および「単一特異性 - 2」（「M S - 2」とも称する）という用語は本明細書において更に説明する特定の抗体構築物を指す。本発明の 1 つの実施形態においては、抗体は、図 6 B に示す通り、抗体が C B E 1 1 抗原認識部位 4 つを含む単一特異性 4 価抗体である。

10

【 0 0 3 6 】

「患者」または「対象」または「宿主」とはヒトまたは非ヒトの動物のいずれかを指す。

20

【 0 0 3 7 】

「医薬品送達装置」という用語は対象に治療薬または薬剤を投与するために使用してよい何れかの装置を指す。医薬品送達装置の非限定的な例には皮下シリンジ、マルチチャンバーシリンジ、ステント、カテーテル、経皮パッチ、マイクロニードル、マイクロアブレイダーおよび移植可能な制御放出装置が包含される。1 つの実施形態においては、「医薬品送達装置」という用語は注射前に 2 成分を混合できるデュアルチャンバーのシリンジを指す。

【 0 0 3 8 】

「薬学的に許容される」という用語は本明細書においては、調和の取れた医学上の判断の範囲内において、過剰な毒性、刺激、アレルギー応答または他の問題または合併症を伴うことなく人間および動物の組織に接触させて使用することに適しており、合理的な利益 / 危険性の比率に相応した化合物、物質、組成物および / または剤型を指す。

30

【 0 0 3 9 】

「薬学的に受容可能なキャリア」という用語は本明細書においては、身体の一部の臓器または区分から身体の一部の別の臓器または区分に対象となる化合物を運搬または輸送する時に関与する液体または固体の充填剤、希釈剤、賦形剤または溶媒カプセル化剤のような薬学的に許容される物質、組成物またはベヒクルを意味する。担体は製剤の他の成分と適合し、患者に対して傷害性を有さないという意味で「許容できる」ものでなければならない。薬学的に受容可能なキャリアとして機能できる物質の一部の例は、(1) 糖類、例えば乳糖、グルコースおよびスクロース；(2) 澱粉類、例えばコーンスターチおよびパレイシヨ澱粉；(3) セルロースおよびその誘導体、例えばカルボキシメチルセルロース、エチルセルロースおよびセルロースアセテート；(4) 粉末トラガカント；(5) 麦芽；(6) ゼラチン；(7) タルク；(8) 賦形剤、例えばカカオ脂および坐剤用ワックス；(9) 油、例えばピーナツ油、綿実油、サフラワー油、ゴマ油、オリーブ油、コーン油および大豆油；(1 0) グリコール類、例えばプロピレングリコール；(1 1) ポリオール類、例えばグリセリン、ソルビトール、マンニトールおよびポリエチレングリコール；(1 2) エステル、例えばエチルオレートおよびエチルラウレート；(1 3) 寒天；(1 4) 緩衝剤、例えば水酸化マグネシウムおよび水酸化アルミニウム (1 5) アルギン酸；(1

40

50

6) 発熱物質非含有水；(17) 等張性食塩水；(18) リンゲル液；(19) エチルアルコール；(20) pH緩衝溶液；(21) ポリエステル、ポリカーボネートおよび/またはポリ無水物；および(22) 医薬品製剤で使用される他の非毒性の適合性物質を包含する。

【0040】

「薬学的に許容される塩」という用語は化合物の相対的に非毒性の無機および有機の酸付加塩を指す。

【0041】

「Fvフラグメント」という用語は自身の重鎖および軽鎖の変域ドメインを含む抗体のフラグメントを指す。Fcフラグメントという用語は自身の重鎖の定常ドメインを含む抗体のフラグメントを指す。

【0042】

「単一鎖可変フラグメントまたはscFv」という用語は重鎖ドメインおよび軽鎖ドメインが連結したFvフラグメントを指す。scFvフラグメントの1つ以上が他の抗体フラグメント(例えば重鎖または軽鎖の定常ドメイン)に連結して抗原認識部位1つ以上を有する抗体構築物を形成してよい。

【0043】

「腫瘍の超相加作用的抑制」という用語は個々の薬剤の各々に起因する薬剤の組み合わせの作用の合計よりも大きい腫瘍容量の総減少を指す。1つの実施形態においては、超相加作用的抑制は、LT-RアゴニストとLT-Rアゴニストではない化学療法剤の組み合わせの投与により得られる平均腫瘍抑制が、LT-Rアゴニストまたは化学療法剤の何れか単独の個別投与により得られる腫瘍抑制の合計より統計学的に有意に高値である場合を包含する。LT-Rアゴニストと化学療法剤の複合投与により得られる腫瘍抑制が個々の化合物の予測される相加値より「統計学的に高値である」かどうかは、本発明の詳細な説明に記載する種々の統計学的方法で決定してよい。

【0044】

「相乗作用的」という用語は何れかの2つ以上の単一の薬剤の相加的作用よりも更に有効である組み合わせを指す。本発明の1つの実施形態においては、相乗作用的という用語はLT-Rアゴニストと化学療法剤の両方が個々に腫瘍容量を抑制する能力を有している超相加作用的抑制の組み合わせの型を包含する。「強化」という用語は薬剤の独立した作用の合計よりも2つ以上の薬剤の同時作用が高値となる場合を指す。特定の実施形態においては、強化とはLT-Rアゴニストまたは化学療法剤の僅か一方が腫瘍容量を抑制する能力を有する超相加作用的抑制の型を指す。

【0045】

対象における癌を「治療すること」または癌を有する対象を「治療すること」とは癌の程度が低減するか抑制されるように例えば薬剤の投与のような薬学的処置に対象を付すことを指す。治療には例えば、医薬組成物のような組成物の投与が包含され、そして、病理学的事象の開始より予防的に、またはその後実施してよい。

【0046】

「腫瘍容量」という用語は腫瘍自身プラス適宜罹患リンパ節を含む腫瘍の総サイズを指す。腫瘍容量は当該分野で知られている種々の方法により、例えばカリパス、コンピュータ断層撮影(CT)または磁気共鳴撮影(MRI)走査を用いた腫瘍の寸法の測定および例えばz軸直径に基づく、または球状、楕円または立方体のような標準的形状に基づく等式を用いた計算により測定してよい。

【0047】

(2. 多価LT-Rアゴニスト抗体構築物およびその製造方法)

1つの実施形態において、本発明の多価抗体構築物はリンホトキシン-ベータ受容体のアゴニストであり、そして、受容体に結合してLT-Rシグナリングを誘導するドメイン少なくとも2つを含む。これらの構築物は、LT-ベータ受容体に結合するための特異的な抗原認識部位を含む可変領域2つ以上を含有する重鎖および可変領域1つ以上を

10

20

30

40

50

有する軽鎖を含むことができるか、または、L T - ベータ受容体に結合するための特異的なC D Rを含む可変領域2つ以上を含有する軽鎖または重鎖のみを含むように構築することができる。

【0048】

1つの特徴において、本発明はヒトリンホトキシン - ベータ受容体 (L T - - R) アゴニストである多価抗体構築物を提供する。1つの実施形態においては、多価抗体構築物はL T - - R エピトープに特異的な抗原認識部位少なくとも1つを含む。特定の実施形態においては、抗原認識部位の少なくとも1つはs c F vドメイン内に位置し、別の実施形態においては全ての抗原認識部位がs c F vドメイン内に位置する。

【0049】

抗体構築物は2価、3価、4価または5価であってよい。特定の実施形態においては、抗体構築物は単一特異性である。1つの実施形態においては、抗体構築物はC B E 1 1 が結合するエピトープに特異的である。別の実施形態においては、本発明の抗体はC B E 1 1 抗原認識部位4つを含む単一特異性の4価のL T - - R アゴニスト抗体である。別の実施形態においては、抗体構築物はB H A 1 0 エピトープに対して特異的であり、ある実施形態においては4価である。これ等の実施形態のいずれにおいても、少なくとも1つの抗原認識部位はs c F v上に位置してよく、そしてこれ等の実施形態の特定のものにおいては、全ての抗原認識部位がs c F vドメイン上に位置してよい。抗体は多重特異的であってよく、その場合本発明の抗体はヒトL T - 受容体の種々異なるエピトープに結合する。

【0050】

特定の実施形態においては、抗体構築物は二重特異性である。他の実施形態においては抗体構築物は以下の抗体、即ち：B K A 1 1、C D H 1 0、B C G 6、A G H 1、B D A 8、C B E 1 1 およびB H A 1 0 のうちの1つが結合するエピトープよりなるリンホトキシン - ベータ受容体 (L T - - R) エピトープの群のメンバー少なくとも2つに対して特異的である。1つの実施形態においては、抗体構築物はC B E 1 1 およびB H A 1 0 抗体が結合するエピトープに対して特異的であり、そして特定の実施形態においては、4価である。1つの実施形態においては、抗体構築物はC B E 1 1 特異的抗原認識部位2つおよびB H A 1 0 特異的抗原認識部位2つを有し、その場合、抗体は2重特異性4価L T - - R アゴニスト抗体である。多重特異性抗体構築物のいずれかにおいて、抗原認識部位少なくとも1つはs c F vドメイン上に位置してよく、そして特定の実施形態においては、全ての抗原認識部位がs c F vドメイン上に位置する。

【0051】

更に別の実施形態においては、本発明の抗体構築物は以下のポリヌクレオチド配列およびコードされたポリペプチド配列を含む。

10

20

30

【表 A】

配列	図	説明
配列番号 1	1A	huCBE11/huBHA10二重特異性 1 抗体構築物の成熟重鎖のポリヌクレオチド配列
配列番号 2	1B	huCBE11/huBHA10二重特異性 1 抗体構築物の成熟重鎖のポリペプチド配列
配列番号 3	2	huCBE11/huBHA10二重特異性 1 抗体構築物の成熟軽鎖のポリヌクレオチド配列
配列番号 4	2	huCBE11/huBHA10二重特異性 1 抗体構築物の成熟軽鎖のポリペプチド配列
配列番号 5	3A	成熟huCBE11/huBHA10二重特異性 2 抗体構築物のポリヌクレオチド配列
配列番号 6	3B	成熟huCBE11/huBHA10二重特異性 2 抗体構築物のポリペプチド配列
配列番号 7	4A	huCBE11単一特異性 1 抗体構築物の成熟重鎖のポリヌクレオチド配列
配列番号 8	4B	huCBE11単一特異性 1 抗体構築物の成熟重鎖のポリペプチド配列
配列番号 9	5A	成熟huCBE11単一特異性 2 抗体構築物のポリヌクレオチド配列
配列番号 10	5B	成熟huCBE11単一特異性 2 抗体構築物のポリペプチド配列
配列番号 17	11A	成熟CBE11五量体重鎖抗体構築物のポリヌクレオチド配列
配列番号 18	11A	成熟CBE11五量体重鎖抗体構築物のポリペプチド配列
配列番号 19	11B	成熟CBE11キメラ軽鎖抗体構築物のポリヌクレオチド配列
配列番号 20	11B	成熟CBE11キメラ軽鎖抗体構築物のポリペプチド配列

10

20

30

【0052】

実施例 1 ~ 9 は上記の表において列挙した二重特異性、単一特異性および 5 量体の L T - R アゴニスト抗体構築物を得るための詳細な説明を与える。これ等の構築物の特定のものの模式図は図 6 A および 6 B に示す通りである。しかしながら本発明の他の L T - R アゴニスト抗体構築物を以下に概説するとおり当該分野で知られた方法を用いて構築しても良い。このような構築物の数例を図 7 に示す。

40

【0053】

抗原認識部位または全体の可変領域は親抗体 1 つ以上から誘導してよい。親抗体は天然の抗体または抗体フラグメント、天然の抗体から適合された抗体または抗体フラグメント、L T - ベータ受容体に特異的であることがわかっている抗体または抗体フラグメントの配列を用いて新規に構築された抗体を包含する。親抗体から誘導してよい配列は重鎖および/または軽鎖の可変領域および/または C D R、フレームワーク領域またはその別の区

50

分を包含する。

【0054】

多価の多重特異性抗体は可変領域2つ以上を含む重鎖および/または可変領域1つ以上を含む軽鎖を含有してよく、ここで可変領域の少なくとも2つはLT-ベータ受容体の異なるエピトープを認識する。

【0055】

多価の抗LT-R抗体はネズミまたはヒト化BHA10 (Browning ら, J. Immunol. 154:33 (1995); Browning ら, J. Exp. Med. 183:867 (1996)) および/またはネズミまたはヒト化CBE11 (米国特許6,312,691号)を包含する親抗LT-R抗体から誘導される種々の配列を用いて種々の方法で構築してよい。

【0056】

モノクローナル抗LT-R抗体を生産する以下のハイブリドーマ細胞系統を用いて抗LT-R抗体を生産してよく、それより抗体構築物配列が誘導され、そしてこれ等は既にブタペスト条約に基づいてAmerican Type Culture Collection (ATCC)に寄託されており、そして以下のATCC受託番号で登録されている。

【表B】

細胞株	mAb名称	受託番号
a) AG.H1.5.1	AGH1	HB 11796
b) BD.A8.AB9	BDA8	HB 11798
c) BC.G6.AF5	BCG6	B 11794
d) BH.A10	BHA10	B 11795
e) BK.A11.AC10	BKA11	B 11799
f) CB.E11.1	CBE11	B 11793
g) CD.H10.1	CDH10	B 11797

【0057】

しかしながら種々の他の多価抗体構築物が当業者により日常的な組み換えDNA技術、例えば、PCT国際特許出願PCT/US86/02269; 欧州特許出願184,187; 欧州特許出願171,496; 欧州特許出願173,494; PCT国際特許出願WO86/01533; 米国特許4,816,567; 欧州特許出願125,023; Better ら. (1988) Science 240:1041-1043; Liu ら. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443; Liu ら. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526; Sun ら. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:214-218; Nishimura ら. (1987) Cancer Res. 47:999-1005; Wood ら. (1985) Nature 314:446-449; Shaw ら. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559; Morrison (1985) Science 229:1202-1207; Oi ら. (1986) BioTechniques 4:214; 米国特許5,225,539; Jones ら. (1986) Nature 321:552-525; Verhoyan ら. (1988) Science 239:1534; Beidler ら. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060; および Winter and Milstein, Nature, 349, pp. 293-99 (1991)) に記載のものを用いて開発できる。好ましくは非ヒト抗体はヒト定常ドメインに非ヒト抗

原結合ドメインを連結することにより「ヒト化」される(例えばCabilly等、米国特許4,816,567;Morrisonら.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81,pp.6851-55(1984)参照)。

【0058】

対象となる抗LT-R抗体構築物を作成するために使用してよい別の方法は以下の文献、即ち:Ghetie,Maria-Anaら.(2001)Blood 97:1392-1398;Wolff,Edith A.ら.(1993)Cancer Research 53:2560-2565;Ghetie,Maria-Anaら.(1997)Proc.Natl.Acad.Sci.94:7509-7514;Kim,J.C.ら.(2002)Int.J.Cancer 97(4):542-547;Todorovska,Anetaら.(2001)Journal of Immunological Methods 248:47-66;Coloma M.J.ら.(1997)Nature Biotechnology 15:159-164;Zuo,Zhuangら.(2000)Protein Engineering (Suppl.) 13(5):361-367;Santos A.D.ら.(1999)Clinical Cancer Research 5:3118s-3123s;Presta,Leonard G.(2002)Current Pharmaceutical Biotechnology 3:237-256;van Spriell,Annemiekら.(2000)review Immunology Today 21(8)391-397に記載されている。

10

20

【0059】

候補となる抗体構築物は種々の知られた試験法を用いて活性のあるものをスクリーニングして良い。例えば結合特異性を調べるスクリーニング試験は当該分野でよく知られており、日常的に実施されている。このような試験法の包括的な説明はHarlowら.(Eds),ANTIBODIES:A LABORATORY MANUAL;Cold Spring Harbor Laboratory;Cold Spring Harbor,N.Y.,1988,Chapter 6を参照できる。後述する実施例は候補LT-Rアゴニスト抗体構築物によるLT-R活性化の薬効を測定するための試験法を与える。

【0060】

上記したとおり製造されたLT-Rアゴニスト抗体構築物は医薬組成物として使用するために適する純度まで精製してよい。一般的に、精製された組成物は組成物中に存在する全ての物質種の約85%超、存在する全物質種の約85%、90%、95%、99%以上となる1種を有する。目的の物質種は組成物が本質的に単一の物質種よりなる本質的な均質物(従来を検出方法では組成物中に夾雑物質種が検出できない)となるまで精製してよい。当業者の知るとおり、本発明のポリペプチドは蛋白精製のための標準的な方法、例えば免疫アフィニティークロマトグラフィー、サイズエクスクルージョンクロマトグラフィー等により、本明細書の記載を参考にしながら精製できる。ポリペプチドの純度は当該分野で知られた多くの方法、例えばアミノ末端アミノ酸配列分析、ゲル電気泳動質量スペクトル分析により測定してよい。

30

40

【0061】

一部の実施形態においては、本発明の多価抗体および抗体フラグメントを化学修飾して所望の作用を得てよい。例えば本発明の抗体および抗体フラグメントのペギル化は、例えば以下の参考文献、即ち、Focus on Growth Factors 3:4-10(1992);Epp154316;EP0401384(各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)に記載されるとおり、当該分野で知られたいずれかのペギル化方法により行ってよい。好ましくは、ペギル化は反応性のポリエチレングリコール分子(または類似の反応性の水溶性重合体)を用いながら、アシル化反応またはアルキル化反応を介して行う。本発明の抗体および抗体フラグメントのペギル化のための好ましい水溶性重合体はポリエチレングリコール(PEG)である。本明細書においては、「ポリエ

50

チレングリコール」とはモノ(C1-C10)アルコキシ-またはアリーロキシ-ポリエチレングリコールのような他の蛋白を誘導するために使用されているPEGの形態の何れも包含する。

【0062】

本発明のペギル化抗体および抗体フラグメントの製造方法は一般的には、(a)抗体または抗体フラグメントがPEG基1つ以上と結合するような条件下でPEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体のようなポリエチレングリコールに抗体または抗体フラグメントを反応させること、および、(b)反応産物を得ること、の工程を包含する。当業者は知られたパラメーターおよび所望の結果に基づいて、旨適な反応条件またはアシル化反応を選択する。

10

【0063】

ペギル化抗体および抗体フラグメントは一般的に本明細書に記載する抗体および抗体フラグメントを投与することにより緩解または変調される状態を治療するために使用してよい。一般的に、ペギル化抗体および抗体フラグメントは非ペギル化抗体および抗体フラグメントと比較して延長された半減期を有する。ペギル化抗体および抗体フラグメントは単独で、共に、または、他の医薬組成物と組み合わせて使用してよい。

【0064】

本発明の他の実施形態においては、抗体またはその抗原結合フラグメントは当該分野で知られた手法を用いてアルブミンにコンジュゲートする。

【0065】

本発明の別の実施形態においては、多価抗体またはそのフラグメントを修飾することにより潜在的なグリコシル部位を低減または除去する。このような修飾された抗体はしばしば、「グリコシル化抗体」と称される。抗体またはその抗原結合フラグメントの結合親和性を向上させるために、抗体のグリコシル化部位を例えば突然変異誘発(例えば部位指向性突然変異誘発)により改変することができる。「グリコシル化部位」は糖残基の結合のための位置として真核細胞により認識されるアミノ酸残基を指す。オリゴ糖のような炭水化物が結合しているアミノ酸は典型的にはアスパラギン(N-連結)、セリン(O-連結)およびスレオニン(O-連結)残基である。抗体または抗原結合フラグメント内の潜在的なグリコシル化部位を発見するためには、例えばCenter for Biological Sequence Analysisにより与えられるウェブサイトのような公開されたデータベースを用いることにより抗体の配列を調べる(N連結グリコシル化の予測のためには<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>およびO連結グリコシル化部位の予測のためには<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNOGlyc/>参照)。抗体のグリコシル化部位の改変のための別の方法は米国特許6,350,861および5,714,350に記載されている。

20

30

【0066】

本発明の更に別の実施形態においては、未修飾の抗体と比較して少なくとも1つの定常領域媒介の生物学的エフェクター機能が低減されるように抗体の定常領域が修飾されるように、多価抗体またはそのフラグメントを改変する。Fc受容体(FcR)への結合が低減されるように本発明の抗体を修飾するためには、抗体の免疫グロブリン定常領域セグメントをFcR相互作用のために必要な特定の領域において突然変異させることができる(例えばCanfieldら.(1991)J.Exp.Med.173:1483;およびLund,J.ら.(1991)J.of Immunol.147:2657参照)。抗体のFcR結合能力の低下はまた、FcR相互作用に依存している別のエフェクター機能、例えばオプソニン作用および貪食作用および抗原依存性細胞毒性も低減する場合がある。

40

【0067】

本発明の特定の実施形態においては、本発明は更に例えばエフェクター細胞上の補体または受容体のようなエフェクター分子に結合する能力のような改変されたエフェクター機

50

能を有する多価抗体を特徴とする。特に、本発明のヒト化抗体は改変された定常領域、例えばFc領域を有し、ここでは、Fc領域中のアミノ酸残基少なくとも1つが異なる残基または側鎖により置き換えられることにより、FcRに結合する抗体の能力を低減する。抗体のFcR結合能力の低下はまた、FcR相互作用に依存している別のエフェクター機能、例えばオプソニン作用および貪食作用および抗原依存性細胞毒性も低減する場合がある。1つの実施形態においては、修飾されたヒト化抗体はIgGクラスのものであり、例えば未修飾のヒト化抗体と比較して改変されたエフェクター機能をヒト化抗体が有するようにFc領域におけるアミノ酸残基置換少なくとも1つを含む。特定の実施形態においては、本発明のヒト化抗体は免疫原性がより低くなるような（例えば望ましくないエフェクター細胞活性、溶解または補体結合を誘発しないような）および/またはLT-Rに対する特異性を保持しつつより望ましい半減期を有するような改変されたエフェクター機能を有している。

10

【0068】

或は、本発明はFcR結合、例えばFcR3結合を増強するように改変された定常領域を有する多価ヒト化抗体を特徴とする。このような抗体は例えば特に本発明の癌分野での使用のためにADCC活性を増強するべくエフェクター細胞機能をモジュレートするために有用である。

【0069】

本明細書においては、「抗体依存性細胞媒介細胞毒性」および「ADCC」とは、FcRを発現する非特異性細胞毒性細胞（例えばナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージ）が標的細胞上の結合抗体を認識し、その後標的細胞の溶解を誘発するような細胞媒介反応を指す。ADCCを媒介する第1の細胞、即ちNK細胞はFcRIIのみを発現するのに対し、単球は抗体、例えば抗体と他の薬剤または抗体のコンジュゲートのFcRI、FcRIIおよびFcRIIIを発現する。

20

【0070】

更に別の実施形態においては、本発明の多価抗LT-R抗体は超相加作用的態様において腫瘍容量を抑制するように化学療法剤にコンジュゲートすることができる。本発明の抗体にコンジュゲートできる化学療法剤の例は、放射線コンジュゲート（90Y、131I、99mTc、111In、186Rh等）、腫瘍活性化プロドラッグ（マイタンシノイド、CC-1065類縁体、クリケアミシン誘導体、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド等）、リシン、ジフテリア毒素、シュードモナス外毒素を包含する。

30

【0071】

（3．多価LT-Rアゴニスト抗体構築物の使用を含む複合治療）

本発明は更に癌の治療および/または腫瘍生育の抑制のための化学療法剤と組み合わせた多価LT-Rアゴニスト抗体の使用を提供する。同様に種々の化学療法剤の何れかを、本発明の方法において使用、または使用のために試験してよいが、ただし、アゴニストと薬剤の組み合わせはアゴニストおよび薬剤の単独の作用の単純和により期待されるものよりも大きい腫瘍抑制を達成しなければならない。このような化学療法剤は抗代謝剤、アルキル化剤、白金系薬剤、アントラサイクリン、抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤および他のものを包含してよい。種々の形態の化学療法剤および/または他の生物活性剤を使用してよい。これ等には例えば非荷電性分子、分子複合体、塩、エーテル、エステル、アミド等が包含され、これ等は移植、注射または何らかの他の方法で腫瘍内に挿入されれば生物学的に活性化されるものである。

40

【0072】

本発明の多価抗体と組み合わせて使用できる化学療法剤はそれらが癌細胞内の特定の化学物質にどのように影響するか、どの細胞活性または過程を薬剤が干渉するか、および、細胞周期のどの特定の段階に薬剤が影響するかにより数種類に分類できる。

【0073】

特定の実施形態においては、化学療法剤はDNAの合成を途絶させる薬剤である。1つの実施形態においては、DNAの合成を途絶させる薬剤はヌクレオシド類縁体化合物であ

50

る。特定の実施形態において、ヌクレオシド類縁体化合物はゲムシタピンである。特定の実施形態においては、DNA合成を途絶させる薬剤はアントラサイクリン化合物であり、そして特定の実施形態においては、アントラサイクリン化合物はアドリアマイシンである。

【0074】

別の実施形態においては、化学療法剤はトポイソメラーゼI阻害剤である。特定の実施形態においては、トポイソメラーゼI阻害剤はカンプトサルである。

【0075】

他の実施形態における化学療法剤はアルキル化剤である。アルキル化剤は直接DNAに作用し、癌細胞の繁殖を防止する。薬剤のクラスとして、これ等の薬剤は期特異的ではない（換言すれば、細胞周期の全期において作用する）。アルキル化剤は慢性の白血病、非ホジキンリンパ腫、ホジキン病、多発性骨髄腫および肺、乳房および卵巣の特定の癌に対して共通して活性である。アルキル化剤の例には、ブスルファム、シスプラチン、カルボプラチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、イフォスファミド、ダカルバジン（DTIC）、メクロレタミン（窒素マスタード）およびメルファランを包含する。1つの実施形態において、アルキル化剤は白金化合物であり、そして特定の実施形態においては、カルボプラチンおよびシスプラチンよりなる群から選択される。特定の実施形態においては、白金化合物はシスプラチンである。

10

【0076】

更に別の実施形態においては、化学療法剤は植物アルカロイドである。1つの実施形態においては、植物アルカロイドはタキサンであり、そして特定の実施形態においては、タキソールである。

20

【0077】

本発明の多価抗体は癌を治療するための化学療法剤と組み合わせて使用することができ、その場合、化学療法剤および多価抗体の組み合わせは超相加作用を有する。本明細書においては、「腫瘍の超相加作用的抑制」とは、LT - Rアゴニストと化学療法剤の組み合わせの投与により得られる平均腫瘍抑制が、LT - Rアゴニストまたは化学療法剤の何れか単独の個別投与により得られる腫瘍抑制の合計より統計学的に有意に高値である場合を包含する。LT - Rアゴニストと化学療法剤の複合投与により得られる腫瘍抑制が個々の化合物の予測される相加値より「統計学的に高値である」かどうかは、以下に記載する通り決定してよい。このような超相加作用的抑制は前述において定義したとおり強化されているか、または相乗作用となっていて良い。

30

【0078】

一般的に、超相加作用的抑制は個々の治療によりその投与群においてそれぞれもたらされる平均腫瘍容量の減少の合計と比較した場合に、統計学的に有意な超相加作用的である平均腫瘍容量の減少を複合投与が投与群においてもたらすかどうかを調べることにより評価してよい。平均腫瘍容量の減少は対照群と投与群の平均腫瘍容量の間の差として計算してよい。腫瘍容量の区分的抑制、「区分的影響」（Fa）は対照群平均腫瘍容で投与群平均腫瘍容量の減少を割ることにより計算してよい。1.000のFaは腫瘍の完全な抑制を示す。統計学的に有意な強化について試験することは各投与群に関するFaの計算を必要とする。複合投与に関する期待される相加作用的Faは、組み合わせの何れかの要素を投与された群の平均のFaの合計として捉えている。例えば両側1標本t検定を用いて実験により得られた結果がどの程度偶然のみに起因するものであるかをp値を尺度として評価してよい。0.05未満のp値は、例えば約0.05～約0.04；約0.04～約0.03；約0.03～約0.02；約0.02～約0.01を含めて、統計学的に有意とみなされ、即ち、偶然のみによるとは考えにくい。特定の場合においては、p値は0.01未満であってよい。即ち、複合投与群のFaは複合体が強化された超相加作用的効果をもたらすものとみなすためには単一要素の投与群について期待される相加Faよりも統計学的に有意に高値で無ければならない。

40

【0079】

50

相乗作用が複合投与に起因するものであるか否かは、中央値 - 作用 / 複合指数のイソボログラム法により評価してよい (Chou ら, (1984) *Ad. Enzyme Reg.* 22:27)。この方法においては、複合指数 (CI) 値は LT - R アゴニスト単独、化学療法剤単独および決められたモル比における 2 者の複合体の中央値 - 作用プロットから誘導したパラメーターに基づいて異なる用量 - 作用水準について計算する。CI 値 < 1、例えば約 0.85 ~ 約 0.95 ; 約 0.70 ~ 約 0.85 ; 約 0.30 ~ 約 0.70 ; 約 0.10 ~ 約 0.30 は相乗作用を示す。更に別の実施形態においては、複合指数は 0.10 未満である。この分析は好ましくは、用量作用分析 (BioSoft, Cambridge, UK) に関わる Calcusyn, Windows (登録商標) Software を用いて実施する。

10

【0080】

超相加作用的効果が複合療法について存在しているか否かを分析するための当該分野において知られた、または後に開発される何れかの方法が適当な化学療法剤のスクリーニングにおける使用を意図される。

【0081】

腫瘍の超相加作用的抑制が起こるか否かを決定するための化学療法剤と組み合わせる候補 LT - R アゴニストの試験方法は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる本出願と同日に出願された「癌の新しい複合療法」と題された出願人等の同時係争中の PCT 出願および 2002 年 12 月 20 日に出願された 60/435185 に記載されている。

20

【0082】**(4. 医薬組成物)**

本発明は上記した LT - R アゴニスト抗体構築物を含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態においては、医薬組成物は更に化学療法剤を含んでよい。1つの特徴において、本発明は薬学的に受容可能なキャリア (添加剤) および / または希釈剤 1つ以上と共に製剤された上記化合物 1つ以上の治療有効量を含む薬学的に許容される組成物を提供する。別の特徴において、特定の実施形態である本発明の化合物はそのまま、または薬学的に受容可能なキャリアとの混合物として投与してよく、また、他の化学療法剤と併用して投与してよい。即ち、併用 (複合) 療法は最初に投与したものの治療効果が後のものを投与した時点で完全に消失していないような方法における活性化合物の逐次的、同時および個別、または共投与を包含する。

30

【0083】

選択される投与経路に関わらず、適当に水和された形態で使用してよい本発明の化合物、および / または、本発明の医薬組成物は、当該分野で知られている薬学的に許容される剤型に製剤する。本発明の化合物は単独で投与することも可能であるが、化合物を医薬品製剤 (組成物) として投与することが好ましい。本発明の化合物は他の医薬品と同様、ヒトまたは獣医科における使用のための何れかの好都合な方法において投与するために製剤してよい。

【0084】

後に詳述するとおり、本発明の医薬組成物は特に固体または液体形態において投与するために製剤してよく、例えば以下のもの、即ち (1) 経口投与、例えばドレンチ剤 (水性、または非水性の溶液または懸濁液)、錠剤、例えば口腔内、舌下用、および全身吸収、塊状、粉末、顆粒、舌上適用ペースト; (2) 非経腸投与、例えば皮下、筋肉内、静脈内または硬膜外注射、例えば滅菌溶液または懸濁液、または除放射性製剤; (3) 局所適用、例えばクリーム、軟膏または制御放出パッチまたは皮膚用スプレー; (4) 腔内または直腸内、例えばペサリー剤、クリームまたはフォーム剤; (5) 舌下; (6) 眼内; (7) 経皮; または (8) 鼻内投与に適合させたものである。1つの実施形態においては、医薬組成物は非経腸投与のために製剤される。1つの実施形態においては、医薬組成物は動脈内注射用に製剤される。別の実施形態においては、医薬組成物は全身投与のために製剤される。

40

50

【0085】

他の場合において、本発明の化合物は酸性官能基1つ以上を含んでよく、従って、薬学的に許容される塩基と薬学的に許容される塩を形成することができる。

【0086】

水和剤、乳化剤および潤滑剤、例えばラウリル硫酸ナトリウムおよびステアリン酸マグネシウム、並びに、着色料、離型剤、コーティング剤、甘味料、フレーバー剤および芳香剤、保存料および抗酸化剤もまた組成物中に存在してよい。

【0087】

本発明の製剤は経口、経鼻、局所（口腔内および舌下を含む）、直腸、腔内および/または非経腸の投与に適するもの包含する。製剤は好都合には単位剤型で提供してよく、そして、薬品分野でよく知られた何れかの方法により製造してよい。単回剤型を製造するために担体材料と組み合わせてよい活性成分の量は治療すべき宿主、投与の特定の様式に応じて変動する。単回剤型を製造するために担体材料と組み合わせてよい活性成分の量は一般的には治療効果をもたらす化合物の量である。

【0088】

本発明の化合物の経口投与用の液体剤型は薬学的に許容される乳液、マイクロエマルジョン、溶液、懸濁液、シロップおよびエリキシルを包含する。活性成分の他に液体剤型は当該分野で一般的に使用されている不活性の希釈剤、例えば水および他の溶媒、可溶化剤および乳化剤、例えばエチルアルコール、イソプロピルアルコール、エチルカーボネート、酢酸エチル、ベンジルアルコール、ベンジルベンゾエート、プロピレングリコール、1,3-ブチレングリコール、油脂類（特に綿実油、ピーナツ油、コーン油、胚芽油、オリーブ油、ひまし油およびゴマ油）、グリセロール、テトラヒドロフリルアルコール、ポリエチレングリコールおよびソルビタンの脂肪酸エステルおよびこれ等の混合物を含有してよい。不活性希釈剤の他に経口用組成物はまた補助剤、例えば湿潤剤、乳化剤および懸濁剤、甘味料、フレーバー剤、着色料、芳香剤および保存料を含有してよい。懸濁液は活性化合物のほかに、懸濁剤、例えばエトキシ化イソステアリルアルコール、ポリオキシエチレンソルビトールおよびソルビタンエステル、微結晶セルロース、メタ水酸化アルミニウム、ベントナイト、寒天およびトラガカントおよびこれ等の混合物を含有してよい。

【0089】

経口投与に適する本発明の製剤はカプセル、カシェ剤、丸薬、錠剤、ロゼンジ（通常はスクロースおよびアカシアまたはトラガカントであるフレーバー添加基材を用いる）、粉末、顆粒または水性または非水性の液体中の溶液または懸濁液、または水中油型または油中水型の液体乳液、またはエリキシルまたはシロップ、またはパステル（ゼラチンおよびグリセリンまたはスクロースおよびアカシアのような不活性基材をも散る）および/またはマウスウォッシュ等の形態であってよく、これ等の各々は活性成分として本発明の化合物の所定の量を含有する。本発明の化合物は塊状、舐め薬またはペーストとして投与してもよい。

【0090】

経口投与のための本発明の固体剤型（カプセル、錠剤、丸薬、ドラジェ剤、粉末、顆粒等）においては、活性成分を薬学的に受容可能なキャリア1種以上、例えばクエン酸ナトリウムまたはリン酸2カルシウム、および/または以下の何れか、即ち、（1）充填剤または膨張剤、例えば澱粉、乳糖、スクロース、グルコース、マンニトールおよび/またはケイ酸；（2）バインダー、例えばカルボキシメチルセルロース、アルギネート、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロースおよび/またはアカシア；（3）湿潤剤、例えばグリセロール；（4）錠剤崩壊剤、例えば寒天、炭酸カルシウム、バレイショまたはタピオカ澱粉、アルギン酸、特定のケイ酸塩および炭酸ナトリウム；（5）溶解遅延剤、例えばパラフィン；（6）吸収加速剤、例えば第4アンモニウム化合物；（7）水和剤、例えばセチルアルコール、グリセロールモノステアレートおよび非イオン性の界面活性剤；（8）吸着剤、例えばカオリンおよびベントナイト粘土；（9）潤滑剤、例えばタルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体のポリエチレングリコール、ラ

10

20

30

40

50

ウリル硫酸ナトリウムおよびこれ等の混合物；および（10）着色剤と混合する。カプセル、錠剤および丸薬の場合においては、医薬組成物はまた緩衝剤を含んでよい。同様の型の固体組成物は、乳糖またはミルクシュガー並びに高分子量ポリエチレングリコール等のような賦形剤を用いたソフトおよびハードセルのゼラチンカプセル中の充填剤としても使用してよい。

【0091】

錠剤は場合により補助的成分1種以上と共に圧縮または成型することにより作成してよい。圧縮錠剤はバインダー（例えばゼラチンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース）、潤滑剤、不活性希釈剤、保存料、錠剤崩壊剤（例えばナトリウム澱粉グリコレートまたは交差結合カルボキシメチルセルロースナトリウム）、界面活性剤または分散剤を用いて製造してよい。成型錠剤は不活性の液体希釈剤で湿潤化された粉末化合物の混合物を適当な機械で成型することにより作成してよい。本発明の医薬組成物の錠剤および他の固体剤型、例えばドラジェ剤、カプセル、丸薬および顆粒は場合によりコーティングおよびシエル材、例えば腸溶性コーティングおよび医薬品製剤分野でよく知られた他のコーティングを用いて打刻または調製してよい。また例えば所望の放出特性を与える種々の比率のヒドロキシプロピルメチルセルロース、他の重合体マトリックス、リポソームおよび/または微小球を用いて内包する活性成分の緩徐なまたは制御された放出を与えるように製剤しても良い。また急速放出用に製剤、例えば凍結乾燥してもよい。これ等は例えば細菌保持フィルターを通した濾過により、または、滅菌水または他の滅菌注射用媒体に使用直前に溶解する滅菌固体組成物の形態に滅菌剤を配合することにより滅菌しても良い。これ等の組成物はまた場合により不透明化剤を含有してよく、そして、胃腸管の特定の区域において、場合により遅延した態様で、活性成分のみ、またはこれを優先的に放出する組成物であってよい。使用してよい包埋組成物の例は重合体物質およびワックスである。活性成分はまた適宜上記した賦形剤1種以上を用いてマイクロカプセルの形態としてもよい。

10

20

【0092】

本発明の化合物の局所または経皮投与のための剤型は、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチおよび吸入剤を包含する。活性化合物を滅菌条件下に薬学的に受容可能なキャリアと、そして何れかの保存料、緩衝剤、高圧ガス共に適宜、混合してよい。軟膏、ペースト、クリームおよびゲルは本発明の活性化合物のほかに、賦形剤、例えば動物および植物性の脂肪、油脂、ワックス、パラフィン、澱粉、トラガカント、セルロース誘導体、ポリエチレングリコール、シリコーン、ベントナイト、ケイ酸、タルクおよび酸化亜鉛またはこれ等の混合物を含有してよい。粉末およびスプレーは本発明の化合物の他に、賦形剤、例えば乳糖、タルク、ケイ酸、水酸化アルミニウム、ケイ酸カルシウムおよびポリアミドの粉末またはこれ等の物質の混合物を含有することができる。スプレーは更に、慣用的な高圧ガス、例えばクロロフルオロ炭化水素および揮発性未置換炭化水素、例えばブタンおよびプロパンを含有できる。

30

【0093】

非経腸投与に適する本発明の医薬組成物は薬学的に許容される滅菌等張性の水性または非水性の溶液、分散液、懸濁液または乳液、または、使用直前に滅菌注射用溶液または分散液中に希釈再調製する滅菌粉末1種以上と組み合わせて本発明の化合物1つ以上を含有し、これは、糖類、アルコール、抗酸化剤、緩衝剤、殺菌剤、製剤を意図するレシピエントの血液と等張とするための溶質または懸濁または濃厚化剤を含有してよい。これ等の組成物はまた補助物質、例えば保存料、水和剤、乳化剤および分散剤も含有してよい。対象となる化合物に対する微生物の作用の防止は種々の抗細菌剤および抗カビ剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等を含有させることにより確保する。等張性付与剤、例えば糖類、塩化ナトリウム等を組成物に配合することも望ましい。更にまた、注射用医薬品形態の延長された吸収は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅延させる薬剤の配合により行ってよい。

40

【0094】

一部の場合においては、薬剤の作用を延長させるために、皮下または筋肉内注射からの

50

薬剤の吸収を遅延させることが望ましい。これは水溶性の乏しい結晶性または不定形の物質の液体懸濁物を使用することにより達成してよい。次に薬剤の吸収速度は溶解の速度に依存しており、後者はまた結晶の大きさおよび結晶型に依存している。或は、非経腸投与薬剤形態の遅延された吸収は脂質ベヒクル中に薬剤を溶解または懸濁することにより達成される。

【0095】

注射用デポ形態ポリラクチド-ポリグリコリドのような生体分解性の重合体中に対象となる化合物のマイクロカプセルマトリックスを形成することにより作成する。薬剤の重合体に対する比および使用する特定の重合体の性質により、薬剤放出の速度は制御できる。他の生体適合性重合体の例はポリ(オルトエステル)およびポリ(無水物)を包含する。デポ型注射製剤はまた身体組織と適合性のあるリポソームまたはマイクロエマルジョン中に薬剤を捕獲させることにより調製される。

10

【0096】

(5. 送達方法および装置)

本発明の医薬組成物は医薬品送達装置の種々のものを用いて投与してよく、これには皮下シリンジ、マルチチャンバーシリンジ、ステント、カテーテル、経皮パッチ、マイクロニードル、マイクロアブレイダーおよび移植可能な制御放出装置が包含される。1つの実施形態においては、医薬品送達装置はLT-Rアゴニスト抗体構築物の少なくとも有効量を含むか、負荷することができる。このような装置は送達前に装置中で抗体構築物の凍結乾燥形態を希釈再調製する能力を有する。一部の実施形態においては、医薬品送達装置は少なくともLT-Rアゴニスト有効量および化学療法剤有効量を含有するか、これを負荷できる。装置は一部の実施形態においてはLT-Rアゴニスト抗体構築物および化学療法剤を同時に送達または投与することができる。装置は装置を用いた投与の前に抗体構築物および化学療法剤を混合する能力を有する。更に別の実施形態においては、装置はアゴニスト抗体構築物および化学療法剤を順次連続して投与することができる。

20

【0097】

1つの医薬品送達装置は注射前に2成分を混合すること、または、それらを逐次的に送達することが可能なマルチチャンバーシリンジである。典型的なデュアルチャンバーシリンジおよび予備充填されたこのようなシリンジの自動製造方法はNeue Verpackung, No. 3, 1988, p. 50-52; Drugs Made in Germany, Vol. 30, Pag. 136-140 (1987); Pharm. Ind. 46, Nr. 10 (1984) p. 1045-1048およびPharm. Ind. 46, Nr. 3 (1984) p. 317-318に記載されている。シリンジ型アンプルは針の連結のための前方ボトル型開口部、2個のピストンおよび前方チャンバー内の凍結乾燥粉末を後方チャンバー内の希釈再調製用液体と混合するための外部型バイパスを有するデュアルチャンバーである。記載された方法はシリンジ筒部の洗浄およびシリコン処理、複数の筒部のキャリアトレイへの挿入、滅菌、筒部後方末端を通過する中央ピストンの導入、トレイの上下反転、前方開口部を通過する粉末溶液の導入、凍結乾燥による乾燥粉末化、凍結乾燥チャンバー内継続時における前方開口部の閉鎖、トレイの反転、筒部後方末端を通過する希釈再調製液の導入、後方ピストンの挿入、トレイからの生成物の除去、および、最終的な制御およびパッケージングの主要工程を包含する。種々の成分で予備充填されたアンプルをシリンジと共に使用するために製造してよい。

30

40

【0098】

別の実施形態においてはマルチチャンバーシリンジはLyोजectシステム(Vetter PharmaTurm, Yardley, PA)である。Lyोजectを用いることにより、薬剤を凍結乾燥させながら直接シリンジ内に入れることができ、これを迅速希釈再調製および注射のための希釈剤とパッケージにする。これは特許4,874,381号および5,080,649号に記載されている。

【0099】

別の実施形態においては、化合物は2つの個別のシリンジ、カテーテル、マイクロニ

50

ドル、または注射を可能にする別の装置を用いて投与される。

【0100】

本発明の医薬組成物はまた微小球、リポソーム、他の微粒子送達システムまたは除放射性製剤を罹患組織近傍またはそれと関連させて設置するか、血流中に投入することにより投与しても良い。除放射性担体の適当な例は坐剤またはマイクロカプセルのような形状付与品の形態の半透過性重合体マトリックスを包含する。移植可能な、または、マイクロカプセルの除放射性マトリックスは、ポリラクチド（米国特許3,773,319; EP58,481）、L-グルタミン酸およびエチル-L-グルタメートの共重合体（Sidmanら, *Biopolymers*, 22, pp. 547-56 (1985)）; ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはエチレンビニルアセテート（Langerら, *Biomed. Mater. Res.*, 15, pp. 167-277 (1981)）; Langer, *Chem. Tech.*, 12, pp. 98-105 (1982)）を包含する。

10

【0101】

本発明の組成物は目的とする特定の臨床状態を治療するために有効な用量で投与される。所定の用途に対する好ましい医薬品製剤および治療上効果的な用量用法は例えば患者の状態および体重、所望の治療の程度、および、治療に対する患者の耐容性を考慮すれば、当業者のよく知るものである。

【0102】

経皮パッチは身体に対し本発明の化合物の制御された送達を行うという利点を更に有している。このような剤型は適切な媒体中に化合物を溶解または分散することにより作成できる。吸収促進剤もまた皮膚を経由する化合物の流入を増大させるために使用できる。このような流入の速度は、速度制御メンブレンを用いるか、または化合物を重合体のマトリックスまたはゲルに分散させることにより制御できる。

20

【0103】

(6. 治療方法)

実施例9に記載する通り、そして図9および10に示す通り、本発明の多価抗体構築物はインビボで腫瘍重量を有意に低減することにおいて有効である。

【0104】

従って、本発明は更に場合により前述した送達装置を用いて医薬組成物の有効量を対象に投与することを含む癌の新たな治療方法を提供する。本発明の方法は何れかの癌、例えば固形腫瘍を治療するために使用してよい。本発明の化合物で治療できる固形腫瘍の例えば乳房、精巣、肺、卵巣、子宮、子宮頸部、膵臓、非小細胞肺（NSCLC）、結腸並びに前立腺、胃、皮膚、腹部、食道および膀胱の癌である。特定の実施形態においては、方法は対象となる医薬組成物の有効量を対象に非経腸的に投与することを含む。1つの実施形態においては、方法は対象となる組成物を対象に動脈内投与することを包含する。1つの実施形態においては、方法は対象となる組成物の有効量を対象の腫瘍への供給動脈血に直接投与することを含む。1つの実施形態においては、方法は対象となる組成物の有効量をカテーテルを用いて癌の腫瘍への供給動脈血に直接投与することを含む。対象となる組成物を投与するためにカテーテルを使用する実施形態においては、カテーテルの挿入は蛍光顕微鏡またはカテーテルの挿入を観察および/またはガイドできる当該分野で知られた他の方法によりガイドまたは観察してよい。別の実施形態においては、方法は化学塞栓形成法を含む。例えば化学塞栓形成法は油脂基材と混合した樹脂様物質（例えばエチオドール中のポリビニルアルコール）および化学療法剤1つ以上よりなる組成物で癌性の腫瘍に血液供給している血管を遮蔽することを含む。更に別の実施形態においては、方法は対象となる組成物の対象への全身投与を包含する。

30

40

【0105】

一般的には、本発明の医薬品組成物を利用した化学塞栓形成法または直接の動脈内または静脈内の注射による療法は典型的には部位とは無関係に同様の方法で実施する。概すれば、塞栓形制すべき領域の血管造影（血管の地図）、または、より典型的には、特定の实

50

施形態においては、X線撮影しながら、動脈または静脈（塞栓形成すべき、または注射すべき部位により異なる）内に挿入したカテーテルを介して放射線不透明性の造影剤を注射することによりまず動脈造影を実施してよい。カテーテルは経皮的に、または外科的処置により挿入してよい。次に血流が停止したことが観察されるまでカテーテルを介して本発明の医薬組成物を還流することにより血管を閉塞させる。閉塞は血管造影を反復することにより確認する。直接注射を用いる形態においては、次に血管に所望の用量の本発明の医薬組成物を注入する。

【0106】

塞栓形成療法は一般的には治療すべき腫瘍または血管の塊の間質全体に渡る阻害剤を含有する組成物の分布をもたらす。動脈管腔に充填されている塞栓粒子の物理的塊が血液供給の閉鎖をもたらす。この作用に加えて、抗血管形成因子の存在が腫瘍または血管の塊に血液供給する新しい血管の形成を防止し、血液供給の遮断の無力化作用を増強する。直接の動脈内または静脈内の投与は一般的には同じく治療すべき腫瘍または血管の塊の間質全体に渡る阻害剤を含有する組成物の分布をもたらす。しかしながら、血液供給は一般的にはこの方法により閉鎖されるとは期待されない。

【0107】

本発明の1つの特徴内において、肝臓または他の組織の原発および二次的な腫瘍は塞栓形成または直接の動脈内または静脈内の注射療法を用いて治療される。概すれば、カテーテルを大腿または上腕動脈を介して挿入し、そして、蛍光ガイダンスの下に動脈系を經由してこれを操舵することにより肝動脈まで進行する。腫瘍に血液供給している血管の完全な遮断を行うために必要な位置まで肝動脈血管分枝内にカテーテルを進行させる一方で可能な限り多くの正常構造に血液供給している動脈分枝は温存する。理想的にはこれは肝動脈の分節分枝であるが、腫瘍の範囲およびその個々の血液供給によっては、胃十二指腸動脈の起点から遠位の全肝動脈または複数の個別の動脈を遮断する必要がある場合もある。所望のカテーテル位置が達成された後、遮断すべき動脈内の流動が停止するまで、好ましくは観察された後でも更に5分間、動脈カテーテルを介して組成物（上記）を注射することにより動脈を塞栓させる。動脈の閉塞はカテーテルを介して放射線不透明の造影剤を注射し、そして蛍光顕微鏡またはX線フィルムにより以前は造影剤で充填された血管がもはやそうではないことを明らかにすることにより確認してよい。直接注射を用いる実施形態においては、所望の用量で動脈カテーテルを介して組成物（上記）を注射することにより動脈に注入する。閉塞すべき供給動脈の各々で同様の操作法を反復してよい。

【0108】

大部分の実施形態においては、対象となる医薬組成物は予防的または治療的な投与の部分とし配合された治療薬または他の物質の治療有効量を患者に送達するために十分な量で送達すべき物質を配合する。粒子内の活性化化合物の所望の濃度は薬剤の吸収、不活性化および排出の速度、並びに化合物の送達速度により異なる。用量の値はまた緩解すべき状態の重症度によっても異なる。何れかの特定の対象に対しては、特定の用量用法は、個体の必要性および組成物の投与を管理または監督する担当者の専門的判断に応じて、経時的に調節しなければならない。典型的には用量は当業者の知る手法を用いて決定される。選択された用量水準は使用する本発明の特定の化合物またはそのエステル、塩またはアミドの活性、投与経路、投与時期、使用する特定の化合物の排出または代謝の速度、治療期間、使用する特定の化合物と組み合わせて使用される他の薬剤、化合物および/または物質、治療すべき患者の年齢、性別、体重、状況、全身状態および病歴および医学分野で知られている類似の要因を含む種々の要因により異なる。

【0109】

用量は患者のkg体重当りの組成物の量に基づく。他の量は当業者の知るとおりであり、容易に決定される。或は、本発明の用量は組成物の血漿中濃度を参照して決定してよい。例えば最大血漿中濃度（ C_{max} ）および0時～無限の血漿中濃度-時間曲線下面積（ $AUC(0-4)$ ）を使用してよい。本発明の用量は C_{max} および $AUC(0-4)$ の上記値をもたらすもの、および、これ等のパラメーターに関してより高値または低値をも

10

20

30

40

50

たらず他の用量を包含する。

【0110】

当該分野の医師または獣医師は必要な医薬組成物の有効量を容易に決定して処方できる。例えば医師または獣医師は、所望な治療効果を達成するために必要な量より低値の水準で医薬組成物中に用いられる本発明の化合物の投与を開始し、そして、所望の効果が達成されるまで徐々に用量を増大させることができる。

【0111】

一般的に、本発明の化合物の適当な一日あたり用量は治療効果をもたらすために有効である最低用量となる化合物の量である。このような有効用量は一般的には上記した要因により変動する。

10

【0112】

ある患者において最も効果的な治療をもたらす何れかの特定の化合物の投与の厳密な時間および量は特定の化合物の活性、薬物動態および生体利用性、患者の生理学的状態（例えば年齢、性別、疾患の型および段階、全身状態、所定の用量への応答性および投薬の型）、投与経路等により異なる。本明細書に記載するガイドラインを用いて投与の旨適化、例えば投与に旨適な時間および/または量の決定を行ってよく、これは対象のモニタリングおよび用量および/または時期の調節よりなる日常的な実験を必要とするのみである。

【0113】

対象に投与を行う間、患者の健康状態は24時間の期間中、所定の時点において関連する指針1つ以上を測定することによりモニタリングしてよい。このようなモニタリングの結果に従って、治療、例えば投与の追加、投与量、投与時期、製剤を最適にしてもよい。同様のパラメーターを測定することにより患者を定期的に再評価して改善の程度を調べるが、このような再評価の初回は典型的には治療開始から4週目の終了時であり、その後の再評価は治療の間は4週～8週おき、そしてその後は3カ月おきに行う。治療は数ヶ月～数年継続するが、ヒトの場合は最低1ヶ月が典型的な治療期間である。投与する薬剤の量および場合により投与時間の調節はこれ等の再評価に基づいて行ってよい。

20

【0114】

治療は化合物の旨適用量より低値の少量を用いて開始してよい。その後、旨適な治療効果が得られるまで用量は少量ずつ増量してよい。

【0115】

本発明の数種の化合物または他の化学療法剤の複合使用は、異なる成分の作用の開始と持続時間は相補的であるため、何れの個々の成分の必要用量も低減する場合がある。このような複合療法の場合、異なる活性物質を共に、または個別に、そして1日のうちで同時に、または異なる時点において送達して良い。対象となる化合物の毒性および治療有効性は、例えばLD50およびED50を測定するための、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的操作法により測定してよい。大きい治療指数を示す組成物が好ましい。毒性副作用を示す化合物を使用しても良いが、副作用を低減するためには所望の部位に化合物をターゲティングする送達システムを設計するように留意しなければならない。

30

【0116】

細胞培養試験および動物試験で得られたデータをヒトにおける使用に関わる用量の範囲を設定する際に使用してよい。何れかの補給物またはそれに含まれる何れかの成分の用量は好ましくは毒性が僅か～皆無であるED50を含む循環系濃度の範囲内とする。用量はこの範囲内において、使用する容量および投与経路により変動する。本発明の薬剤に関しては、治療有効用量は細胞培養試験から予め推定してよい。用量は動物モデルにおいては、細胞培養において決定されるように、IC50（即ち症状の半最大抑制を達成する被験化合物の濃度）を含む循環血漿中濃度範囲を達成するように設定される。このような情報はヒトにおける有用用量をより正確に決定するために使用してよい。血漿中濃度は例えば高速液体クロマトグラフィーにより測定してよい。

40

【0117】

(7.キット)

50

本発明は種々の癌を治療するためのキットを提供する。例えばキットは前述した医薬組成物1つ以上および場合によりその取扱説明書を含んでよい。更に別の実施形態においては、本発明は医薬組成物1つ以上およびその組成物の投与を行うための装置1つ以上を含むキットを提供する。例えば対象となるキットは医薬組成物および癌性の腫瘍内への組成物の直接の動脈内注射を行うためのカテーテルを含んでよい。別の実施形態においては、対象となるキットは送達装置と共に使用するための場合により医薬品として製剤されるか凍結乾燥されたLT - - Rアゴニスト抗体構築物の予備充填されたアンプルを含んでよい。

【実施例】

【0118】

10

(例示)

本発明をここで一般的に記載したが、本発明の特定の特徴および実施形態の説明の目的のためであって本発明を制限する意図が全くない以下の実施例を参照することにより更に容易に理解できる。

【0119】

本発明の実施は特段の記載が無い限り、当該分野で知られている細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組み換えDNAおよび免疫学の従来的手法を使用する。このような手法は文献に記載されている。例えばMolecular cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed . by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D.N. Glover ed ., 1985); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait ed ., 1984); Mullis ら., 米国特許4,683,195号; Nucleic Acid Hybridization (B.D. Hames & S.J. Higgins eds ., 1984); Transcription and Translation (B.D. Hames & S.J. Higgins eds ., 1984); Culture Of Animal Cells (R.I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells and Enzyme (IRL Press, 1986); B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J.H. Miller and M.P. Calos eds ., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu ら., eds), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987); Handbook of Experimental Immunology, Volumes I - IV (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds ., 1986); Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1986)を参照できる。

20

30

40

【0120】

muBHA10およびmuCBE11可変領域、ネズミ - ヒトBHA10およびCBE11キメラ抗体、再形状化(reshaped)BHA10およびCBE11可変ドメイン、huBHA10およびhuCBE11をコードする発現ベクター、5量体chCBE11抗体およびこれ等を精製および試験する方法は以前に本出願人の同時係争中のPCT出願WO96/22788、WO02/30986およびPCT/US03/20762

50

2記載されており、これ等は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0121】

(実施例1 huCBE11/huBHA10二重特異性-1抗体の構築および発現)
 huCBE11/huBHA10二重特異性-1重鎖はInvitrogenのpCEP4-由来EBV発現ベクターpCH274のNotI部位内にpXW018由来の1087bpBsrGI-NotIscFv-含有フラグメントおよびpEAG1325由来の1170bpNotI-BsrGIhuCBE11重鎖フラグメントをサブクローニングすることにより構築し、プラスミドpXW020を生成した。pXW020の2.26kbNotIインサートのDNA配列を確認した。成熟二重特異性-1重鎖のcDNA配列は図1Aに示し、そのコードするアミノ酸配列は図1Bに示し；これは2XGly4Ser可撓性リンカーによりそのC末端に連結されたhuBHA10scFvを有するhuCBE11重鎖を含む。huCBE11/huBHA10二重特異性-1抗体はpXW020およびpAND076、即ちhuCBE11軽鎖のためのEBV発現ベクターで同時トランスフェクトすることにより293-EBNA細胞内で一過性に発現させた。pAND076にコードされた成熟二重特異性-1軽鎖のcDNAおよびコードされたアミノ酸配列を図2Aおよび2Bに示す。二重特異性-1構築物は図6Aに模式的に示す。huCBE11/huBHA10二重特異性-1抗体構築物は一過性にトランスフェクトされた細胞から採取したコンディショニングされた培地のウエスタンブロット分析により確認した。ヘテロ4量体抗体は、ウエスタンブロットを抗ヒトIgG(重鎖プラス軽鎖)-特異的抗体(親huBHA10、EBV発現ベクターpKJS046およびpKJS049の同時トランスフェクションにより作成、親huCBE11、EBV発現ベクターpAND076および陽性対照としてのpAND090および陰性対照としての空ベクターpCH274の同時トランスフェクションにより作成)をプローブとして行った場合に検出された。huCBE11/huBHA10二重特異性-1抗体構築物の特異性はフローサイトメトリーにより試験した場合にHT29およびCOS7細胞の両方において表面LT-Ronを染色するその能力により確認した。pXW020およびpAND076による293-EBNA細胞の大規模同時トランスフェクションを行って精製の抗体を作成した。

【0122】

(実施例2 scFv.huCBE11の構築)
 huCBE11の単一鎖Fv(scFv.huCBE11)の構築における第1工程はpXW022と称される突然変異誘発鑄型を作成するためにpBluescriptII SK+クローニングベクターの2.91kbNotI-HindIIIベクター骨格フラグメント内にEBV発現pAND090由来のhuCBE11重鎖可変ドメインを担持する437bpNotI-HindIIIフラグメントをサブクローニングすることである。huCBE11軽鎖可変ドメインを担持するpUC系プラスミドpAND074を以下のプライマー(a)huCBE11軽鎖の成熟N末端にインフレームのBstEII部位、5'重鎖FR4残基および3X可撓性Gly4Serリンカーを付加させるための5'CAA TCT CAA AGC TAC CAT GGA GGT CAC CGT CTC CTC TGG GGG CGG GGG GTC CGG GGG AGG CGG GTC GGG AGG TGG CGG AAG TGA TAT CCA GAT GAC CCA G3'(配列番号11)およびそのリバース相補体、および、(b)リンカーの第2のGly4Serの3'末端をBanHI部位としながらhuCBE11鎖可変ドメインのC末端にインフレームの2XGly4Serリンカーを付加するための5'GCA CCA AGC TGG AGA TCA AAG GGG GTG GTG GTT CAG GAG GTG GAG GAT CCT TCC CAC CAT CCA GTG AC3'(配列番号12)を用いて製造元の推奨するプロトコルに従ってStratagene QuickChange Mutagenesisキットを用いた部位指向性突然変異誘発に付した。5'および3'リンカーの両方を含む突然変異体軽鎖プラスミドは導入されたBstEIIおよびBamHI部位およびBglI

I 制限部位の消失をスクリーニングすることにより同定した。得られたプラスミド pXW024 の 405 bp BstEII - BamHI リンカー付 huCBE11 軽鎖インサートの DNA 配列を確認した。pXW022 由来の 412 bp NotI - BstEII huCBE11 重鎖可変ドメインフラグメントおよび pXW024 由来の 405 bp の BstEII - BamHI リンカー付 huCBE11 軽鎖フラグメントを 2.94 kb NotI - BamHI ベクター骨格フラグメント pBluescript IISK + クローニングベクター内にサブクローニングして pXW025 を作成した。pXW025 内の 817 bp の NotI - BamHI scFv . huCBE11 インサートの DNA 配列を確認したところ、それは軽鎖可変ドメインの C 末端に融合して 2XGly4Ser リンカーを有する、3XGly4Ser 可撓性リンカーにより軽鎖可変ドメインに連結された重鎖可変ドメイン（そのシグナル配列を有する）を含んでいた。

10

【0123】

（実施例 3 scFv . huCBE11 - Fc 融合の構築および発現）

scFv . huCBE11 が親 huCBE11 mAb の LT R 結合活性を温存していることを確認するために、2XGly4Ser リンカー scFv . huCBE11 が可溶性ヒト IgG1Fc (scFv . huCBE11 - Fc) の N 末端に結合した可溶性融合蛋白を構築した。この構築物も相応に発現させた。Lora, 1998, Protein Engineering 11:495-500 により記載されているものと同様の組み換えヒト IgG1Fc cDNA を含有するプラスミド pEAG1397 をプライマー 5' GTT CTG GAT TCC GGC GTC GGGATC CGA GCC CAA ATC TAG TGA CAA G3' (配列番号 13) およびそのリバーズ相補体を用いながら Quikchange 部位指向性突然変異誘発に付し、ヒンジの 5' 末端においてインフレームの BamHI を付加した。突然変異したプラスミドは導入された BamHI 部位をスクリーニングすることにより同定した。得られたプラスミド pXW023 の 711 bp BamHI - NotIFc フラグメントの DNA 配列を確認した。pXW025 由来の 817 bp の NotI - BamHI scFv . huCBE11 フラグメントおよび pXW023 の 711 bp の BamHI - NotIFc フラグメントを In vitro gen の pCEP4 誘導 EBV 発現ベクター pCH274 の NotI 部位にサブクローニングしてプラスミド pXW026 を作成した。発現ベクター pXW026 内の 1.53 bp の NotI scFv . huCBE11 - Fc cDNA の DNA 配列を確認した。プラスミド pXW026 を 293 - EBNA 細胞に一過性のトランスフェクトした。scFv . huCBE11 - Fc 融合蛋白の発現は一過性にトランスフェクトした細胞から採取したコンディショニングされた培地のウエスタンブロット分析により確認した。予測された大きさの単独二量体融合蛋白は、ウエスタンブロットを抗ヒト Fc - 特異的抗体（親 huCBE11、EBV 発現ベクター pAND076 および陽性対照としての pAND090 および陰性対照としての空ベクター pCH274 の同時トランスフェクションにより作成）をプローブとして行った場合に検出された。scFv . huCBE11 - Fc の特異性はフローサイトメトリーにより試験した場合に HT29 細胞上の表面 LTbR を染色するその能力により確認した。pXW026 による 293 - EBNA 細胞の大規模トランスフェクションを行って精製用の抗体を作成した。

20

30

40

【0124】

（実施例 4 huCBE11 / huBHA10 二重特異性 - 2 抗体の構築および発現）

Fc - scFv . huBHA10 および scFv . huCBE11 - Fc 融合蛋白の両方による発現および LT R 結合を明らかにした後に、huCBE11 / huBHA10 二重特異性 - 2 と称される両者単一の scFv を含有する複合単一融合蛋白を構築した。huCBE11 / huBHA10 二重特異性 - 2 抗体発現ベクターは、In vitro gen の pCEP4 - 由来 EBV 発現ベクター pCH274 の NotI 部位内に pXW018 由来の 1087 bp BsrGI - NotIFc - scFv . huBHA10 - 含有フラグメントおよび pXW026 由来の 1220 bp NotI - BsrG1 scFv . huCBE11 - Fc フラグメントをサブクローニングすることにより構築し、プラスミド pX

50

W027を生成した。pXW027の2.31kb NotI インサートのDNA配列を確認した。pXW027によりコードされる成熟huCBE11/huBHA10二重特異性-2抗体構築物のcDNAおよびアミノ酸配列は図3Aおよび3Bに示す通りであり；これはscFv.huBHA10に融合した2XGly4Ser可撓性リンカーでFcのC末端で連結されたヒトIgG1Fcに融合した2XGly4Ser可撓性リンカーによりC末端で連結されたscFv.huCBE11を含む。二重特異性-2抗体の模式図を図6Aに示す。huCBE11/huBHA10二重特異性-2抗体構築物をpXW027によるトランスフェクションにより293-EbNA細胞中で一過性に発現させた。huCBE11/huBHA10二重特異性-2抗体構築物の発現は一過性にトランスフェクトした細胞から採取したコンディショニングされた培地のウエスタンブロット分析により確認した。単独二量体抗体はウエスタンブロットを抗ヒトFc-特異的抗体(Fc-scFv.huBHA10、EBV発現ベクターpXW018のトランスフェクションにより作成、scFv.huCBE11-Fc、陽性対照としてのEBV発現ベクターpXW026および陰性対照としての空ベクターpCH274のトランスフェクションにより作成)をプローブとして行った場合に検出された。huCBE11/huBHA10二重特異性-2抗体構築物の特異性はフローサイトメトリーにより試験した場合にHT29およびCOS7細胞の両方において表面LTbRを染色するその能力により確認した。pXW027による293-EbNA細胞の大規模トランスフェクションを行って精製用の抗体を作成した。

10

20

【0125】

(実施例5 単一特異性-14価CBE11抗体の構築および発現)

huCBE11/huBHA10二重特異性-1および2抗体に設計が同様である単一特異性抗体をhuCBE11誘導抗原結合部位4つを有するように設計した。CBE114価単一特異性抗体の模式図を図6Bに示す。4価CBE11抗体の構築にはFcのC末端に融合するためのscFv.huCBE11の再操作が必要であった。鑄型pXW025によりコードされるscFv.huCBE11の再操作における第1工程はhuCBE11scFvの5'末端にインフレームのXmaI部位、ついて可撓性2XGly4Serリンカーを付加するための突然変異誘発プライマー(a): 5' GGA CTG GA C CTG GAG GGT CCC CGG GGG GGG AGG TGG AT C AGG AGG TGG CGG CTC CGA GGT ACA ACT GG T GG 3' (配列番号14)およびそのリバーズ相補体、およびhuCBE11重鎖可変ドメインのFR2内の内部XmaI部位を除去するための(b) 5' CAT GTA TTG GTT TCG CCA GGC ACC GGG AAA GGG GCT GGA G 3' (配列番号15)およびそのリバーズ相補体を用いたStratagene Quickchange部位指向性突然変異誘発であった。突然変異したプラスミドは適切な位置における内部XmaI部位の消失および新しいXmaI部位の獲得があるものをスクリーニングした。得られたプラスミドpXW032における786bpのBamHI-XmaIhuCBE11scFvインサートのDNA配列を確認した。鑄型pXW032は、scFv軽鎖可変ドメインFR4の末端に終止コドン(Stop)を付加し、3'NotIクローニング部位を付加するための突然変異誘発プライマー: 5' GCA CCA AGC TTG AGA TCA AAT GAG GCG GCC GCT CAG GAG GTG GAG GATCC 3' (配列番号16)およびそのリバーズ相補体を用いたStratagene Quickchange部位指向性突然変異誘発に付した。突然変異したプラスミドはNotI部位の獲得があったものをスクリーニングした。得られたプラスミドpXW035の767bpのXmaI-NotIリンカー付scFv.huCBE11インサートのDNA配列を確認した。pEAG1397由来の752bpのNotI-XmaI可溶性huIgG1FcフラグメントおよびpXW035由来の767bpのXmaI-NotIリンカー付scFv.huCBE11フラグメントをpCEP4-誘導EBV発現ベクターpCH274のNotI部位にサブクローニングし、pXW038を作成した。pXW038の1.52kbのNotIFc-scFv.huCBE11

30

40

50

インサートのDNA配列を確認した。可溶性scFv・huCBE11はpXW038による293-EbNA細胞の一過性トランスフェクションにより発現できる。

【0126】

pEAG1325由来の1170bpのNotI-BsrGIhuCBE11重鎖フラグメントおよびpXW038由来の1057bpのBsrGI-NotIFc-scFv・huCBE11フラグメントをpCEP4誘導EBV発現ベクターpCH274のNotI部位にサブクロニングしてpXW039を作成した。pXW039内の2.23kbのNotIインサートのDNA配列を確認し；それは2XGly4Ser可撓性リンカーによりそのC末端に連結されたhuCBE11scFvを有するhuCBE11重鎖を含有する。単一特異性-1huCBE11はpXW039およびpAND076、即ちhuCBE11軽鎖に関わるEBV発現ベクターによる293-EbNA細胞の一過性に同時トランスフェクションにより発現できる。huCBE11単一特異性-1抗体構築物の成熟重鎖のDNAおよびアミノ酸配列は図4Aおよび4B、並びに図6Bに示す。

10

【0127】

(実施例6 単一特異性-2の4価huCBE11抗体の構築および発現)

huCBE11/huBHA10二重特異性-2抗体と同様の構造を有する単一特異性の4価のhuCBE11抗体を構築した。CBE114価単一特異性抗体の模式図は図6Bに示す通りである。構築は以下のクロニング操作法に従って実施した。pXW026由来の1220bpのNotI-BsrGIFc-scFv・huCBE11フラグメントおよびpXW038由来の1057bpのBsrGI-NotIFc-scFv・huCBE11フラグメントをpCEP4誘導EBV発現ベクターpCH274のNotI部位にサブクロニングしてpXW040を作成した。pXW040内の2.28kbのNotIインサートのDNA配列を確認し；それはscFv・huCBE11に融合した2XGly4Ser可撓性リンカーによるFcC末端において連結されたヒトIgG1Fcに融合した2XGly4Ser可撓性リンカーによるそのC末端において連結されたscFv・huCBE11を含有する。pXW040によりコードされた成熟単一特異性-2huCBE11構築物のDNAおよびアミノ酸配列を図5Aおよび5B、そして模式的に6Bに示す。単一特異性-2抗体構築物はpXW040によるトランスフェクションにより293-EbNA細胞において一過性に発現できる。

20

【0128】

(実施例7 5量体キメラCBE11の構築および発現)

CBE11可変ドメインのクロニングおよびキメラCBE11(chCBE11)カップ軽鎖およびIgG1重鎖それぞれのためのEBV発現ベクターpEAG982およびpEAG983の構築は、参照により本明細書に組み込まれる出願人の同時係争中のPCT出願WO02/30986において記載したとおりである。

30

【0129】

Smithら。(1995)J.Immunol.154:2226はIgG定常領域へのC末端IgMテイルピースの付加は重合体組み換えIgM様抗体を作成し、その結合親和性を大きく増大させたことを報告している。野生型IgG1C末端PGK配列がヒトIgMC末端配列TGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY(配列番号21)で置き換えられる、Smith等により記載されたC末端テイルピースを倍加させる、部位指向性突然変異誘発により、IgM由来の18アミノ酸C末端テイルピースをキメラCBE11-huIgG1重鎖のC末端に付加した。pUC誘導クロニングベクター中SalI-NotIフラグメントとしてヒトIgG1Fc cDNAを含有する鑄型pEAG409を、プロリン445(KabatEUN numbering)をスレオニンに突然変異させ、IgMテイルピースの最初の8アミノ酸を付加させている突然変異誘発プライマー5'GAAGAGCCTCTCCCTGTC TAC CGG GAA ACC CAC CCT GTA CAA CGT GTC CCT GTG AGT GCG GCG GCC GCC3'(配列番号22)を用いながら製造元の推奨するプロトコルに従ってAmersham Pharmacia Biotech USA突然変異誘発キ

40

50

ットを用いながらユニーク部位排除 (U S E) 突然変異誘発に付した。突然変異したプラスミドは導入された R s a I および A f l I I I 部位をスクリーニングすることにより同定した。得られたプラスミド p E A G 4 2 3 の I g G c D N A の C 末端を含有する N s i - N o t I インサートの D N A 配列を確認した。

【 0 1 3 0 】

鑄型プラスミド p E A G 4 2 3 を、 I g M テイルピースの最後の 1 0 アミノ酸を付加する突然変異誘発プライマー 5 ' C C C T G T A C A A C G T G T C C C T G G T C A T G T C C G A C A C A G C T G G C A C C T G C T A C T G A G T G C G G C G G C C G C C 3 ' (配列番号 2 3) を用いて別の U S E 突然変異誘発に再度付した。突然変異したプラスミドは導入された D d e I および P v u I I 部位をスクリーニングすることにより同定した。得られたプラスミド p E A G 4 2 7 の F c c D N A 配列を確認した。キメラ C B E 1 1 - I g G 1 重鎖の C 末端に I g M テイルピースを付加するために、 p E A G 9 8 3 由来の 1 . 5 7 k b N o t I - N s i I フラグメントおよび p E A G 4 2 7 由来の 0 . 1 2 k b の N s i I - N o t I フラグメントを i p C E P 4 (I n v i t r o g e n) 誘導 E B V 発現ベクター p C H 2 6 9 の N o t I 部位にサブクローニングして、プラスミド p E A G 9 9 5 を作成した。

10

【 0 1 3 1 】

5 量体キメラ C B E 1 1 抗体は重鎖ベクター p E A G 9 9 5 および軽鎖ベクター p E A G 9 8 2 で 2 9 3 - E B N A 細胞を一過性に同時トランスフェクトすることにより作成した。 p E A G 9 9 5 および p E A G 9 8 2 によりコードされる推定成熟 c D N A 配列を図 1 1 に示す。トランスフェクトされた細胞は単量体および 5 量体の c h C B E 1 1 の両方を分泌し、結合親和性は大きく増大していた。ウエスタンブロット分析によれば、 p E A G 9 9 5 での同時トランスフェクションにおいて生産された重鎖は野生型 c h C B E 1 1 - I g G 1 重鎖ベクター p E A G 9 8 3 での同時トランスフェクションにおいて生産されたものよりも大きいサイズを有していたことがわかった。 p E A G 9 8 2 および p E A G 9 9 5 による一過性の同時トランスフェクションを大規模化して精製のための 5 量体抗体を作成した。

20

【 0 1 3 2 】

(実施例 8 多価抗 L T B R 抗体のインビトロ分析)

腫瘍細胞の成育の抑制における、本発明の多価抗体、例えば二重特異性 - 1 、二重特異性 - 2 、単一特異性 1 および単一特異性 2 抗体のインビトロの薬効を測定するために、多価抗体を C B E 1 1 および B H A 1 0 抗体の種々の形態に対して平行して試験した。

30

【 0 1 3 3 】

抗体は以下の操作法に従って調製した。ヒト化 C B E 1 1 およびヒト化 B H A 1 0 抗体は安定発現 C H O 細胞系統から作成した。二重特異性 1 、二重特異性 2 、単一特異性 1 、単一特異性 2 およびキメラ C B E 1 1 5 量体抗体を E B N A 2 9 3 細胞における一過性の発現により作成した。 7 抗体全てをまずプロテイン A セファロース (A m e r s h a m - P h a r m a c i a) 上のクロマトグラフィーにより精製した。ヒト化 C B E 1 1 は更に F r a c t o g e l H i c a p T M A E (E M I n d u s t r i e s) およびフェニルセファロース (A m e r s h a m - P h a r m a c i a) 上のクロマトグラフィーにより精製した。ヒト化 B H A 1 0 および二重特異性 - 1 抗体は更に、 F r a c t o g e l H i c a p S E (E M I n d u s t r i e s) 上のクロマトグラフィーにより精製した。キメラ C B E 1 1 5 量体は更にセファロース 6 B 上のサイズエクスクルージョンクロマトグラフィーにより精製した。

40

【 0 1 3 4 】

各抗体 (キメラ C B E 1 1 5 量体を除く) 少量を更に B 3 0 0 0 S W (T o s o H a a s) 上のサイズエクスクルージョンクロマトグラフィーにより精製し、凝集物 (二量体およびより大型の凝集物) があればそれを除去した。 1 . 4 の消光係数をヒト化 C B E 1 1 、ヒト化 B H A 1 0 および C B E 1 1 5 量体に対して使用した。 1 . 6 の消光係数を二重特異性 - 1 および単一特異性 1 に対して使用した。 1 . 7 の消光係数を二重特異性 2 およ

50

び単一特異性 2 に対して使用した。S D S - P A G E および質量スペクトル分析によれば精製された抗体は少なくとも 9 5 % 未損傷であることがわかった。

【 0 1 3 5 】

本発明の多価抗体の抗腫瘍活性を測定するために H T 2 9 腺癌細胞系統を用いてインビトロで腫瘍細胞生育を抑制する能力があるかどうか各抗体を調べた。結腸腺癌細胞系統 H T - 2 9 (A T C C) を 1 0 % ウシ胎児血清、2 m M グルタミン、1 m M ピルビン酸ナトリウム、1 % N E A A を添加した M E M イーグル培地中、3 7 5 % C O 2 下に生育させた。H T 2 9 細胞をヒトインターフェロン (8 0 U / m l) および種々の濃度の抗体剤を含有する培地中、9 6 穴プレートのウェルに播種した (5 0 0 0 個 / ウェル) 。培養 4 日間の後、ミトコンドリア中で還元されて 5 7 0 n m において吸収を示す着色したホルマザン生成物である M T T [3 , 4 , 5 - ジメチルチアゾール - 2 - イル) 2 . 5 - ジフェニルテトラゾリウムブロミド] で生存細胞を染色した。

10

【 0 1 3 6 】

H T 2 9 腺癌細胞系統の成育は図 8 に示すとおり種々の抗 L T B R アゴニスト抗体 (およびインターフェロンガンマ) の存在下、種々の程度まで低減された。各抗 L T B R 剤は活性の最大値 (4 5 0 n m における最小吸光度値) に応じて種々の定常値に達した。この定常値は L T B R 活性化剤の力価の尺度とした。ヒト化 B H A 1 0 は最も効果の低い薬剤であり (最小 A 4 5 0 = 0 . 9) 、次いでヒト化 C B E 1 1 (最小 A 4 5 0 = 0 . 8) であった。ヒト化 C B E 1 1 およびヒト化 B H A 1 1 を対にすることにより薬効は有意に増大する (最小 A 4 5 0 = 0 . 6) が、単一の 4 価分子 (二重特異性 1) 中で h u B H A 1 0 抗原結合領域を h u C B E 1 1 に組み合わせることではより高度に薬効が増大した (最小 A 4 5 0 = 0 . 5) 。抗原結合部位 1 0 箇所を有する C B E 1 1 5 量体が最も強力な薬剤 (最小 A 4 5 0 = 0 . 3) であった。総括すると、二重特異性 (B H A 1 0 / C B E 1 1) および単一特異性 (C B E 1 1) 4 価抗体は h u C B E 1 1 および h u B H A 1 0 と比較して腫瘍細胞生育を抑制する能力が増強されていた。

20

【 0 1 3 7 】

(実施例 9 胸腺欠如ヌードマウスにおける h u B H A 1 0 および二重特異性 1 および 2 への W i D r ヒト結腸直腸腺癌の比較応答)

W i D r ヒト結腸直腸腺癌インビトロ細胞系統を A m e r i c a n T i s s u e T y p e C o l l e c t i o n から入手した。細胞系統を 1 . 5 g / L 重炭酸ナトリウム、0 . 1 m M 非必須アミノ酸および 1 . 0 m M ピルビン酸ナトリウム、9 0 % ウシ胎児血清を含有、1 0 % 抗生物質は無添加となるように調節した 2 m M L - グルタミンおよび E a r l e B S S を添加した最小必須イーグル培地中 4 継代インビトロで継代した。

30

【 0 1 3 8 】

H a r l a n S p r a g u e D a w l e y (M a d i s o n , W I) より 2 2 0 匹の雌性胸腺欠如ヌードマウスを入手した。動物を固体別に耳パンチでマークし、その後、無作為割付した。試験群および対照群への無作為割付の当日、動物に B i o M e d i c 動物 I D チップを移植した。動物には、右脇腹領域皮下に、2 x 1 0 E 6 細胞 / マウス (R P M I - 1 6 4 0 w / o 血清) の細胞接種物を移植した。移植後 5 日に、腫瘍サイズ測定値を記録し、測定は毎日、または、一日おきに、移植後 7 日目の段階まで継続した。

40

【 0 1 3 9 】

パーニアカリパスで測定した場合に最低 5 m m (長さ) x 5 m m (幅) のサイズの腫瘍を有するマウスを選択した。マウスを L a b C a t ソフトウェアを用いて試験群および対照群に無作為割付した。初期体重を記録し、そして投与は以下の通り投与群に対して行った。

【 0 1 4 0 】

(表 1)

【 0 1 4 1 】

【表 1】

群	処置レジメン	動物数
PBS (非発熱物質化) コントロール	200 uL/マウス, i.p., 3 x/1週間 x4週間 (M,W,F)	20
タキソール	25.0 mg/kg/inj., i.p., Q4DX3	8
huBHA10	200 ug/200uL/inj., i.p., 2 x/1週間 x4週間 (M,Th)	8
huBHA10	100 ug/200uL/inj., i.p., 2 x/1週間 x4週間 (M,Th)	8
huBHA10	50 ug/200uL/inj., i.p., 2 x/1週間 x4週間 (M,Th)	8
huBHA10	25 ug/200uL/inj., i.p., 2 x/1週間 x4週間 (M,Th)	8
二重特異性 1	200 ug/200uL/inj., i.p., 3 x/1週間 x4週間 (M,W,F)	8
二重特異性 1	100 ug/200uL/inj., i.p., 3 x/1週間 x4週間 (M,W,F)	8
二重特異性 1	50 ug/200uL/inj., i.p., 3 x/1週間 x4週間 (M,W,F)	8
二重特異性 1	25 ug/200uL/inj., i.p., 3 x/1週間 x4週間 (M,W,F)	8

10

20

投与の効果は以下のインジケーター、即ち、初期体重、1週2回の腫瘍サイズと体重の測定、第14日、24日、35日(投与第7日、17日、28日)におけるhuBHA10群の血清試料(眼球後出血)、および、第13日、23日、34日(投与代7日、18日、28日)におけるBS1群および溶媒対照群の10匹の血清試料(眼球後出血)、により評価した。

30

【0142】

WiDrヒト結腸腺癌腫瘍の二重特異性-1に対する応答を図9に示す。WiDrヒト結腸腺癌腫瘍生育の抑制における二重特異性-1およびhuCBE11の薬効の比較を図10に示す通りである。

【0143】

(等価物)

本発明は特に新しい抗体構築物を提供する。対象となる特定の実施形態を論じたが、上記明細書は説明のためのものであり、限定するものではない。本発明の多くの変更は本明細書を参照すれば当業者には容易なものである。添付した請求項はこのような実施形態および変更の全てを特許請求するものであり、本発明の完全な範囲は請求項およびその完全な範囲の等価物、および、明細書およびそのような変更を参照することにより決定されるべきである。

40

【0144】

本発明に記載した全ての出版物および特許は個々の出版物または特許が特定して、そして個別に参考により組み込まれるように記載されるように、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。利害関係が生じる場合は、本発明の出願はそこに記載する何れの定義も含めて、調整を行う。

【図面の簡単な説明】

【0145】

【図1A】図1Aは、huCBE11/huBHA10二重特異性-1抗体構築物の成熟重鎖のポリヌクレオチド(配列番号1)を示す。

50

【図1B】図1Bは、h u C B E 1 1 / h u B H A 1 0 二重特異性 - 1 抗体構築物の推定ポリペプチド配列（配列番号2）を示す。

【図2】図2は、h u C B E 1 1 / h u B H A 1 0 二重特異性 - 1 抗体構築物の成熟軽鎖のポリヌクレオチド（配列番号3）および推定ポリペプチド配列（配列番号4）をそれぞれ示す。

【図3A】図3Aは、成熟h u C B E 1 1 / h u B H A 1 0 二重特異性 - 2 抗体構築物のポリヌクレオチド（配列番号5）を示す。

【図3B】図3Bは、成熟h u C B E 1 1 / h u B H A 1 0 二重特異性 - 2 抗体構築物の推定ポリペプチド配列（配列番号6）を示す。

【図4A】図4Aは、h u C B E 1 1 単一特異性 - 1 抗体構築物の成熟重鎖のポリヌクレオチド（配列番号7）を示す。 10

【図4B】図4Bは、h u C B E 1 1 単一特異性 - 1 抗体構築物の成熟重鎖の推定ポリペプチド配列（配列番号8）を示す。

【図5A】図5Aは、成熟h u C B E 1 1 単一特異性 - 2 抗体構築物のポリヌクレオチド（配列番号9）を示す。

【図5B】図5Bは、成熟h u C B E 1 1 単一特異性 - 2 抗体構築物の推定ポリペプチド配列（配列番号10）を示す。

【図6A】図6Aは、適切に網がけされた領域により示される可変ドメインを有する二重特異性抗体構築物の3次構造の模式図である。図6AはC B E 1 1 およびB H A 1 0 抗原認識部位を含む二重特異性 - 1 および二重特異性 - 2 抗体の構造を示す。 20

【図6B】図6Bは、適切に網がけされた領域により示される可変ドメインを有する二重特異性抗体構築物の3次構造の模式図である。図6BはC B E 1 1 抗原認識部位を含む単一特異性 - 1 および単一特異性2の4価の抗体の構造を示す。

【図7】図7は、本発明の方法を用いて製造してよい他の抗体構築物の3次構造の模式図である。

【図8】図8は、h u C B E 1 1 / h u B H A 1 0 二重特異性 - 1 および二重特異性 - 2 抗体構築物（それぞれ黒丸および黒四角）、単一特異性 - 1 および単一特異性 - 2 抗体構築物（それぞれ黒三角および黒ひし形）、ヒト化抗体h u C B E 1 1（白三角）、ヒト化抗体h u B H A 1 0（白四角）、ヒト化抗体h u C B E 1 1 およびh u B H A 1 0 複合投与（白ひし形）および5量体c h u C B E 1 1 抗体（白丸）を含む8種のアゴニスト抗L T - R 抗体に関する抗体濃度の関数としてのH T 2 9 細胞増殖を示すグラフである。 30

【図9】図9は、二重特異性 - 1（白三角、白四角、白丸および黒丸）、ベヒクル（P B S 対照、ばつ）およびタキソール（白四角）の記載された用量の関する移植後種々の日数において観察された腫瘍の重量により測定された二重特異性 - 1 に対するW i D r ヒト結腸腺癌腫瘍の応答を示すグラフである。各用量の初回および最終回の投与は矢印で示す。

【図10】図10は複数の腫瘍抑制実験で得られたデータとのh u C B E 1 1 および二重特異性 - 1 の活性の回顧的比較を示す。データは各試験における第34日またはだい35日のいずれかにおいて以下の式、即ち： $(100 - (100 \times (\text{試験群平均} / \text{プラセボ対照群平均})))$ を用いて計算した腫瘍生育の%抑制に基づいて計算した。グラフ上の各データポイントは試験で得られた1つの実験の試験群を示す。 40

【図11A - 1】図11Aは、C B E 1 1 抗体の5量体形態を含む配列を示す。図11Aは成熟5量体キメラC B E 1 1 重鎖のポリヌクレオチド（配列番号17）および推定ポリペプチド配列（配列番号18）を示す。

【図11A - 2】図11Aは、C B E 1 1 抗体の5量体形態を含む配列を示す。図11Aは成熟5量体キメラC B E 1 1 重鎖のポリヌクレオチド（配列番号17）および推定ポリペプチド配列（配列番号18）を示す。

【図11B】図11BはC B E 1 1 抗体の5量体形態を含む配列を示す。図11Bは成熟キメラC B E 1 1 軽鎖のポリヌクレオチド（配列番号19）および推定ポリペプチド配列（配列番号20）を示す。

【 図 1 A 】

Figure 1A

配列番号 1:

1 GAGGTACAACCTGGTGGATCTGGGGAGGCTTATGAGGCCGAGGGTCCCTGAGGCTC 60
61 TCCCTGGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCACTGACTATTACATGATTTGGTTTCGCCAGGCG 120
121 CCGGAAAGGGGCTGGAGTGGTCCGACCACTTATGATGATGGTGGTGGTACACCTACTAT 180
181 CCGAGCAGTGTGAGGGGCTGTCACCTTCCTGGAGACATGCTCCGAGAACGCGCTCTAC 240
241 CTCAGATGAGCGCTTCGAGGCTGAGGACACAGCTGTGTTTACTGCGAGAGGGAG 300
301 AATGGTAACTTTACTACTTTGACTTGGGACCAAGGACCAAGGTCACCTCTCCCTCA 360
361 GCGTCCACCAAGGGCCCATCGCTCTCCCGGAGCCCTCCCTCCAGAGCACTCTCGG 420
421 GGCACAGCGGCTGGGCTGCTGGTCAAGGACTACTCCCGGAAAGGAGGAGGAGTGG 480
481 TGGAACTCAGGCGCTGACCAAGCGGCTGGACACTCCCGGCTCTCTACAGTCTCTCA 540
541 GAGCTCTACTCCCTGAGCAGGCTGGACCTCCCGGCTCCGACAGCTTGGGACCCGAGCC 600
601 TACACTGGCAAGTGTGACAGCTCCGACAGCTCCGAGCCCTCCGAGAACCACTCTCC 660
661 AATCTGTGAGCAGACTCACACATGCCACCGTCCGACCACTGAACTCTGGGGAG 720
721 CCGTCACTCTTCCCTTCCCGGAAAGCCAGGACCCCTCAGATCTCCCGGAGCCCT 780
781 GAGGTACATCGTGGTGGTGGAGCGTGGAGCCAGAGCCCTGAGGTCAAGTTCAGCTGG 840
841 TACGTGGAGCGGCTGGAGGCTGATTAATGACAGACCAAGCCCGGAGGAGGAGTACCA 900
901 AGCACGTACAGCTGGTGGTGGAGCTCTCCCGCTCCGACAGGACTGGCTGATGGCAAG 960
961 GAGTCAAGTGTGAGGCTCCGACAGGCTCCGAGCCCTCCGAGAACCACTCTCC 1020
1021 AAGCCAAAGGCGAGCCCGAGACCAAGCTGTGAGCTCCCGCTCCGAGAACCACTCTCC 1080
1081 CTGACCAAGAACAGGCTGAGCTGAGCTGGTGTGCAAGGCTTCTATCCGAGCAGACTC 1140
1141 GCGCTGGAGTGGAGAGCAATGGGAGCGGAGAACACTCAAGACCCAGCCCTCCGAG 1200
1201 TTGGACTCCGAGCGCTCTCTCTCTCTACAGCAAGCTCCCGTGGACAGGAGGAGTGG 1260
1261 CAGCAGGAGAGCT 1320
1321 CAGAGAGAGCT 1380
1381 GTCCAACTGGTCCAGCTCTGAGGCTGAGGAGGCTGGGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 1440
1441 TCCAGGCT 1500
1501 GAGCAGGAGCTTGGAGTGGTGGAGTGGATTTGCTGGAGATGTTCATGCTCAGTACAT 1560
1561 GAGAGTTCAGGGGAGGCTCAACATCTCCAGACCAATCCACGACAGCTACAGT 1620
1621 GAGCTCAGCAGCTGAGGCTGAGGACTGAGGCTGGGCTTATTACTGTGCAAGATCTGGGAA 1680
1581 GGTTCCTCTACTGGGACCAAGGACCAAGCTCCGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 1740
1741 GGGGCGGCGGAGTCCGCTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 1800
1801 CTGTCCGCTCAGTAGGAGCAGGCTCAACCTCAGCTCCAGGCGGCTCAGATCTGGT 1860
1861 ATTAATGTAGCTGGTATCAACAGCAAGGAGGAGGCTTCAATCACTGATTTCCCTCG 1920
1921 GCGTCTCCGAGTCCAGTGGAGTCCCTCCAGATTCAGCGGAGTGGATCTGGGACAGAT 1980
1981 TTCCTCTCAGCAGCAGCTCCAGCTCCAGAGCTCCGCAACTATTTCTCTCAGCAG 2040
2041 TATGACCACTTCCATTCAGCTCCGCGAGGTCACAGGTTGAGATCAATGA 2094

【 図 1 B 】

Figure 1B

配列番号 2:

E V Q L V E S G G G L V K P G G S L R L
S C A A S G F T P S D Y Y M Y W F R O A
P K G L E M V A T I S D G G S Y T Y Y
P D S V K G R P T I S R D N A K N S L Y
L O M S S L R A E D T A V V Y C A R E E
N G N F Y Y P D Y W G Q G T T 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 L G C L V K D Y F P V V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S
G L Y S L S V V T V F S S L Q T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K X V E P
K S C D K T H T C P P C P A P R L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P
E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E B Q Y K
S T Y R V S V L T V L H Q D M L N G N
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S
K A K G O P R E P O V Y Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K 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 V D K S R W
Q Q G H V F S C S V M H E A L H N H Y Y
Q K S L S L S F G G G G S G G G S O
V O L V Q S G A E V K K P G S S V K V T
C K A S G Y T P T T Y Y L H W V R Q A P
G Q C L E W M C W I Y P G N V H A Q Y N
E K F K G R V T I T A D K S T S T A Y M
E L S S L R K S E D T A V Y Y C A R S Y E
G F P Y W G Q G T T V T V S S G G S
G G G S G G G G S D I Q M T C S P S S
L S A S V G D R V T I T C K A S Q N V G
I N V A W Y Q Q K P G K A P K S L I S S
A S Y R Y S G V P S R F S G S G S G T D
F T L T L S S L Q P E D F A T Y F C O O
Y D T Y P F T F Q Q G T K V E I K *

【 図 2 】

Figure 2

1 GATATCCAGATGACCAAGCTCCATCACTCCCTGCTGCATCGTGGGAGCAGGGTCACT 60
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
61 ATCACTGGCAGGCGGCTCAGGACATTAAGAAGCTATTTAAGCTGGTACCGACAGAACCA 120
I T C K A G Q D I K S Y L S W Y Q Q K P
121 GGGAAAGCGCTAAGCTTCTGATCTATTATGCAACAGGTTGGCAGATGGGTCGCCATCA 180
G K A P K L L T Y Y A T R L A D G V P S
181 AGATTCAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTAATCACTTCAACATCCAGGCTCCAGGCT 240
R F S G S G S G T D Y T L T I S S L Q P
241 GAGATTTCCCACTTATTACTGTCTACAGCATGGTGGAGCTCCGCTGGACCTTGGTGG 300
E D F A T Y Y A C L Q H G E S P W T F G G
301 GGCACAGCTGGAGATCAACGAGCTTGGCTCCAGCATCTGTCTCACTTCCCGCA 360
G T K L R I K R T V A A F S V F I F D P
361 TCTGATGAGCAGTGAATCTGGAAGCTGCTCTGTGTGTGCTGCTGAAATACCTCTAT 420
S D K Q L K S G T A S V C L L N N P Y
421 CCCAAGAGCCCAAGTACAGTGGAGGATGAGGATACCGCTCCAGTCCGATCTCCCG 480
P R E A K V Q W K V D N A L Q S G H S Q
481 GAGATGTCCAGAGCAGCAGCAAGGAGCAGCTACAGCTCAGCAGCAGCAGCTTGGAG 540
E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T
541 CTCAGCAAGCAGACTACAGAGAACCAAGCTTGGGCTTGGAGTCAACCCATCGGCG 600
L S K A D Y R K K K V Y V A C E V T H Q G
601 CTGAGCTCCCGCTCACAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAG 645 (配列番号 3)
L S S P V T K S F N R G E C * (配列番号 4)

【 図 3 A 】

Figure 3A

配列番号 5

1 GAGGTACAACCTGGTGGATCTGGGGAGGCTTATGAGGCCGAGGGTCCCTGAGGCTC 60
61 TCCCTGGCAGCCTCTGGATTCACCTTTCACTGACTATTACATGATTTGGTTTCGCCAGGCG 120
121 CCGGAAAGGGGCTGGAGTGGTCCGACCACTTATGATGATGGTGGTGGTACACCTACTAT 180
181 CCGAGCAGTGTGAGGGGCTGTCACCTTCCTGGAGACATGCTCCGAGAACGCGCTCTAC 240
241 CTCAGATGAGCGCTTCGAGGCTGAGGACACAGCTGTGTTTACTGCGAGAGGGAGG 300
301 AATGGTAACTTTACTACTTTGACTTGGGACCAAGGACCAAGGTCACCGTCTCCCT 360
361 GGGGCGGCGGAGTCCGAGGAGGCGGCTCGGAGGTCGCGGAGTGGATATCCAGAGTACC 420
421 CAGCTCAGCAGCTGAGGCTGAGGACTGAGGCTGGGCTTATTACTGTGCAAGATCTGGGAA 480
481 GGTTCCTCTACTGGGACCAAGGACCAAGCTCCGAGCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCTCT 540
541 CTTCTGATGATTAATGCAAGAGTGGCAGATGGGCTCCGAGTCCAGATTCAGTGGAGT 600
601 GAGTCTGGTACAGATTAATACTTACCATCAGCAGCTGGCAGCTGGAGGATTTCCAGCT 660
721 TATTACTGTCTACAGCATGGTGGAGCCCGTGGAGCTTGGTGGAGGACCAAGCTGGAG 720
721 ATCAAAGGGGTTGGTGGTTCAGGAGGTTGAGGATCCGAGCCCAATCTAGTGGACAGACT 780
781 CAGCATGCGCCAGCTGCGGACCTGAGCTCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGTGGTGG 840
841 CCCCAGAGCCAGGAGCAGCTGATGATCTCCGAGCCCTGAGGTCACATGGCTGGTGG 900
901 GTGAGCTGGAGCCAGAGGAGCTCCAGGCTCAGGTTCAAGTTCACTGGTGGTGGGCGG 960
961 GTGAGTATGCAAGCAAGAGCCCGGAGGAGCAGTCAACAGCAGCAGCTCCGCTGGTCC 1020
1021 AGCGTCTCCAGCTCCAGCAGGAGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGGGCTGG 1080
1081 TCCAAAGAGCCCTCCAGCCCACTCCAGAGAACCACTTCCAAAGCCAAAGGAGCAGCC 1140
1141 CCGAGCAGCAGGTTGTAACCTGCCCCATCCCGGATGGAGTGGACAGTCCAGGACT 1200
1201 AGCTTACAGCTTACTGTTGAGCTGGTGGAGGCTTCTTCCAGGACATCCGCTGGAGTGGAGG 1260
1261 AATGGGCGGCGGAGGAGCAGTCCAGGACCAAGCTCCCGCTCCGAGTCCGAGGAGG 1320
1321 TCTTCTCTCAGCAGGCTCAGCTGGAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1380
1381 TCATGCTCCGATGATGATGGGCTCTCCAGCAGCAGTCAACAGCAGGAGGAGGCTCCCT 1440
1441 TCTCCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1500
1501 GAGCTTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1560
1561 ACTTTCAGCAGCTACTTATGAGCTGGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1620
1521 AGGATAGGATTTCTCCGAGATTTCTGCTCTGATGATGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1680
1681 GTCAGATCTCCAGCAGGAGTCCAGCAGCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1740
1741 CTCAGAGATCTGGGCTTATTACTGTCAGGAGTCTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1800
1801 CAAGGAGCCAGGCTCCAGCTCTCTCCAGTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1860
1861 GGTGGTGGTGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1920
1921 GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1980
1981 CAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2040
2041 GAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 2100
2101 AGCTCCAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 2160
2161 AGTTCGCGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG

【 図 3 B 】

Figure 3B

配列番号 6

E V Q L V E S G G L V K P G G S L R L
S C A A S G F T F S D Y Y M Y W F R O A
P G K G L E W V A T I S D G G S Y T Y Y
P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
L Q M S S L R A E D T A V Y Y C A R B E
N G N F Y Y F D Y W G G G T V T V S S
G G G S G G G G G G G G G G S D I Q M T
Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A
G Q D I K S Y L S W Y Q Q K P G K A P K A
L L I Y A T L A D G V P S R F S G S
G S G T D Y T L T I S S L Q P E D F A T
Y Y C L Q H G E S P W T P G G T K L E R
I K G G G G S G G G G S K P G S D K X T
H T C P P C P A P E L L R G G P S V L F
P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V
V D V S H E D P E V K F N W Y D G V E
V H H A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V
S V L T V L H Q D W L N H 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 O P
R E P O V Y T L P P S R D E L T K N Q V
S L T C L V L 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 V D K S R Y T Q K S L S L
S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L
S P G G G G S G G G G S O V Q L V O S
G A E V K K P G S S V K V S C K A S G Y
T F T T Y Y J H W V R Q A P G O G L E W
N G W I Y P G N V H A O Y N E K F K R R
V T I T A D K S T S T A Y M E L S L R
S E D T A V Y Y C A R S N R E G F Y N C
G E T T V V S C A R S N R E G F Y N C
G G G S D I Q M T Q S P S S L S A S V G
D R V T I T C K A L P A P I E K T I S K A
Q Q E P G K A P K S L I S A S Y R Y S
G V P S R S G S G S G T D F T L T I S
S L Q Q P E D F A T Y P C Q O Y D T Y P
T F G Q G T K V E I K *

【 図 4 A 】

Figure 4A

配列番号 7

1 GAGGTACAAGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCTGGAGGTCCTCGAGGCTC 60
61 TCCTGTGACGCTCTGGATTCACTTTCAGTACATTAATGATATGTTTCGACAGCC 120
121 CCGGAAAGGGCTGGAGTGGTGCACCACTTAGTGTGGTGTAGTACACTACTAT 180
161 CCAGACAGTGTGAAGGGGATTCACACTTCCAGGACAAATCCAGAGACAGCTCTAC 240
241 CTCGAGTGGACGCTGAGGGCTGAGGACACAGCTGTGTATTAATCTGCGAAGAGGAG 300
301 AATGTAACCTTTACTTACTTACTTGGGCTGAGGACAGGCTGACCGTCTCCTCA 360
361 GCCTCCAGAGGGCCATCGTCTTCCGCTGACAGCTTCCGAGACCGGTGACGTTGG 420
421 GGCAAGGCGCTGGGCTCGCTCAAGGACTTCTCCGAGACCGGTGACGTTGG 480
541 TGGACTCAGGGCCCTGACAGGCGGTGACAGCTTCCGCGTCTCTCAAGTCTCA 540
541 GACTTACTCTCCAGGAGCTGGTGGCTGCTCCCTCCAGGAGCTTGGGACCCAGCAG 600
601 TACTCTGACAGTGTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCT 660
661 AATCTTGTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGG 720
721 CCGTCACTTCTCTTCCGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGAC 780
781 GAGGTACATGCTGGTGTGGTGGAGTGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 840
901 TACTGACAGGCTGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 900
901 AGCAGTACCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 960
961 GGTACAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1020
1021 AAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 1080
1141 CTGACCAAGAACAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 1140
1141 GCCTGGAGTGGAGGCAATGGGCGAGGCAATGGGCGAGGCAATGGGCGAGGCAAT 1200
1201 TTGACTCCGAGGCT 1260
1261 CAGCAGGAGGAGGCT 1320
1321 CAGAGAGGCT 1380
1381 CTGACAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1440
1441 TGTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1500
1501 GGAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1560
1621 GACAGTGTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1620
1621 CAGTGTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 1680
1681 GGTAACTTTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACT 1740
1741 GCGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1800
1801 TCT 1860
1861 CAGGACATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTA 1920
1921 CTGATCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTAT 1980
1981 TCTGTACAGATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCT 2040
2041 TACTGTCTACAGATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAG 2100
2101 AARTGA 2106

【 図 4 B 】

Figure 4B

配列番号 8

E V Q L V E S G G L V K P G G S L R L
S C A A S G F T F S D Y Y M Y W F R O A
P G K G L E W V A T I S D G G S Y T Y Y
P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y
L Q M S S L R A E D T A V Y Y C A R B E
N G N F Y Y F D Y W G G G T V T V S S
A S T K Q P S V F P L A P S K S T S G
G T A A L 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 P P A V L Q S S
G L Y S L S S V V T V P S S L K G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P
K S C D K T H T C P P A P E L L R G C
P S V P L P P P K P K D T L M I S R T P
E V T C V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V V S V H N A K T K P R E B Q Y H
S T Y R V V S V L T V 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 V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L 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 V 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 G G G S G G G G S R
V Q L V B S G G G L V K P G G S L R L R
C A A S G F T F S D Y Y M Y W F R O A P
G K G L R W V A T I S D G G S Y T Y Y
D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L
Q M S S L R A E D T A V Y Y C A R B E N
G N F Y Y F D Y W G G G T V T V S S G
G G S Y G G G S G G G S D I Q M T Q
S P S S L S A S V G D R V T I T C K A G
Q D I K S Y L S W Y Q Q K P G K A P K L
L I Y Y A T R L A D G V P S R F S G S
S G T D Y T L T I S S L Q P E D F A T Y
Y C L Q H G E S P W T F G G G T K L E I
K *

【 図 5 A 】

Figure 5A

配列番号 9

1 GAGGTACAAGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCTGGAGGTCCTCGAGGCTC 60
61 TCCTGTGACGCTCTGGATTCACTTTCAGTACATTAATGATATGTTTCGACAGCC 120
121 CCGGAAAGGGCTGGAGTGGTGCACCACTTAGTGTGGTGTAGTACACTACTAT 180
161 CCAGACAGTGTGAAGGGGATTCACACTTCCAGGACAAATCCAGAGACAGCTCTAC 240
241 CTCGAGTGGACGCTGAGGGCTGAGGACACAGCTGTGTATTAATCTGCGAAGAGGAG 300
301 AATGTAACCTTTACTTACTTACTTGGGCTGAGGACAGGCTGACCGTCTCCTCA 360
361 GCCTCCAGAGGGCCATCGTCTTCCGCTGACAGCTTCCGAGACCGGTGACGTTGG 420
421 GGCAAGGCGCTGGGCTCGCTCAAGGACTTCTCCGAGACCGGTGACGTTGG 480
541 TGGACTCAGGGCCCTGACAGGCGGTGACAGCTTCCGCGTCTCTCAAGTCTCA 540
481 GGTACAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 540
541 GACTTACTCTCCAGGAGCTGGTGGCTGCTCCCTCCAGGAGCTTGGGACCCAGCAG 600
601 TACTCTGACAGTGTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCT 660
661 AATCTTGTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGG 720
721 CCGTCACTTCTCTTCCGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGACAGGCTGAC 780
781 GAGGTACATGCTGGTGTGGTGGAGTGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 840
901 TACTGACAGGCTGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 900
901 AGCAGTACCTGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGG 960
961 GGTACAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1020
1021 AAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 1080
1141 CTGACCAAGAACAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 1140
1141 GCCTGGAGTGGAGGCAATGGGCGAGGCAATGGGCGAGGCAATGGGCGAGGCAAT 1200
1201 TTGACTCCGAGGCT 1260
1261 CAGCAGGAGGAGGCT 1320
1321 CAGAGAGGCT 1380
1381 CTGACAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1440
1441 TGTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1500
1501 GGAAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1560
1621 GACAGTGTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1620
1621 CAGTGTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCT 1680
1681 GGTAACTTTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACTTACT 1740
1741 GCGGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAGGCTGAG 1800
1801 TCT 1860
1861 CAGGACATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTA 1920
1921 CTGATCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTAT 1980
1981 TCTGTACAGATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCT 2040
2041 TACTGTCTACAGATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAGGCTATTAAG 2100
2101 AARTGA 2106

【 図 8 】

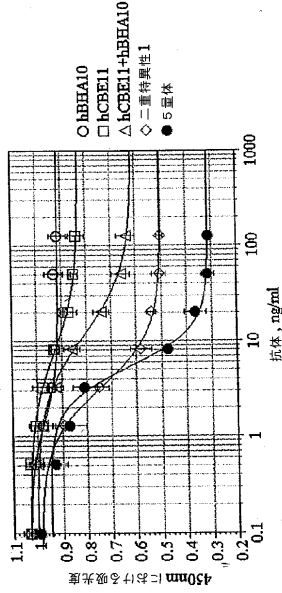


Figure 8

【 図 9 】

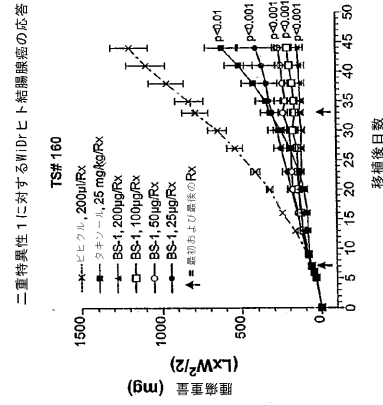


Figure 9

【 図 10 】

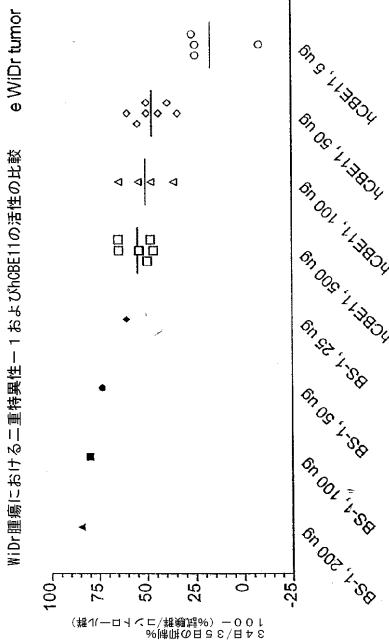


Figure 10

【 図 11 A - 1 】

Figure 11A

1 GAGGTACACTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTACTGAACCTGGAGGGTCCCTGAAACTG 60
 EVQLLVESGGGGLLVKFPGGSLKLL

61 TCCGTGCGAGCTCTGGATTCACTTTCAGTACTATTACATGATTTGGTTGGCCAGACT 120
 SC A A S G F T F S D Y Y M Y W F R Q T

121 CCGGAAAGAGGCTGGAGTGGTGCACCACTTAGTGTATGTTGTTAGTTACACTACTAT 180
 PEKRLLEWVATITISDGGGSYTTY

181 CCAGACAGTGTGAAGGGCGGATTCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACCTGTAC 240
 PDSVKGRFTISRDNAKNNLY

241 CTGCAAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGCCATCTTACTGTGTAGAGAGAG 300
 LQMSSSLKSEDTAMY Y C V R E E

301 AATGTAACITTTACTACTTTGACTACTGGGGCAAGGAGCACCGTCCCGTCTCTCA 360
 NGNFY Y F D Y W C Q G T T V T V S S

361 GCCTCCACAGGGCCCATGGTCTTCCCTGAGACCTCTCCAAGAGCAGCTCTGG 420
 ASTKGPSPYFPLAPSSKSTSG

421 GGCACAGCGCCCTGGGCTGGTGTCAAGGACTACTTCCCGAACCCTGTGACGTVTGG 480
 G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S

481 TGGACTCAGCGCCCTGACCGCGGCTGTGACACTTCCCGCTGTCTGACACTCTCA 540
 WNSGAL L T S G V H T F P A V L Q S S

541 GGACTCTACTCCCTCAGCAGCTGTGACCGTCCCTCCAGCAGCTTGGCACCCAGACC 600
 G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T

601 TACTCTGCAAGTGAATCAGACGCCAGACACCAAGGTTGGCAAGAAATGGAGCC 660
 Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P

661 AAATCTTGTGACAAAGACTCACACATGCCACCGTGCACGACTGAACTCTCGGGGA 720
 K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G

721 CCGTCACTTCTCTCTTCCCGCAAAACCCAGAGCACCCCTCATGATCTCCCGACCCCT 780
 P S V F L P P P K P K D T L M I S R T P

781 GAGGTCAATGCGTGGTGGAGCGTGGAGCCAGAGACCTGAGTCAAGTTCAACTGG 840
 E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W

841 TACGTGAGCGCGTGGAGGTGCATAATGCCAGACAAAGCCCGGGAGGAGCAGTACAC 900
 Y V D G V E V H N A K T K P R E R Q Y N

901 AGCACGTACCGTGGTGGTGGAGCGTGGAGCCAGAGACCTGAGTCAAGTTCAACTGG 960
 S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K

961 GAGTACAAGTGAAGGCTCCCAAGAGCCCTCCAGCCGCCCATCGAAGAACCATCTCC 1020
 E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S

1021 AAAGCCAAAGGCGCCCGGAGACCAAGGTTGACACCTGCGCCCATCCCGGATGAG 1080
 K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E

1081 CTGACCLAGAACCAAGTCCAGCTGACCTGGCTGTCAAGGCTCTTATCCAGCGACATC 1140
 L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I

1141 GCCGTGAGTGGAGGACAAATGGCGCCGAGAGCACTACAGACCCAGCCCTCCGCTG 1200
 A V E W R S H G Q P E N N Y K T T P P V

【 図 1 1 A - 2 】

1201 TTGGACTCCGACGGCTCCTCTCTCTCAGAGCAAGCTCACCCGAGACAGAGCGGTGG 1260
 L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W

1261 CAGCAGGGGAAAGCTCTCTCATGCTCCGIGATGATGAGGCTTGCACAACCCTACAG 1320
 Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T

1321 CAGAAGAGCCTCCTCCCTGCTACCGGGAAACCCACCTGTACACGCTGTCCTGGTCTG 1380
 Q K S L S L S T G K P T L Y N V S L V M

1381 TCCGACACAGCTGGCACCTGCTACTGA 1407 (配列番号 17)
 S D T A G T C Y * (配列番号 18)

【 図 1 1 B 】

Figure 11B

1 GATATTAAGATGACCCAGCTCCGATCCTCCATGTATGTCATCCCTGGGAGAGAGTCACT 60
 D I K M T Q S P S S M Y A S L G E R V T *

61 ATCACTTGCAGCCCGCTCAGAGATTAAGAGCTTATTAAGCTGGTACCAGCAGAAACCA 120
 I T C K A G Q D I K S Y L S W Y Q Q K F

121 TGGAAATCTCCTTAGATCCTGATCTATTATGCAACAAGGTGGCAGATGGGGTCCCATCA 180
 W K S P K I L I Y Y A T R L A D G V P S

181 AGATTCTGTGGAGTGGATCTGGGCAAGATTATCTCTAACCCATGAGCAGCCTGGACTCT 240
 R F S G S G S G Q D Y S L T I S S L E S

241 GACGATACAGCAACTTATTACTGCTACAGCATGGTGAGAGCCCGTGGACGTTGCGTGG 300
 D D T A T Y Y C L Q H G E S P W T F G G

301 GGCACCAAGCTGGAGATCAAAGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCACTCTCCGCCA 360
 G T K L E I E R T V A A P S V F I F P P

361 TCTGATGAGCAGTGGAAATCGAACTCCCTCTGTGTGTGCTGCTGAATAACTTCTAT 420
 S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y

421 CCCGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAGCCCTCCAAATCGGTAACCTCCAG 480
 F R E A R K V Q W K V D N A L Q S G N S Q

481 GAGAGTGTACAGAGCAGSACAGCAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCGACG 540
 E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T


541 CTGAGCCLAAGCAGACTACAGAAACACAAAGTCTAAGCCCTGCGAAGTACCCCTCAGGGC 600
 L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G

601 CTGAGCTCGCCCGTCAACAAGAGCTTCAACAGGGGAGGTGTAG 645 (配列番号 19)
 L S S P V T K S F N R G E C * (配列番号 20)

【 配列表 】

2006515750000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US03/41393		
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC(7) : C07K 15/06; C12N 15/12; A61K 37/02 US CL : 424/144.1; 530/387.3 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
B. FIELDS SEARCHED				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/144.1; 530/387.3				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, DIALOG, MEDLINE, EMBASE, CHEMAB				
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X --- Y	WO 94/13808 A2 (BIOGEN INC.) 23 June 1994 (23.06.94), entire document	1-21 ----- 22-33		
X --- Y	WO 96/22788 A1 (BIOGEN INC.) 01 AUGUST 1996 (01.08.96) entire document	1-21 ----- 22-33		
X	Browning et al. "Characterization of surface lymphotoxin forms. Use of monoclonal antibody and soluble receptor." Journal of Immunology, January 1995, Vol 154, No. 1, pp.33-46	1-33		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> * Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family </td> </tr> </table>			* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 23 September 2005 (23.09.2005)		Date of mailing of the international search report 18 NOV 2005		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner of Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Yunsoo Kim  Telephone No. 571-272-3176		

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00	A
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	

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

(72) 発明者 ガーバー, エレン
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8 - 1 3 5 2, ケンブリッジ, ドンネル ストリート 1 4

(72) 発明者 バイラー, ベロニーク
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 1 9, ボックスボロ, クーリッジ ファーム ロード 4 4

(72) 発明者 ブラウニング, ジェフリー エル.
 アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 3 8, ケンブリッジ, コンコード アベニュー 2 5 0

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA43 CA04 CA07 DA03 EA04 GA11 HA03
 4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 CE10 CE12 DA05 DA14
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 AA15 AA16 BB11 BB31 BB41 BB43 BB44 CC23 GG01
 GG08 GG10
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA51 DA76 EA28 EA51 FA74
 GA22 GA26