

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7696648号
(P7696648)

(45)発行日 令和7年6月23日(2025.6.23)

(24)登録日 令和7年6月13日(2025.6.13)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 14/21 (2006.01)	C 0 7 K 14/21	Z N A
C 1 2 N 15/31 (2006.01)	C 1 2 N 15/31	
請求項の数 22 (全35頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2023-543252(P2023-543252)	(73)特許権者	523113434
(86)(22)出願日	令和3年2月23日(2021.2.23)		クンミン シノウェイ ナチュラル ファ
(65)公表番号	特表2023-544457(P2023-544457 A)		ーマシューティカルズ カンパニー リミ
(43)公表日	令和5年10月23日(2023.10.23)		テッド
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/077461		中華人民共和国 6 5 0 2 1 7 コンナン
(87)国際公開番号	WO2022/068141		クンミン エコノミック アンド テクニ
(87)国際公開日	令和4年4月7日(2022.4.7)		カル ディベロプメント ゾーン インフ
審査請求日	令和5年12月8日(2023.12.8)		ォメーション インダストリー ベース
(31)優先権主張番号	202011048723.0	(74)代理人	100102978
(32)優先日	令和2年9月29日(2020.9.29)		弁理士 清水 初志
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)	(74)代理人	100160923
			弁理士 山口 裕孝
		(74)代理人	100119507
			弁理士 刑部 俊
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 ヒト化抗CD22組換え免疫毒素およびその用途

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下の2本のポリペプチド鎖を含むポリペプチド分子である、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素：

(1) SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列を含む抗CD22抗体の軽鎖可変領域(V_L)を含む第1のポリペプチド鎖；

(2) SEQ ID NO.3またはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列を含む抗CD22抗体の重鎖可変領域(V_H)と、シールドモナス外毒素Aまたは細胞毒性が保持されているシールドモナス外毒素Aの変異体もしくは断片である細胞毒とを含む第2のポリペプチド鎖であって、細胞毒のN末端が、直接またはリンカーを介して、重鎖可変領域(V_H)のC末端に融合している、第2のポリペプチド鎖。

【請求項2】

組換え免疫毒素において、第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域(V_L)と第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域(V_H)とが、共有結合的に連結されている、請求項1記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

【請求項3】

第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域(V_L)と第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域(V_H)とが、ジスルフィド結合を介して、共有結合的に連結されている、請求項1記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

【請求項4】

シュードモナス外毒素Aの変異体または断片が、PE40、PE38、PE35、PE24、mPE24、T19、T20、またはM11である、請求項1～3のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

【請求項5】

第1のポリペプチド鎖が、軽鎖可変領域(V_L)のC末端に融合した軽鎖定常領域をさらに含む、請求項1～4のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

【請求項6】

軽鎖定常領域がヒト軽鎖定常領域である、請求項5記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

【請求項7】

第2のポリペプチド鎖が重鎖可変領域(V_H)のC末端に融合した重鎖定常領域CH1をさらに含む、請求項1～6のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

【請求項8】

重鎖定常領域CH1がヒト重鎖定常領域CH1である、請求項7記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

【請求項9】

第1のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.9に示されるアミノ酸配列を含むか；または第1のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列を含み、第2のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.10に示されるアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

【請求項10】

請求項1～9のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素の第1のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列、および請求項1～9のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素の第2のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

【請求項11】

請求項10記載の核酸分子を含む、ベクター。

【請求項12】

請求項10記載の核酸分子または請求項11記載のベクターによって形質転換またはトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項13】

請求項1～9のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素を含む、組成物。

【請求項14】

CD22関連B細胞悪性腫瘍の処置のための医薬の製造における、請求項1～9のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素、請求項10記載の核酸分子、請求項11記載のベクター、請求項12記載の宿主細胞、または請求項13記載の組成物の使用。

【請求項15】

CD22関連B細胞悪性腫瘍がCD22高発現を特徴とするB細胞悪性腫瘍である、請求項14に記載の使用。

【請求項16】

CD22関連B細胞悪性腫瘍がCD22高発現を有するリンパ腫または白血病である、請求項14または15に記載の使用。

【請求項17】

リンパ腫が非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、またはマントル細胞リンパ腫であり；白血病が慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病、または急性リンパ性白血病である、請求項16に記載の使用。

【請求項18】

重鎖可変領域(V_H)と軽鎖可変領域(V_L)とを含む、ヒト化抗CD22抗体または抗体断片であって、

10

20

30

40

50

該重鎖可変領域（V_H）が、SEQ ID NO.3もしくはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列を含み、該軽鎖可変領域（V_L）が、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列を含む、ヒト化抗CD22抗体または抗体断片。

【請求項 19】

ヒト化抗CD22抗体がモノクローナル抗体である、請求項18に記載のヒト化抗CD22抗体または抗体断片。

【請求項 20】

抗体断片がFab、Fab'、F(ab')₂、scFv、またはdsFvである、請求項18または19に記載のヒト化抗CD22抗体または抗体断片。

【請求項 21】

抗体断片がdsFv断片である、請求項18～20のいずれか一項に記載のヒト化抗CD22抗体または抗体断片。

10

【請求項 22】

請求項1～9のいずれか一項記載のヒト化抗CD22組換え免疫毒素の調製における、請求項18～21のいずれか一項に記載のヒト化抗CD22抗体または抗体断片の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2020年9月29日に出願された中国特許出願第CN202011048723.0号の優先権の恩典を主張するものであり、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

20

【0002】

技術領域

本発明は、生物医学の領域に関し、具体的には、短縮型シュードモナス外毒素Aと融合したヒト化抗CD22抗体断片の組換え免疫毒素、およびその用途に関する。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

CD22 (Siglec-2) は、シアル酸 (Sia) 含有グリカンと特異的に結合し、細胞接着および/または細胞シグナル伝達を促進する、シアル酸結合免疫グロブリン様レクチン (Siglec) 受容体である [1]。CD22発現は、B細胞に限定されており、B細胞阻害の基線レベルの確立において重要な役割を果たし、従って、CD22は、体液性免疫におけるホメオスタシスの重要な決定因子である。CD22は、B細胞悪性疾患、例えば、Bリンパ芽球性白血病/リンパ腫および成熟B細胞白血病/リンパ腫の様々な割合において、腫瘍細胞に発現している [2]。CD22の発現は、ヘアリーセル白血病 (HCL) および前リンパ球性白血病において特に強くなり得る。

30

【0004】

1958年にBouroncleらによって最初に記載されたヘアリーセル白血病 (HCL) は、特徴的な鋸歯状の細胞質縁を有する成熟腫瘍性B細胞の慢性悪性疾患である [3、4]。HCLは、米国の全白血病の2%を占め (米国で年間500～800の新規症例 [5])、汎血球減少症および脾腫を特徴とする。プリン類似体 (クラドリピンまたはペントスタチン) が、HCLの初期処置のための標準治療であり、数年間続く持続的な寛解に関連している；しかしながら、多くの患者は、再発し、付加的な治療を必要とする [6]。その後の処置は、一般的に、プリン類似体の修正された計画によるが、処置の効力は低下し、患者は、より短い寛解を有し、最終的には、処置に対して抵抗性となる [7]。さらに、プリン類似体は、神経毒性に関連しており [8]、極めて免疫抑制性であるため、日和見感染のリスクが増加し得る [4]。

40

【0005】

免疫毒素は、ヘアリーセル白血病のための効果的な治療薬であることが立証されている。免疫毒素は、強力な細胞毒性ペイロード、例えば、細菌毒素 [9]、植物由来毒素 [10]、および合成化学物質 [11] を使用して、癌細胞を標的とし、死滅させる抗体コンジュゲ

50

ート治療薬である。抗CD22免疫毒素の第1世代は、1990年代後期にNational Cancer Instituteで開発され、BL22 (RFB4 (dsFv) -PE38またはCAT-3888) という名称で報告された。シュードモナス外毒素Aの38kDa断片であるシュードモナス外毒素A (PE38) と融合したマウス抗CD22抗体が利用された。CAT-3888は、第I相治験に入り、2001年に白血病の寛解を報告した^[12-16]。しかしながら、CAT-3888は、PE38および抗CD22抗体断片の修飾を含む改良された免疫毒素、モキセツモマブ・パストトックス (moxetumomab pasudotox) (HA22またはCAT-8015) に取って代わられた。HA22においては、標的分子に対する結合親和性を増加させるため、抗体断片内の3つのアミノ酸が、CAT-3888と比較して変化させられた。

【0006】

HA22は、PE38と融合したマウス抗CD22モノクローナル抗体のFv断片から構成される。機序的には、HA22のFv部分が、多様な悪性B細胞に発現している細胞表面受容体であるCD22と結合し、それによって、毒素部分PE38を腫瘍細胞に直接送達する。内部移行した後、PE38は、伸長因子2 (EF-2) のジフタミド残基のADPリボシル化を触媒し、抗アポトーシスタンパク質、骨髄細胞白血病配列 (myeloid cell leukemia) 1 (Mcl-1) のレベルの急速な低下をもたらし、アポトーシス細胞死を引き起こす^[17, 18]。HA22は、少なくとも2種の全身治療、例えば、プリンヌクレオシド類似体による処置を過去に受けたことがある、再発性または抵抗性のヘアリーセル白血病を有する成人の処置のため、2018年に米国FDAによって認可された。

【0007】

初期の免疫毒素の設計は、さらなる臨床開発を保証するのに十分な治療ウィンドウを欠き、とりわけ、固有の免疫原性および抗薬物抗体の急速な発達が、重要な要素であった^[19]。HA22に含有されるターゲティング部分、即ち、マウス抗CD22モノクローナル抗体のFv部分は、マウス由来であるため、ヒトにおいて一定の免疫原性を有し^[20]、それによって、望ましくない中和抗薬物抗体 (ADA) の生成を引き起こし、薬物動態プロファイルに悪影響を及ぼし、例えば、所定の投薬量での薬物の活性に影響を与え、インピボの薬物のクリアランスを加速し、反復投与の時間および有効性を制限する。

【発明の概要】

【0008】

前記の技術的課題を解決するため、本発明の目的は、シュードモナス外毒素Aに基づく新規の組換え免疫毒素を提供することである。組換え免疫毒素においては、元のマウス由来抗CD22モノクローナル抗体断片と比較して低下した免疫原性を有し、標的CD22に対する親和性を保持するヒト化抗CD22モノクローナル抗体断片と、シュードモナス外毒素Aとが融合しており；同時に、形成された新規の組換え免疫毒素は、CD22発現腫瘍細胞に対して、強力な免疫毒素効力、例えば、増殖阻害効果およびアポトーシス効果を有するであろう。

【0009】

本発明のさらなる目的は、新規の組換え免疫毒素の使用を提供することである。

【0010】

本発明の技術的解決手段は、以下の通りである。

【0011】

1つの局面において、本開示は、以下の2本のポリペプチド鎖を含むポリペプチド分子であるヒト化抗CD22組換え免疫毒素を提供する：

(1) 抗CD22抗体の軽鎖可変領域 (V_L) を含む第1のポリペプチド鎖であって、軽鎖可変領域 (V_L) が、SEQ ID NO.16もしくはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO.16もしくはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の配列同一性を有するそのアミノ酸配列相同体を含む、第1のポリペプチド鎖；

(2) 抗CD22抗体の重鎖可変領域 (V_H) と、重鎖可変領域 (V_H) に直接または間接的に連結された細胞毒とを含む第2のポリペプチド鎖であって、重鎖可変領域 (V_H) が、SEQ ID NO.3もしくはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO.3もしくはS

10

20

30

40

50

EQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するそのアミノ酸配列相同体を含む、第2のポリペプチド鎖。

【0012】

本明細書において使用されるように、「アミノ酸配列相同体」とは、対応するアミノ酸配列に由来するが、それと比べて、1つまたは複数のアミノ酸の置換、付加、または欠失を有するアミノ酸配列をさす。

【0013】

第1のポリペプチド鎖において、好ましくは、アミノ酸配列相同体は、SEQ ID NO.16またはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する。さらに好ましくは、アミノ酸配列相同体は、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、およびSEQ ID NO.33に示されるアミノ酸配列を含み、SEQ ID NO.14に示されるアミノ酸配列に対応する3位、5位、36位、37位、47位、48位、49位、50位、65位、67位、69位、70位、および72位にSEQ ID NO.16またはSEQ ID NO.18と同じアミノ酸残基を有するが（アミノ酸位置は、SEQ ID NO.14に示されるアミノ酸配列に従ってナンバリングされる）、SEQ ID NO.14に示されるアミノ酸配列ではない。

10

【0014】

第2のポリペプチド鎖において、好ましくは、アミノ酸配列相同体は、SEQ ID NO.3またはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する。さらに好ましくは、アミノ酸配列相同体は、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.29、およびSEQ ID NO.30に示されるアミノ酸配列を含み、SEQ ID NO.2に示されるアミノ酸配列に対応する3位、48位、49位、50位、69位、71位、73位、75位、および80位にSEQ ID NO.3またはSEQ ID NO.4と同じアミノ酸残基を有するが（アミノ酸位置は、SEQ ID NO.2に示されるアミノ酸配列に従ってナンバリングされる）、SEQ ID NO.2に示されるアミノ酸配列ではない。

20

【0015】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素において、第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域（V_L）は、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み；第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域（V_H）は、SEQ ID NO.3に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含む。

30

【0016】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素において、第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域（V_L）は、SEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み；第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域（V_H）は、SEQ ID NO.3に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含む。

【0017】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素において、第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域（V_L）は、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み；第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域（V_H）は、SEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含む。

40

【0018】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素において、第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域（V_L）と第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域（V_H）とは、例えば、ジスルフィド結合を介して、共有結合的に連結されている。

【0019】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素において、第2のポリペプチド鎖の細胞毒は、シュードモナス外毒素A、または細胞毒性が保持されているシュードモナ

50

ス外毒素Aの変異体もしくは断片である。

【0020】

天然に存在するシュードモナス外毒素A (PE) は、緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) によって分泌される細菌毒素である。それは、66kDの分子量を有する単量体タンパク質である。細胞毒性を維持しながら、毒素の非特異的結合を低下させるか、または排除するため、PE分子を修飾するか、またはその配列の一部を除去することができる。例えば、シュードモナス外毒素Aの変異体は、細胞毒性を保持する修飾型シュードモナス外毒素Aであり、その修飾は保存的修飾であり得る。例えば、変異体は、未修飾の天然PEと少なくとも75%、好ましくは、少なくとも80%、さらに好ましくは、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%のアミノ酸配列同一性を有する。また、例えば、シュードモナス外毒素Aの断片は、細胞毒性を保持するシュードモナス外毒素Aの短縮型である。好ましくは、本発明によるシュードモナス外毒素Aの変異体または断片は、例えば、PE40、PE38、PE35、PE24、mPE24、またはT19、T20、M11である〔21、22、23、24、25〕。本発明の1つの具体的な態様によると、断片は、SEQ ID NO.1に示されるアミノ酸配列を有するPE38である。

10

【0021】

好ましくは、第2のポリペプチド鎖において、細胞毒は、抗CD22抗体の重鎖可変領域 (V_H) のC末端に融合している。例えば、細胞毒のN末端が、直接またはリンカーを介して、重鎖可変領域 (V_H) のC末端に融合している。リンカーは、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素の各機能性成分の機能に影響を与えることなく、重鎖可変領域 (V_H) および細胞毒と、それぞれ、共有結合を形成することができる。適切なリンカー、例えば、直鎖状または分枝状の炭素リンカー、複素環式炭素リンカー、およびペプチドリリンカーは、当技術分野において公知である。本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素において、好ましくは、リンカーは使用されないか、またはペプチドリリンカー、即ち、連結ペプチド、例えば、1つもしくは複数の (GGGGS) アミノ酸配列を含む可動性連結ペプチドが使用される。

20

【0022】

本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素において、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖は、Fabの形態を構成してもよく、即ち、第1のポリペプチド鎖が、軽鎖可変領域 (V_L) のC末端に融合した軽鎖定常領域、好ましくは、ヒト軽鎖定常領域をさらに含むか；あるいは、第2のポリペプチド鎖が、重鎖可変領域 (V_H) のC末端に融合した重鎖定常領域CH1、好ましくは、ヒト重鎖定常領域CH1をさらに含む。

30

【0023】

本発明の1つの具体的な態様によると、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素において、第1のポリペプチド鎖は、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み、第2のポリペプチド鎖は、SEQ ID NO.9に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含む。

【0024】

あるいは、第1のポリペプチド鎖は、SEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み、第2のポリペプチド鎖は、SEQ ID NO.9に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含む。

40

【0025】

あるいは、第1のポリペプチド鎖は、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み、第2のポリペプチド鎖は、SEQ ID NO.10に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含む。

【0026】

もう1つの局面において、本開示は、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素の第1のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列、および/または本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素の第2のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子を提供する。本発明による核酸分子は、第1のポリペプチド鎖もしくは第2のポリペプチド鎖をコードする単一のヌクレオチド配列であってもよいし；または、本発明による核酸

50

分子は、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖の両方をコードする単一のヌクレオチド配列であってもよい。あるいは、本発明による核酸分子は、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖をそれぞれコードする2つのヌクレオチド配列の組み合わせであってもよい。

【0027】

さらにもう1つの局面において、本開示は、本発明による核酸分子を含むベクターを提供する。ベクターは、真核生物発現ベクター、原核生物発現ベクター、人工染色体、ファージベクター等であり得る。本発明の1つの具体的な態様によると、ベクターは、核酸分子を含む原核生物発現ベクター、例えば、発現プラスミドである。

【0028】

第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含有する本発明の1つの具体的な態様によるプラスミドのマッピングを、図3に示す。

【0029】

さらにもう1つの局面において、本開示は、宿主細胞を提供する。宿主細胞は、本発明による核酸分子および/またはベクターによって形質転換またはトランスフェクトされており、従って、保存または発現のため、本発明の核酸分子および/またはベクターを含有する。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞、例えば、細菌、または昆虫、真菌、植物、もしくは動物の細胞であり得る。本発明の1つの具体的な態様によると、宿主細胞は、原核細胞、例えば、大腸菌 (*E. coli*) 細胞である。

【0030】

本発明の開示によると、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素、核酸分子、ベクター、および/または宿主細胞は、当技術分野において公知の任意の従来の技術を利用することによって得られてよい。例えば、本発明による核酸分子またはベクターによって、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖を宿主細胞において発現させることができ、次いで、鎖の回収およびインビトロリフォールディングによって、第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域 (V_L) がジスルフィド結合を介して第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域 (V_H) に連結されたヘテロ二量体を形成させることができる。

【0031】

本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素、核酸分子、ベクター、および/または宿主細胞は、実際の必要に応じて、様々な目的のために使用するため、組成物、例えば、薬学的組成物、より具体的には、薬学的調製物に含有されていてよい。

【0032】

従って、さらなる局面において、本開示は、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素、核酸分子、ベクター、および/または宿主細胞を含む組成物も提供する。好ましくは、組成物は、薬学的に許容される賦形剤を任意で含む、薬学的組成物である。

【0033】

本開示は、B細胞表面マーカーである標的CD22、具体的には、ヒトCD22と結合することができるヒト化抗CD22組換え免疫毒素に基づく前記の主題の、以下の関連する使用をさらに提供する。

【0034】

具体的には、1つの局面において、本開示は、CD22関連B細胞悪性腫瘍の処置のための医薬の製造における、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素、核酸分子、ベクター、宿主細胞、または組成物の使用を提供する。

【0035】

好ましくは、CD22関連B細胞悪性腫瘍は、CD22高発現を特徴とするB細胞悪性腫瘍、例えば、CD22高発現を有するリンパ腫または白血病である。好ましくは、リンパ腫は、非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、またはマンツル細胞リンパ腫であり；白血病は、慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病、または急性リンパ性白血病である。

【0036】

もう1つの局面において、本開示は、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素、核酸分子、ベクタ

10

20

30

40

50

一、 および/または宿主細胞を、それを必要とする対象へ投与する工程を含む、CD22関連B細胞悪性腫瘍を処置する方法を提供する。対象は、哺乳動物、例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類、および飼育動物、家畜、または実験哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、マウス、およびウサギである。好ましくは、対象はヒトである。

【0037】

本発明によるヒト化されたV_HおよびV_Lは、別のdsFv抗体を形成してもよく、従って、さらにもう1つの局面において、本開示は、重鎖可変領域(V_H)と軽鎖可変領域(V_L)とを含む、ヒト化抗CD22抗体または抗体断片であって、重鎖可変領域(V_H)が、SEQ ID NO.3もしくはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO.3もしくはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するそのアミノ酸配列相同体を含み、軽鎖可変領域(V_L)が、SEQ ID NO.16もしくはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO.16もしくはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するそのアミノ酸配列相同体を含む、ヒト化抗CD22抗体または抗体断片を提供する。

10

【0038】

軽鎖可変領域(V_L)において、好ましくは、アミノ酸配列相同体は、SEQ ID NO.16またはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する。さらに好ましくは、アミノ酸配列相同体は、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、およびSEQ ID NO.33に示されるアミノ酸配列を含み、SEQ ID NO.14に示されるアミノ酸配列に対応する3位、5位、36位、37位、47位、48位、49位、50位、65位、67位、69位、70位、および72位にSEQ ID NO.16またはSEQ ID NO.18と同じアミノ酸残基を有するが(アミノ酸位置は、SEQ ID NO.14に示されるアミノ酸配列に従ってナンバリングされる)、SEQ ID NO.14に示されるアミノ酸配列ではない。

20

【0039】

重鎖可変領域(V_H)において、好ましくは、アミノ酸配列相同体は、SEQ ID NO.3またはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有する。さらに好ましくは、アミノ酸配列相同体は、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.29、およびSEQ ID NO.30に示されるアミノ酸配列を含み、SEQ ID NO.2に示されるアミノ酸配列に対応する3位、48位、49位、50位、69位、71位、73位、75位、および80位にSEQ ID NO.3またはSEQ ID NO.4と同じアミノ酸残基を有するが(アミノ酸位置は、SEQ ID NO.2に示されるアミノ酸配列に従ってナンバリングされる)、SEQ ID NO.2に示されるアミノ酸配列ではない。

30

【0040】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22抗体または抗体断片において、軽鎖可変領域(V_L)は、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み；重鎖可変領域(V_H)は、SEQ ID NO.3に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含む。

40

【0041】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22抗体または抗体断片において、軽鎖可変領域(V_L)は、SEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み；重鎖可変領域(V_H)は、SEQ ID NO.3に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含む。

【0042】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22抗体または抗体断片において、軽鎖可変領域(V_L)は、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配列相同体を含み；重鎖可変領域(V_H)は、SEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列またはそのアミノ酸配

50

列相同体を含む。

【0043】

好ましくは、本発明によるヒト化抗CD22抗体は、ヒトの重鎖定常領域（CH）および軽鎖定常領域（CL）をさらに含むモノクローナル抗体であり；好ましくは、モノクローナル抗体は、重鎖（HC）および軽鎖（LC）を含む。

【0044】

モノクローナル抗体の重鎖定常領域配列に依って、抗体は、IgAクラス、IgDクラス、IgEクラス、IgGクラス、またはIgMクラス、さらには、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4などのサブクラス（アイソタイプ）のものであり得る。モノクローナル抗体の軽鎖定常領域配列に依って、抗体は、 型または 型のものであり得る。

10

【0045】

好ましくは、本発明による抗体断片は、CD22を認識するか、もしくはCD22と結合する能力を保持する、モノクローナル抗体断片、好ましくは、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFv、dsFv、または任意のその他の抗体断片である。前後関係に依って、「抗体断片」は、本開示において、「抗体」と交換可能に使用され得る。

【0046】

より好ましくは、本発明による抗体断片は、モノクローナル抗体のdsFv断片、即ち、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とがジスルフィド結合を介して連結されているジスルフィド安定化Fv断片である。本発明の1つの具体的な態様によると、dsFv断片は、ジスルフィド結合を介して連結された重鎖可変領域と軽鎖可変領域とからなるヘテロ二量体である。

20

【0047】

さらにもう1つの局面において、本開示は、組換え免疫毒素の調製におけるヒト化抗CD22抗体の使用も提供する。例えば、組換え免疫毒素を調製するため、ヒト化抗CD22抗体の任意の鎖を、本発明の細胞毒に連結することができる。

【0048】

本発明は、短縮型シュードモナス外毒素Aと融合したヒト化抗CD22モノクローナル抗体断片から構成された新規ヒト化抗CD22組換え免疫毒素、具体的には、ジスルフィド結合を介して連結された重鎖可変領域と軽鎖可変領域とから構成されたヘテロ二量体であって、重鎖可変領域が短縮型シュードモナス外毒素Aと融合しているヘテロ二量体を提供する。

【0049】

ヒト化学工学前の組換え免疫毒素と比較して、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、特異的なヒト化戦略を通して得られるため、ヒトカウンターパートのものにより類似しており、従って、ヒトにおける免疫毒素のFv部分の免疫原性は、潜在的に低下している。免疫原性の低下は、臨床において使用された時、望ましくない中和抗薬物抗体（ADA）の生成を防止し、より良い薬物動態プロファイルに寄与し得る。

30

【0050】

さらに、本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、最大のヒト化を有しながら、標的CD22に対する最高の親和性および対応する生物学的活性を維持する。ヒト化学工学前の組換え免疫毒素と比較して、本発明のヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、受容体CD22に対する結合親和性、ならびにエフェクター細胞に対する細胞増殖阻害効果およびアポトーシス効果を維持する。さらに、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、工学前のものと比較可能な薬物動態および腫瘍抑制効力を示す。

40

[本発明1001]

以下の2本のポリペプチド鎖を含むポリペプチド分子である、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素：

（1）抗CD22抗体の軽鎖可変領域（VL）を含む第1のポリペプチド鎖であって、該軽鎖可変領域（VL）が、SEQ ID NO.16もしくはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO.16もしくはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の配列同一性を有するそのアミノ酸配列相同体を含む、第1のポリペプチド鎖；

（2）抗CD22抗体の重鎖可変領域（V_H）と、該重鎖可変領域（V_H）に直接または間接的

50

に連結された細胞毒とを含む第2のポリペプチド鎖であって、該重鎖可変領域 (V_H) が、SEQ ID NO.3もしくはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO.3もしくはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するそのアミノ酸配列相同体を含む、第2のポリペプチド鎖。

[本発明1002]

第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列相同体が、SEQ ID NO.16またはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し；好ましくは、該アミノ酸配列相同体が、SEQ ID NO.31、SEQ ID NO.32、およびSEQ ID NO.33に示されるアミノ酸配列を含み、SEQ ID NO.14に示されるアミノ酸配列に対応する3位、5位、36位、37位、47位、48位、49位、50位、65位、67位、69位、70位、および72位にSEQ ID NO.16またはSEQ ID NO.18と同じアミノ酸残基を有するが、SEQ ID NO.14に示されるアミノ酸配列ではなく；

好ましくは、第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列相同体が、SEQ ID NO.3またはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を有し；好ましくは、該アミノ酸配列相同体が、SEQ ID NO.28、SEQ ID NO.29、およびSEQ ID NO.30に示されるアミノ酸配列を含み、SEQ ID NO.2に示されるアミノ酸配列に対応する3位、48位、49位、50位、69位、71位、73位、75位、および80位にSEQ ID NO.3またはSEQ ID NO.4と同じアミノ酸残基を有するが、SEQ ID NO.2に示されるアミノ酸配列ではない、本発明1001のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

[本発明1003]

第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域 (V_L) が、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含み；第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域 (V_H) が、SEQ ID NO.3に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含むか；または

第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域 (V_L) が、SEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含み；第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域 (V_H) が、SEQ ID NO.3に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含むか；または

第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域 (V_L) が、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含み；第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域 (V_H) が、SEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含み；

好ましくは、組換え免疫毒素において、第1のポリペプチド鎖の軽鎖可変領域 (V_L) と第2のポリペプチド鎖の重鎖可変領域 (V_H) とが、例えば、ジスルフィド結合を介して、共有結合的に連結されており；

好ましくは、第2のポリペプチド鎖の細胞毒が、シュードモナス外毒素A、または細胞毒性が保持されているシュードモナス外毒素Aの変異体もしくは断片であり；好ましくは、シュードモナス外毒素Aの変異体または断片が、PE40、PE38、PE35、PE24、mPE24、T19、T20、またはM11である、本発明1001または1002のヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

[本発明1004]

第2のポリペプチド鎖において、細胞毒が、抗CD22抗体の重鎖可変領域 (V_H) のC末端に融合しており；

好ましくは、細胞毒のN末端が、直接またはリンカーを介して、重鎖可変領域 (V_H) のC末端に融合しており；

好ましくは、第1のポリペプチド鎖が、軽鎖可変領域 (V_L) のC末端に融合した軽鎖定常領域、好ましくは、ヒト軽鎖定常領域をさらに含むか；あるいは、第2のポリペプチド

鎖が、重鎖可変領域 (V_H) のC末端に融合した重鎖定常領域CH1、好ましくは、ヒト重鎖定常領域CH1をさらに含む、本発明1001~1003のいずれかのヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

[本発明1005]

第1のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含み、第2のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.9に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含むか；または

第1のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含み、第2のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.9に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含むか；または

第1のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.16に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含み、第2のポリペプチド鎖が、SEQ ID NO.10に示されるアミノ酸配列もしくはそのアミノ酸配列相同体を含む、本発明1001~1004のいずれかのヒト化抗CD22組換え免疫毒素。

[本発明1006]

本発明1001~1005のいずれかのヒト化抗CD22組換え免疫毒素の第1のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列、および/または本発明1001~1005のいずれかのヒト化抗CD22組換え免疫毒素の第2のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を含む、核酸分子。

[本発明1007]

本発明1006の核酸分子を含む、ベクター。

[本発明1008]

本発明1006の核酸分子または本発明1007のベクターによって形質転換またはトランスフェクトされた、宿主細胞。

[本発明1009]

本発明1001~1005のいずれかのヒト化抗CD22組換え免疫毒素を含む、組成物。

[本発明1010]

CD22関連B細胞悪性腫瘍の処置のための医薬の製造における、本発明1001~1005のいずれかのヒト化抗CD22組換え免疫毒素、本発明1006の核酸分子、本発明1007のベクター、本発明1008の宿主細胞、または本発明1009の組成物の使用であって、

好ましくは、CD22関連B細胞悪性腫瘍が、CD22高発現を特徴とするB細胞悪性腫瘍、例えば、CD22高発現を有するリンパ腫または白血病であり；より好ましくは、リンパ腫が非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、またはマントル細胞リンパ腫であり；白血病が慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病、または急性リンパ性白血病である、使用。

[本発明1011]

本発明1001~1005のいずれかのヒト化抗CD22組換え免疫毒素、本発明1006の核酸分子、本発明1007のベクター、本発明1008の宿主細胞、または本発明1009の組成物を、それを必要とする対象へ投与する工程を含む、CD22関連B細胞悪性腫瘍を処置する方法であって、

好ましくは、CD22関連B細胞悪性腫瘍が、CD22高発現を特徴とするB細胞悪性腫瘍、例えば、CD22高発現を有するリンパ腫または白血病であり；より好ましくは、リンパ腫が非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、またはマントル細胞リンパ腫であり；白血病が慢性リンパ性白血病、ヘアリーセル白血病、または急性リンパ性白血病であり；好ましくは、対象が哺乳動物、例えば、ヒトまたは非ヒト霊長類、および飼育動物、家畜、または実験哺乳動物、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマ、マウス、およびウサギであり；より好ましくは、対象がヒトである、方法。

[本発明1012]

重鎖可変領域 (V_H) と軽鎖可変領域 (V_L) とを含むヒト化抗CD22抗体または抗体断片であって、

該重鎖可変領域 (V_H) が、SEQ ID NO.3もしくはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列

10

20

30

40

50

、またはSEQ ID NO.3もしくはSEQ ID NO.4に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するそのアミノ酸配列相同体を含み、該軽鎖可変領域(V_L)が、SEQ ID NO.16もしくはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO.16もしくはSEQ ID NO.18に示されるアミノ酸配列と少なくとも75%の同一性を有するそのアミノ酸配列相同体を含む、ヒト化抗CD22抗体または抗体断片。

【図面の簡単な説明】

【0051】

添付の図面を参照しながら、本発明の態様を以下に詳細に説明する。

【0052】

【図1】本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素の模式図を示す。

10

【図2】本開示において実施されたヒト化配列の異なるバージョンのアライメント結果を示す(パネル2A: VH; パネル2B: VL)。

【図3A】本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素の発現プラスミドのマップを示す(パネル3A: 第1のポリペプチド鎖の発現プラスミド)。

【図3B】本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素の発現プラスミドのマップを示す(パネル3B: 第2のポリペプチド鎖の発現プラスミド)。

【図4】抗CD22組換え免疫毒素のPKプロファイルを示す(パネル4A: HA22; パネル4B: H1L2)。

【図5】抗CD22組換え免疫毒素の腫瘍抑制効力を示す。

【発明を実施するための形態】

20

【0053】

好ましい態様の詳細な説明

本開示において導入されるように、HA22の抗CD22部分のFv領域を、ヒトカウンターパートのFv領域により類似するよう最適化し、従って、ヒトにおける免疫毒素のFv部分の免疫原性を潜在的に低下させるため、ヒト化戦略が利用された。免疫原性の低下は、臨床において使用される時、望ましくない中和抗薬物抗体(ADA)の生成を防止し、より良い薬物動態プロファイルに寄与し得る。

【0054】

従って、本開示は、短縮型シュードモナス外毒素Aと融合したヒト化抗CD22モノクローナル抗体断片を含むヒト化抗CD22組換え免疫毒素を提供する。具体的には、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、1つのジスルフィド結合によって連結された軽鎖V領域(第1のポリペプチド鎖)と、短縮型シュードモナス外毒素Aと融合した重鎖V領域(第2のポリペプチド鎖)とから構成されたヘテロ二量体である。組換え免疫毒素の模式図は、図1に示され、図中、短縮型シュードモナス外毒素Aは、例示的に、PE38である。

30

【0055】

本発明によると、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、悪性B細胞表面上のCD22受容体と結合して、毒素部分、例えば、PE38を腫瘍細胞へ直接送達する。内部移行した後、毒素部分は、伸長因子2(EF-2)のジフタミド残基のADPリボシル化を触媒し、抗アポトーシスタンパク質、骨髓細胞白血病配列1(Mcl-1)のレベルの急速な低下をもたらし、アポトーシス細胞死を引き起こす。

40

【0056】

本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、例えば、第1のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を持つ発現プラスミドと、第2のポリペプチド鎖をコードするヌクレオチド配列を持つ発現プラスミドとを含有する増強型BL21派生株(T7 Express)において産生され得る。得られた株は、カナマイシン耐性であり、ヒト化抗CD22組換え免疫毒素の産生は、イソプロピル -d-1-チオガラクトピラノシド(IPTG)によって誘導される。産物は封入体として発現される。封入体を回収し、次いで、ヘテロ二量体が形成されるようインピットでリフォールディングすることができる。次いで、リフォールディングされたタンパク質を、疎水性相互作用クロマトグラフィ、続いて、陰イオン交換クロマトグラフィによって精製することができる。最後に、精製されたタンパク質を濃縮し、保管

50

のために調製された緩衝液に対して透析濾過することができる。

【 0 0 5 7 】

本発明によるヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、HA22のヒト化バージョンであり、従って、同一/類似の作用機序を介してCD22発現細胞と相互作用すると予想される。免疫毒素分子のCD22結合親和性、CD22発現細胞における細胞毒性、薬物動態、および腫瘍抑制効力を査定するため、インビトロおよびインビボのアッセイを設計した。研究において使用されたHA22は、組換え免疫毒素と同じ作製プロセスを使用して社内で製造された。

【 0 0 5 8 】

本開示において、本発明のヒト化抗CD22組換え免疫毒素の抗体断片とCD22受容体との間の相互作用を、インビトロ結合アッセイにおいて測定し；ヒト化抗CD22組換え免疫毒素の増殖阻害効果およびアポトーシス細胞死効果を、細胞ベースのアッセイにおいて調査した。さらに、本発明のヒト化抗CD22組換え免疫毒素の薬物動態および腫瘍抑制効力を、実施されたインビボ研究において決定した。

【 0 0 5 9 】

本開示において使用された配列は、以下の通りである。

【 0 0 6 0 】

SEQ ID NO.1 : PE38ポリペプチド配列

KASGGP EGGSLAALTA HQACHLPLET FTRHRQPRGW EQLEQCGYPV QRLVALYLAA RLSWNQVDQV
 IRNALASPGS GGD LGEAIRE QPEQARLALT LAAAESERFV RQGTGNDEAG AANGPADSGD ALLERNYPTG
 AEFLGDGGDV SFSTRGTQNW TVERLLQAGR QLEERGYVVFV GYHGTFLEAA QSIVFGGVRA RSQDLDAIWR
 GFYIAGDPAL AYGQAQDQEP DARGRIRNGA LLRVYVPRSS LPGFYRTSLT LAAPEAAGEV ERLIGHPLPL
 RLDAITGPEE EGGRLLETILG WPLAERTVVI PSAIPTDPRN VGGDLDPSSI PDKEQAISAL PDYASQPGKP
 PREDLK

【 0 0 6 1 】

SEQ ID NO.2 : HA22、VHポリペプチド配列 (HA22 V_H)

MEVQLVESGG GLVKPGGSLK LSCAASGFAP SIYDMSWVRQ TPEKCLEWVA YISSGGGTTY
 YPDTVKGRFT ISRDNAKNTL YLQMSSLKSE DTAMYYCARH SGYGTHWGVLFAYWGQGTLV TVSA

【 0 0 6 2 】

SEQ ID NO.3 : バージョン1 VHポリペプチド配列 (V_Hバージョン1)

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAP SIYDMSWVRQ APGKCLEWVA YISSGGGTTY
 YPDSVKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLKSE DTAMYYCARH SGYGTHWGVLFAYWGQGTMV TVSS

【 0 0 6 3 】

SEQ ID NO.4 : バージョン2 VHポリペプチド配列 (V_Hバージョン2)

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAP SIYDMSWVRQ TPEKCLEWVA YISSGGGTTY
 YPDSVKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLKSE DTAMYYCARH SGYGTHWGVLFAYWGQGTMV TVSS

【 0 0 6 4 】

SEQ ID NO.5 : バージョン3 VHポリペプチド配列 (V_Hバージョン3)

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAP SIYDMSWVRQ APGKCLEWVS YISSGGGTTY
 YPGSVKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLRAG DTAVYYCARH SGYGTHWGVLFAYWGQGTMV TVSS

【 0 0 6 5 】

SEQ ID NO.6 : バージョン4 VHポリペプチド配列 (V_Hバージョン4)

10

20

30

40

50

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAF SIYDMSWIRQ APGKCLEWVA YISSGGGTTY

YPGSVKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLRAG DTAVYYCARH SGYGTHWGVLFAYWGQGMV TVSS

【 0 0 6 6 】

SEQ ID NO.7 : バージョン5 VHポリペプチド配列 (VHバージョン5)

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAF SIYDMSWIRQ APGKCLEWVA YISSGGGTTY

YPGSVKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLRSE DTAVYYCARH SGYGTHWGVLFAYWGQGMV TVSS

【 0 0 6 7 】

SEQ ID NO.8 : HA22 VH-PE38ポリペプチド配列

MEVQLVESGG GLVKPGGSLK LSCAASGFAF SIYDMSWVRQ TPEKCLEWVA YISSGGGTTY

YPDTVKGRFT ISRDNKNTL YLQMSSLKSE DTAMYICARH SGYGTHWGVLFAYWGQGLV TVSAKASGGP

EGGSLAALTA HQACHLPLET FTRHRQPRGW EQLEQCGYPV QRLVALYLAA RLSWNQVDQV IRNALASPGS

GGDLGEAIRE QPEQARLALT LAAAESERFV RQGTGNDEAG AANGPADSGD ALLERNYPTG AEFLGDGGDV

SFSTRGTQNW TVERLLQHR QLEERGYVVFV GYHGTFLCAA QSIVFGGVRA RSQDLDAIWR GFYIAGDPAL

AYGYAQDQEP DARGRIRNGA LLRVYVPRSS LPGFYRTSLT LAAPEAAGEV ERLIGHPLPL RLDAITGPEE

EGGRLETILG WPLAERTVVI PSAIPTDPRN VGGDLPSSI PDKEQAISAL PDYASQPGKP PREDLK

10

20

【 0 0 6 8 】

SEQ ID NO.9 : バージョン1 VH-PE38ポリペプチド配列

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAF SIYDMSWVRQ APGKCLEWVA YISSGGGTTY

YPDVSKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLKSE DTAMYICARH SGYGTHWGVLFAYWGQGMV TVSSKASGGP

EGGSLAALTA HQACHLPLET FTRHRQPRGW EQLEQCGYPV QRLVALYLAA RLSWNQVDQV IRNALASPGS

GGDLGEAIRE QPEQARLALT LAAAESERFV RQGTGNDEAG AANGPADSGD ALLERNYPTG AEFLGDGGDV

SFSTRGTQNW TVERLLQHR QLEERGYVVFV GYHGTFLCAA QSIVFGGVRA RSQDLDAIWR GFYIAGDPAL

AYGYAQDQEP DARGRIRNGA LLRVYVPRSS LPGFYRTSLT LAAPEAAGEV ERLIGHPLPL RLDAITGPEE

EGGRLETILG WPLAERTVVI PSAIPTDPRN VGGDLPSSI PDKEQAISAL PDYASQPGKP PREDLK

30

【 0 0 6 9 】

SEQ ID NO.10 : バージョン2 VH-PE38ポリペプチド配列

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAF SIYDMSWVRQ TPEKCLEWVA YISSGGGTTY

YPDVSKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLKSE DTAMYICARH SGYGTHWGVLFAYWGQGMV TVSSKASGGP

EGGSLAALTA HQACHLPLET FTRHRQPRGW EQLEQCGYPV QRLVALYLAA RLSWNQVDQV IRNALASPGS

GGDLGEAIRE QPEQARLALT LAAAESERFV RQGTGNDEAG AANGPADSGD ALLERNYPTG AEFLGDGGDV

SFSTRGTQNW TVERLLQHR QLEERGYVVFV GYHGTFLCAA QSIVFGGVRA RSQDLDAIWR GFYIAGDPAL

AYGYAQDQEP DARGRIRNGA LLRVYVPRSS LPGFYRTSLT LAAPEAAGEV ERLIGHPLPL RLDAITGPEE

EGGRLETILG WPLAERTVVI PSAIPTDPRN VGGDLPSSI PDKEQAISAL PDYASQPGKP PREDLK

40

【 0 0 7 0 】

SEQ ID NO.11 : バージョン3 VH-PE38ポリペプチド配列

50

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAF SIYDMSWIRQ APGKCLEWVS YISSGGGTTY
 YPGSVKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLRAG DTAVYYCARH SGYGTHWGLV FAYWGQGMV TVSSKASGGP
 EGGSLAALTA HQACHLPLET FTRHRQPRGW EQLEQCGYPV QRLVALYLAA RLSWNQVDQV IRNALASPGS
 GDDLGEAIRE QPEQARLALT LAAAESERFV RQGTGNDEAG AANGPADSGD ALLERNYPTG AEFLGDGGDV
 SFSTRGTQNW TVERLLQHR QLEERGYVVFV GYHGTFLCAA QSIVFGGVRA RSQDLDAIWR GFYIAGDPAL
 AYGQAQDQEP DARGRIRNGA LLRVYVPRSS LPGFYRTSLT LAAPEAAGEV ERLIGHPLPL RLDAITGPEE
 EGGRLLETILG WPLAERTVVI PSAIPTDPRN VGGDLDPSSI PDKEQAISAL PDYASQPGKP PREDLK

10

【 0 0 7 1 】

SEQ ID NO.12 : バージョン4 VH-PE38ポリペプチド配列

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAF SIYDMSWIRQ APGKCLEWVA YISSGGGTTY
 YPGSVKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLRAG DTAVYYCARH SGYGTHWGLV FAYWGQGMV TVSSKASGGP
 EGGSLAALTA HQACHLPLET FTRHRQPRGW EQLEQCGYPV QRLVALYLAA RLSWNQVDQV IRNALASPGS
 GDDLGEAIRE QPEQARLALT LAAAESERFV RQGTGNDEAG AANGPADSGD ALLERNYPTG AEFLGDGGDV
 SFSTRGTQNW TVERLLQHR QLEERGYVVFV GYHGTFLCAA QSIVFGGVRA RSQDLDAIWR GFYIAGDPAL
 AYGQAQDQEP DARGRIRNGA LLRVYVPRSS LPGFYRTSLT LAAPEAAGEV ERLIGHPLPL RLDAITGPEE
 EGGRLLETILG WPLAERTVVI PSAIPTDPRN VGGDLDPSSI PDKEQAISAL PDYASQPGKP PREDLK

20

【 0 0 7 2 】

SEQ ID NO.13 : バージョン5 VH-PE38ポリペプチド配列

MEVQLVESGG GLVKPGGSLR LSCAASGFAF SIYDMSWIRQ APGKCLEWVA YISSGGGTTY
 YPGSVKGRFT ISRENAKNSL YLQMNSLRSE DTAVYYCARH SGYGTHWGLV FAYWGQGMV TVSSKASGGP
 EGGSLAALTA HQACHLPLET FTRHRQPRGW EQLEQCGYPV QRLVALYLAA RLSWNQVDQV IRNALASPGS
 GDDLGEAIRE QPEQARLALT LAAAESERFV RQGTGNDEAG AANGPADSGD ALLERNYPTG AEFLGDGGDV
 SFSTRGTQNW TVERLLQHR QLEERGYVVFV GYHGTFLCAA QSIVFGGVRA RSQDLDAIWR GFYIAGDPAL
 AYGQAQDQEP DARGRIRNGA LLRVYVPRSS LPGFYRTSLT LAAPEAAGEV ERLIGHPLPL RLDAITGPEE
 EGGRLLETILG WPLAERTVVI PSAIPTDPRN VGGDLDPSSI PDKEQAISAL PDYASQPGKP PREDLK

30

【 0 0 7 3 】

SEQ ID NO.14 : HA22、VLポリペプチド配列 (HA22 VL)

MDIQMTQTS SLSASLDRV TISCRASQDI SNYLNWYQQK PDGTVKLLIY YTSILHSGVP
 SRFSGSGSGT DYSLTISNLE QEDFATYFCQ QGNTLPWTFG CGTKLEIK

40

【 0 0 7 4 】

SEQ ID NO.15 : バージョン1 VLポリペプチド配列 (VLバージョン1)

MDIQMTQSPS TLSASVDRV TITCRASQDI SNYLNWYQQR PGQSVKLLIY YTSILHSGVP
 SRFSGSGSGT DYTLTISSLQ PEDFATYFCQ QGNTLPWTFG CGTKVEIK

【 0 0 7 5 】

SEQ ID NO.16 : バージョン2 VLポリペプチド配列 (VLバージョン2)

50

MDIQMTQSTS TLSASVGDRV TITCRASQDI SNYLNWYQQR PDGSVKLLIY YTSILHSGVP
 SRFSGSGSGT DYTLTISSLQ DEDFATYFCQ QGNTLPWTFG CGTKVEIK
 【 0 0 7 6 】

SEQ ID NO.17 : バージョン3 VLポリペプチド配列 (VLバージョン3)
 MDIQMTQSPS TLSASVGDRV TITCRASQDI SNYLNWFQQR PGQSPRLLIY YTSILHSGVP
 SRFSGSGSGT DYTLTISSLQ PEDFATYYCQ QGNTLPWTFG CGTKVEIK

【 0 0 7 7 】

SEQ ID NO.18 : バージョン4 VLポリペプチド配列 (VLバージョン4) 10
 MDIQMTQSPS TLSASVGDRV TITCRASQDI SNYLNWFQQR PGQSPRLLIY YTSILHSGVP
 SRFSGSGSGT DYTLTISSLQ PEDFATYYCQ QGNTLPWTFG CGTKVEIK

【 0 0 7 8 】

SEQ ID NO.19 : バージョン1 VH-PE38 DNA配列
 ATGGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCCGGCGGAGGCCCTGGTCAAGCCCGGCGGCTCTCTGAGACTGTCTGCGC
 TGCTTCTGGCTTCGCCTTCTCCATCTACGACATGTCTGGGTCAGACAGGCCCTGGCAAGTGCCTGGAAT
 GGGTGGCCTACATCTCCTCTGGCGGAGGCACCACCTACTACCCTGACTCCGTGAAGGGCAGATTCACCATC
 TCTAGAGAGAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAGTCCGAGGACACCGCCATGTA 20
 CTACTGCGCCAGACACTCCGGCTACGGCACACACTGGGGCGTGCTGTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACCA
 TGGTGACCGTGTCCCTCCAAAGCGTCAGGCGGTCCGGAAGGCGGTTCGCTGGCAGCTCTGACCGCACATCAG
 GCATGCCACCTGCCGTGAAAACCTTTACCCGCCATCGTCAACCGCGCGGCTGGGAACAGCTGGAACAATG
 TGGTTATCCGGTGCAGCGCCTGGTTGCCCTGTACCTGGCCGCACGTCTGAGCTGGAACCAGGTTGATCAAG
 TCATTCGTAATGCGCTGGCATCACCGGGCTCGGGCGGTGACCTGGGTGAAGCAATCCGCGAACAGCCGGAA
 CAAGCGCGCCTGGCCCTGACCCTGGCAGCTGCGGAATCCGAACGCTTTGTGCGTCAGGGCACCGGTAATGA 30
 TGAAGCCGGTGCAGCAAATGGTCCGGCTGATTCAGGTGACGCGCTGCTGGAACGCAACTATCCGACGGGCG
 CCGAATTTCTGGGTGATGGCGGTGACGTGAGTTTCTCCACCCGCGGCACGCAGAATTGGACCGTTGAACGT
 CTGCTGCAGGCGCATCGCCAACTGGAAGAACGTGGTTATGTTTTTGTGCGCTATCATGGCACCTTTCTGGA
 AGCTGCGCAGTCGATTGTCTTTGGCGGTGTGCGTGACGCAGCCAGGATCTGGATGCAATTTGGCGCGGCT
 TCTACATCGCAGGTGATCCGGCTCTGGCGTATGGCTACGCTCAGGATCAAGAACCGGATGCGCGTGGCCGC
 ATCCGTAATGGTGCCTGCTGCGTGTGTATGTTCCGCGTTCATCGCTGCCGGGTTTTTACCGTACCTCTCT
 GACCCTGGCGGCACCGGAAGCTGCCGGCGAAGTGGAACGCCTGATTGGTCAACCGCTGCCGCTGCGTCTGG 40
 ATGCAATCACCGGTCCGGAAGAAGAAGGCGGCCGTCTGGAACGATTCCTGGGTTGGCCGCTGGCCGAACGT
 ACCGTGGTTATTCCGAGCGCAATCCCGACGGACCCGCGCAATGTTGGCGGTGATCTGGACCCGAGCTCTAT
 TCCGGATAAAGAACAGGCCATCTCCGCACTGCCGACTATGCGTCACAACCGGGCAAACCGCCGCGTGAAG
 ACCTGAAA

【 0 0 7 9 】

SEQ ID NO.20 : バージョン2 VH-PE38 DNA配列 50

ATGGAAGTGCAGCTGGTGGAAATCCGGCGGAGGCCCTGGTCAAGCCC GGCGGCTCTCTGAGACTGTCCTGCGC
TGCTTCTGGCTTCGCCTTCTCCATCTACGACATGTCCTGGGTGACAGACAGACCCCTGAAAAGTGCCTGGAAT
GGGTGGCCTACATCTCCTCTGGCGGAGGCACCACCTACTACCCTGACTCCGTGAAGGGCAGATTACCCATC
TCTAGAGAGAAACGCCAAGAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAAGTCCGAGGACACCGCCATGTA
CTACTGCGCCAGACACTCCGGCTACGGCACACACTGGGGCGTGCTGTTGCTTACTGGGGCCAGGGCACCA
TGGTGACCGTGTCC TCCAAAGCGTCAGGCGGTCCGGAAGGCGGTTGCTGGCAGCTCTGACCGCACATCAG
GCATGCCACCTGCCGTGAAAACCTTTACCCGCCATCGTCAACCGCGCGGCTGGGAACAGCTGGAACAATG
TGGTTATCCGGTGCAGCGCCTGGTTGCCCTGTACCTGGCCGACGCTCTGAGCTGGAACCAGGTTGATCAAG
TCATTTCGTAATGCGCTGGCATCACCGGGCTCGGGCGGTGACCTGGGTGAAGCAATCCGCGAACAGCCGGAA
CAAGCGCGCCTGGCCCTGACCCTGGCAGCTGCGGAATCCGAACGCTTTGTGCGTCAGGGCACCGGTAATGA
TGAAGCCGGTGCAGCAAATGGTCCGGCTGATTCAGGTGACGCGCTGCTGGAACGCAACTATCCGACGGGCG
CCGAATTTCTGGGTGATGGCGGTGACGTGAGTTTCTCCACCCGCGGCACGCAGAATTGGACCGTTGAACGT
CTGCTGCAGGCGCATCGCCAACTGGAAGAACGTGGTTATGTTTTTGTGCGCTATCATGGCACCTTTCTGGA
AGCTGCGCAGTCGATTGTCTTTGGCGGTGTGCGTGACGCAGCCAGGATCTGGATGCAATTTGGCGCGGCT
TCTACATCGCAGGTGATCCGGCTCTGGCGTATGGCTACGCTCAGGATCAAGAACCGGATGCGCGTGGCCGC
ATCCGTAATGGTGCCCTGCTGCGTGTGTATGTTCCGCGTTCATCGCTGCCGGGTTTTTACCGTACCTCTCT
GACCCTGGCGGCACCGGAAGCTGCCGGCGAAGTGGAAACGCTGATTGGTCAACCGCTGCCGCTGCGTCTGG
ATGCAATCACCGGTCCGGAAGAAGAAGGCGGCCGTCTGAAAACGATTCTGGGTGGCCGCTGGCCGAACGT
ACCGTGGTTATTCCGAGCGCAATCCCGACGGACCCGCGCAATGTTGGCGGTGATCTGGACCCGAGCTCTAT
TCCGGATAAAGAACAGGCCATCTCCGCACTGCCGGACTATGCGTCACAACCGGGCAAACCGCCGCGTGAAG
ACCTGAAA

10

20

30

【 0 0 8 0 】

SEQ ID NO.21 : バージョン3 VH-PE38 DNA配列

40

50

ATGGAAGTGCAGCTGGTTGAAAAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAACCGGGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGC
GGCGAGCGGTTTCGCGTTTAGCATCTACGACATGAGCTGGATTCTGCAAGCGCCGGGCAAATGCCCTGGAGT
GGGTGAGCTATATCAGCAGCGGCGGTGGCACCACCTACTATCCGGGTAGCGTTAAGGGCCGTTTCACCATT
AGCCGTGAAAAACGCGAAAAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCGGGTGATACCGCTGTGTA
CTATTGCGCGCGTCACAGCGGTTACGGCACCCACTGGGGCGTCTGTTTGCGTATTGGGGTCAAGGCACCA
TGGTGACCGTTAGCAGCAAAGCGTCAGGCGGTCCGGAAGGCGGTTGCTGGCAGCTCTGACCGCACATCAG
GCATGCCACCTGCCGTGGAAAACCTTTACCCGCCATCGTCAACCGCGCGGCTGGGAACAGCTGGAACAATG
TGGTTATCCGGTGCAGCGCTGGTTGCCCTGTACCTGGCCGCACGTCTGAGCTGGAACCAGGTTGATCAAG
TCATTTCGTAATGCGCTGGCATCACCGGGCTCGGGCGGTGACCTGGGTGAAGCAATCCGCGAACAGCCGGAA
CAAGCGCGCCTGGCCCTGACCCTGGCAGCTGCGGAATCCGAACGCTTTGTGCGTCAGGGCACCGGTAATGA
TGAAGCCGGTGCAGCAAATGGTCCGGCTGATTCAAGTGACGCGCTGCTGGAACGCAACTATCCGACGGGCG
CCGAATTTCTGGGTGATGGCGGTGACGTGAGTTTCTCCACCCGCGGCACGCAGAATTGGACCGTTGAACGT
CTGCTGCAGGCGCATCGCCAACTGGAAGAACGTGGTTATGTTTTTGTGCGCTATCATGGCACCTTTCTGGA
AGCTGCGCAGTCGATTGTCTTTGGCGGTGTGCGTGACGCAGCCAGGATCTGGATGCAATTTGGCGCGGCT
TCTACATCGCAGGTGATCCGGCTCTGGCGTATGGCTACGCTCAGGATCAAGAACCGGATGCGCGTGGCCGC
ATCCGTAATGGTGCCCTGCTGCGTGTGTATGTTCCGCGTTCATCGCTGCCGGGTTTTTACCGTACCTCTCT
GACCCTGGCGGCACCGGAAGCTGCCGGCGAAGTGAACGCCTGATTGGTCACCCGCTGCCGCTGCGTCTGG
ATGCAATCACCGGTCCGGAAGAAGAAGGCGGCCGTCTGGAACGATTCTGGGTTGGCCGCTGGCCGAACGT
ACCGTGGTTATTCCGAGCGCAATCCCGACGGACCCGCGCAATGTTGGCGGTGATCTGGACCCGAGCTCTAT
TCCGGATAAAGAACAGGCCATCTCCGCACTGCCGGACTATGCGTCACAACCGGGCAAACCGCCGCGTGAAG
ACCTGAAA

10

20

30

【 0 0 8 1 】

SEQ ID NO.22 : バージョン4 VH-PE38 DNA配列

40

50

ATGGAAGTGCAGCTGGTTGAAAGCGGTGGCGGTCTGGTGAAACCGGGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGC
GGCGAGCGGTTTCGCGTTTAGCATCTACGACATGAGCTGGATTCTGCAAGCGCCGGGCAAATGCCTGGAGT
GGGTGGCGTATATCAGCAGCGGCGGTGGCACCACCTACTATCCGGGTAGCGTTAAGGGCCGTTTCACCATT
AGCCGTGAAAAACGCGAAAAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGTGCGGGTGATACCGCTGTGTA
CTATTGCGCGCGTCACAGCGGTTACGGCACCCACTGGGGCGTCTGTTTTCGTATTGGGGTCAAGGCACCA
TGGTGACCGTTAGCAGCAAAGCGTCAGGCGGTCCGGAAGGCGGTTTCGCTGGCAGCTCTGACCGCACATCAG
GCATGCCACCTGCCGTGAAAACCTTTACCCGCCATCGTCAACCGCGCGGCTGGGAACAGCTGGAACAATG
TGGTTATCCGGTGCAGCGCCTGGTTGCCCTGTACCTGGCCGCACGTCTGAGCTGGAACCAGGTTGATCAAG
TCATTTCGTAATGCGCTGGCATCACCGGGCTCGGGCGGTGACCTGGGTGAAGCAATCCGCGAACAGCCGGAA
CAAGCGCGCCTGGCCCTGACCCTGGCAGCTGCGGAATCCGAACGCTTTGTGCGTCAGGGCACCGGTAATGA
TGAAGCCGGTGCAGCAAATGGTCCGGCTGATTCAGGTGACGCGCTGCTGGAACGCAACTATCCGACGGGCG
CCGAATTTCTGGGTGATGGCGGTGACGTGAGTTTCTCCACCCGCGGCACGCAGAATTGGACCGTTGAACGT
CTGCTGCAGGCGCATCGCCAACTGGAAGAACGTGGTTATGTTTTTGTGCGCTATCATGGCACCTTTCTGGA
AGCTGCGCAGTCGATTGTCTTTGGCGGTGTGCGTGACGCAGCCAGGATCTGGATGCAATTTGGCGCGGCT
TCTACATCGCAGGTGATCCGGCTCTGGCGTATGGCTACGCTCAGGATCAAGAACCGGATGCGCGTGGCCGC
ATCCGTAATGGTGCCCTGCTGCGTGTGTATGTTCCGCGTTCATCGCTGCCGGGTTTTTACCGTACCTCTCT
GACCCTGGCGGCACCGGAAGCTGCCGGCGAAGTGAACGCCTGATTGGTCACCCGCTGCCGCTGCGTCTGG
ATGCAATCACCGGTCCGGAAGAAGAAGGCGGCCGTCTGAAAACGATTCTGGGTGGCCGCTGGCCGAACGT
ACCGTGGTTATTCCGAGCGCAATCCCGACGGACCCGCGCAATGTTGGCGGTGATCTGGACCCGAGCTCTAT
TCCGGATAAAGAACAGGCCATCTCCGCACTGCCGGACTATGCGTCACAACCGGGCAAACCGCCGCGTGAAG
ACCTGAAA

10

20

30

【 0 0 8 2 】

SEQ ID NO.23 : バージョン5 VH-PE38 DNA配列

40

50

ATGGAAGTGCAGCTGGTTGAAAAGCGGTGGCGGTCTGGTCAAACCGGGCGGTAGCCTGCGTCTGAGCTGCGC
 GCGAGCGGTTTCGCGTTTAGCATCTACGACATGAGCTGGATTTCGTCAGCGCCGGGCAAATGCCCTGGAGT
 GGGTGGCGTATATCAGCAGCGGCGGTGGCACCACCTACTATCCGGGTAGCGTTAAGGGCCGTTTCACCATT
 AGCCGTGAAAAACGCGAAAAACAGCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGCGTTCTGAGGATACCGCTGTGTA
 CTATTGCGCGCGTCACAGCGGTTACGGCACCCACTGGGGCGTCTGTTTGCCTATTGGGGTCAAGGCACCA
 TGGTGACCGTTAGCAGCAAAGCGTCAGGCGGTCCGGAAGGCGGTTTCGCTGGCAGCTCTGACCGCACATCAG
 GCATGCCACCTGCCGTGAAAACCTTTACCCGCCATCGTCAACCGCGCGGCTGGGAACAGCTGGAACAATG
 TGGTTATCCGGTGCAGCGCCTGGTTGCCCTGTACCTGGCCGCACGTCTGAGCTGGAACCAGGTTGATCAAG
 TCATTTCGTAATGCGCTGGCATCACCGGGCTCGGGCGGTGACCTGGGTGAAGCAATCCGCGAACAGCCGGAA
 CAAGCGCGCCTGGCCCTGACCCTGGCAGCTGCGGAATCCGAACGCTTTGTGCGTCAGGGCACCGGTAATGA
 TGAAGCCGGTGCAGCAAATGGTCCGGCTGATTCAGGTGACGCGCTGCTGGAACGCAACTATCCGACGGGCG
 CCGAATTTCTGGGTGATGGCGGTGACGTGAGTTTCTCCACCCGCGGCACGCAGAATTGGACCGTTGAACGT
 CTGCTGCAGGCGCATCGCCAACTGGAAGAACGTGGTTATGTTTTGTGCGCTATCATGGCACCTTTCTGGA
 AGCTGCGCAGTCGATTGTCTTTGGCGGTGTGCGTGCACGCAGCCAGGATCTGGATGCAATTTGGCGCGGCT
 TCTACATCGCAGGTGATCCGGCTCTGGCGTATGGCTACGCTCAGGATCAAGAACCGGATGCGCGTGGCCGC
 ATCCGTAATGGTGCCTGCTGCGTGTGTATGTTCCGCGTTCATCGCTGCCGGGTTTTTACCGTACCTCTCT
 GACCCTGGCGGCACCGGAAGCTGCCGGCGAAGTGAACGCCTGATTGGTCAACCGCTGCCGCTGCGTCTGG
 ATGCAATCACCGGTCCGGAAGAAGAAGGCGGCCGTCTGGAACGATTCGGGTTGGCCGCTGGCCGAACGT
 ACCGTGGTTATTCCGAGCGCAATCCCGACGGACCCGCGCAATGTTGGCGGTGATCTGGACCCGAGCTCTAT
 TCCGGATAAAGAACAGGCCATCTCCGCACTGCCGACTATGCGTCACAACCGGGCAAACCGCCGCGTGAAG
 ACCTGAAA

10

20

30

【 0 0 8 3 】

SEQ ID NO.24 : バージョン1 VL DNA配列

ATGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCTACACTGTCTGCTTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG
 CAGAGCCTCTCAGGACATCTCCAACCTACCTGAACTGGTACCAGCAGAGACCTGGCCAGTCCGTGAAGCTGC
 TGATCTACTACACCTCCATCCTGCACTCCGGCGTGCCTTCCAGATTCTCCGGCTCTGGATCTGGCACCGAC
 TACACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCCT
 GCCTTGGACCTTCGGCTGCGGCACCAAGGTGGAAATCAAG

40

【 0 0 8 4 】

SEQ ID NO.25 : バージョン2 VL DNA配列

50

ATGGACATCCAGATGACCCAGTCTACTTCTACACTGTCTGCTTCTGTGGGCGACAGAGTGACCATCACCTG
 CAGAGCCTCTCAGGACATCTCCAACCTGAACTGGTACCAGCAGAGACCTGATGGCTCCGTGAAGCTGC
 TGATCTACTACACCTCCATCCTGCACTCCGGCGTGCCTTCCAGATTCTCCGGCTCTGGATCTGGCACCGAC
 TACACCCTGACCATCTCCTCCCTGCAGGATGAGGACTTCGCCACCTACTTCTGCCAGCAGGGCAACACCCT
 GCCTTGGACCTTCGGCTGCGGCACCAAGGTGAAAATCAAG

【 0 0 8 5 】

SEQ ID NO.26 : バージョン3 VL DNA配列

10

ATGGACATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCACCCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTACCATCACCTG
 CCGTGCAGGCCAGGATATTAGCAACTACCTGAACTGGTTTCAACAACGTCCGGGTCAAAGCCCGCGTCGTC
 TGATCTACTATAACCAGCATTCTGCACAGCGGTGTGCCGAGCCGTTTTAGCGGTAGCGGCAGCGGTACCGAC
 TATACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTTCCGCGACCTACTATTGCCAGCAGGGTAACACCCT
 GCCGTGGACCTTTGGCTGCGGTACCAAGGTTGAAAATTA

【 0 0 8 6 】

SEQ ID NO.27 : バージョン3 VL DNA配列

20

ATGGACATCCAGATGACCCAGAGCCCGAGCACCCCTGAGCGGAGCGTGGGCGACCGTGTACCATCACCTG
 CCGTGCAGGCCAGGATATTAGCAACTACCTGAACTGGTTTCAACAACGTCCGGGTCAAAGCCCGCGTctgC
 TGATCTACTATAACCAGCATTCTGCACAGCGGTGTGCCGAGCCGTTTTAGCGGTAGCGGCAGCGGTACCGAC
 TATACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCGGAGGATTTCCGCGACCTACTATTGCCAGCAGGGTAACACCCT
 GCCGTGGACCTTTGGCTGCGGTACCAAGGTTGAAAATTA

【 0 0 8 7 】

SEQ ID NO.28 : HA22、H-CDR1

30

GFAFSIYD

【 0 0 8 8 】

SEQ ID NO.29 : HA22、H-CDR2

ISSGGGTTY

【 0 0 8 9 】

SEQ ID NO.30 : HA22、H-CDR3

CARHSGYGTHWGVLFAY

【 0 0 9 0 】

SEQ ID NO.31 : HA22、L-CDR1

QDISNY

40

【 0 0 9 1 】

SEQ ID NO.32 : HA22、L-CDR2

YTSILHSG

【 0 0 9 2 】

SEQ ID NO.33 : HA22、L-CDR3

QQGNTLP

【 実施例 】

【 0 0 9 3 】

以下に、具体的な実施例を参照しながら、本発明を説明する。これらの実施例は、本発明を例示するものに過ぎず、本発明の範囲を限定するものでは決してないことが、当業者

50

には理解されるであろう。

【0094】

以下の実施例における実験手順は、特に断らない限り、全て、従来のものである。以下の実施例において使用された原材料および試薬は、特に断らない限り、全て、市販品である。

【0095】

実施例1：ヒト化設計

重鎖可変領域（V_H、SEQ ID NO.2）および軽鎖可変領域（V_L、SEQ ID NO.14）のフレームワーク領域のアミノ酸を、元のマウスのもからヒトのものへ改変するため、フレームワークシャフリング戦略を使用した。KabatおよびChothiaの両方のナンバリング系ならびにオンラインツール（<http://www.bioinf.org.uk/abs/>）を使用して決定されたCDRは、全て、不変のままとした。HA22のVHおよびVLの両方におけるフレームワーク領域およびJ領域の各々を、最も近いヒト抗体マッチのため、international ImMunoGeneTics information system（登録商標）（IMGT：<http://www.imgt.org>）のヒト抗体生殖系列配列と整列化した。バーニア（Vernier）残基またはVH/VL相互作用にとって重要であると見なされたマウス残基は、CD22に対する特異性および親和性を保存するため、変化させなかった^[26]。

【0096】

最適な親和性および効力プロファイルを維持しながら最大のヒト化を保有する最終候補を選択するため、ヒト化設計のパネルを準備し、評価した。改良されたVHおよびVLは、シュドモナス外毒素A（PE38、SEQ ID NO.1）と融合した、抗CD22抗体のジスルフィドで連結されたFv部分を形成した（図1）。

【0097】

アライメントは、ヒト生殖系列配列、IGHV3-15*01のフレームワーク1、IGHV3-11*04のフレームワーク2、IGHV3-13*01のフレームワーク3、およびIGHJ3*02のフレームワーク4の組み合わせが、HA22のVHのフレームワークに最もよく類似したヒト化フレームワークを提供し；同様に、IGKV1-5*01のフレームワーク1、IGKV2D-30*01のフレームワーク2、IGKV1D-43*01のフレームワーク3、およびIGKJ1*01のフレームワーク4の組み合わせが、HA22のVLのフレームワークに最もよく類似したヒト化フレームワークを提供することを明らかにした。バーニア残基は、それらが抗原結合にとって重要であることを示すため、数回のイテレーションの後に元のマウス残基に復帰させられた。

【0098】

図2に提供される配列アライメントは、ヒト化プロセスの例を示す。アライメント中、HA22VHおよびHA22VLは、HA22において使用されたFv断片である。バージョン3（V3）は、VHおよびVLの完全ヒト化バージョンである。バージョン1、2、4、および5（V1、V2、V4、およびV5）は、失われた活性を回復するため、重要な残基がマウスの残基に復帰させられた設計の異なるバージョンである。影付きの残基は、バーニア残基である。下線が引かれた残基は、IMGT基準に基づくCDR内である。

【0099】

実施例2：ヒト化抗CD22組換え免疫毒素の作製

異なるVLヒト化バージョン（第1のポリペプチド鎖）を発現することができる発現プラスミドを構築した。さらに、PE38をコードするヌクレオチド配列の5'末端を、それぞれ、異なるVHヒト化バージョンの各々をコードするヌクレオチド配列の3'末端に連結して、単一のヌクレオチド鎖を形成させ、それによって、第2のポリペプチド鎖を発現することができる発現プラスミドを構築した。模式図を図3に示す（設計に従ってGenscriptによって合成され、構築された）。

【0100】

本開示において提供されるヒト化抗CD22組換え免疫毒素は、第1および第2のポリペプチド鎖の発現プラスミドを使用して、増強型BL21派生株（T7 Express）において産生された。

10

20

30

40

50

【 0 1 0 1 】

1.発酵

第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖の種培養物を、1L当たり30gのソイトン (soytone)、30gの酵母エキス、40gのグリセロール、2gのNH₄Cl、2gの(NH₄)₂SO₄、0.973gのMgSO₄、3gのグルコース、および1gのNaClを含有する発酵培地において、それぞれ調製した。種培養物を、37℃、250RPMで12~16時間インキュベートした。第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖についての発酵ランを、New Brunswick BioFlo 3000発酵槽を使用して実施した。発酵槽に、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖のそれぞれの種を2%で播種した。pHは、6.9に設定され、アンモニア (NH₃・H₂O) の添加によって、ラン中、制御された。溶存酸素 (DO) は、30%に設定され、攪拌、通気、および酸素補足によって制御された。容器圧力は、2psiに設定された。細胞密度 (OD₆₀₀) およびグルコース濃度は、pH、DO、および温度と共に、ラン中、1時間毎にモニタリングされた。接種の4時間後、OD₆₀₀ 8~9で、培地中のグルコースが枯渇し、付加的なグルコースを発酵槽に供給した。グルコース供給は1時間続けられ、全体積は最初の培地体積の1.7%であった。付加的なグルコースは、接種の約5.5時間後に消費された。次いで、誘導/発現相を開始させるため、0.1%体積の1M IPTGを添加した。誘導期には、pHを徐々に7.0まで上昇させた。誘導の3時間後、培地を除去するための8,000×g、4分間の遠心分離によって、細胞を採集した。細胞ペーストは、処理前に-80℃で保管された。

10

【 0 1 0 2 】

2.回収およびリフォールディング

高圧ホモジナイザーを使用して細胞を破碎することによって、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖の封入体を単離した。次いで、封入体を含有する溶解物ペレットを、細胞片および可溶性不純物を除去するための遠心分離および界面活性剤によるいくつかの洗浄工程を通して精製した。

20

【 0 1 0 3 】

全てのシステインを還元状態に維持し、調製中に形成されたジスルフィド結合を切断するため、強力な変性剤 (8M尿素) および還元剤 (10mM DTT) を含有する可溶化緩衝液 (50mMエタノールアミン、8M尿素、0.5Mアルギニン、2mM EDTA、10mM DTT、pH 9.3) に、洗浄された封入体を再懸濁させた。可溶化は、2時間を超える可溶化プロセスを促進するため、攪拌しながら2~8分間で実施した。可溶化後、残存する凝集物および不溶性不純物を除去するため、封入体溶液を13,000×gで30分間遠心分離し、可溶化された封入体を含有する上清を濾過した。

30

【 0 1 0 4 】

全タンパク質濃度を、A280の読み取りに基づき決定し、第1のポリペプチド鎖および第2のポリペプチド鎖のパーセンテージを、SDS-PAGEゲルの濃度測定分析によって推定した。次いで、第1のポリペプチド鎖と第2のポリペプチド鎖とを1:1のモル比で混合し、可溶化緩衝液で10mg/mLに希釈し、リフォールディング緩衝液 (50mMエタノールアミン、0.5Mアルギニン、2mM EDTA、0.9 mM酸化型グルタチオン、pH 9.4) に1:10の比率で24時間継続的に供給し、2~8分間でさらに48~72時間インキュベートした。pHをおよそ7.40に調整することによって、リフォールディング反応を止めた。次いで、リフォールディングされたタンパク質を濃縮し、タンジェンシャルフロー濾過によるカラム精製のために調製した。

40

【 0 1 0 5 】

3.フェニルHP疎水性相互作用クロマトグラフィ

ベンチ高さ17cmのクロマトグラフィカラム (GE Healthcare、Marlborough、MA USA) において、フェニルHP疎水性相互作用クロマトグラフィを実施した。全てのランを、GE Healthcare (Marlborough、MA USA) のAKTA avant液体クロマトグラフィ系を使用して実施し、カラムを95cm/hrで稼働させた。カラムを、20mM Tris-HCl、0.6M Na₂SO₄、pH 7.4で平衡化した。1重量部のタンパク質溶液を、1部の20mM Tris-HCl、

50

1.2 M Na₂SO₄、pH 7.4で希釈することによって、負荷液を調製した。負荷後、カラムを平衡化緩衝液によって洗浄し、次いで、0.6Mから0MまでのNa₂SO₄の直線勾配で16カラム体積にわたって溶出させた。生成物ピークを画分中に収集した。

【0106】

4. POROS HQ陰イオン交換クロマトグラフィ

30cmのベッド高さに充填されたクロマトグラフィカラム (Thermo Scientific、Waltham、MA USA) において、POROS HQ陰イオン交換クロマトグラフィを実施した。全てのランを、GE HealthcareのAKTA avant液体クロマトグラフィ系を使用して実施し、カラムを275cm/hrで稼働させた。カラムを、20mM Tris-HCl、pH 7.4で平衡化し、タンパク質を負荷し、次いで、平衡化緩衝液によって洗浄した。カラムを、0Mから0.5MまでのNaClの直線勾配で25カラム体積にわたって溶出させた。生成物ピークのリーディング側およびテーリング側における5mAUの吸光度基準に基づき、生成物ピークを収集した。

10

【0107】

5. Capto Q陰イオン交換クロマトグラフィ

10cmのベッド高さに充填されたクロマトグラフィカラム (GE Healthcare、Marlborough、MA USA) において、フロースルーモードで、Capto Q陰イオン交換クロマトグラフィを実施した。全てのランを、GE HealthcareのAKTA avant液体クロマトグラフィ系を使用して実施し、カラムを250~350cm/hrで稼働させた。カラムを20mM Tris-HCl、250mM NaCl、pH 7.4で平衡化し、タンパク質を負荷し、次いで、平衡化緩衝液によって洗浄した。生成物フロースルーピークのリーディング側およびテーリング側における5mAUの吸光度基準に基づき、生成物ピークを収集した。

20

【0108】

実施例3：ヒト化抗CD22組換え免疫毒素の非臨床薬理学

実施例2に記載されるように、本開示において提供されるVHおよびVLの種々のヒト化バージョン、ならびにHA22のVHおよびVLによって、種々の組換え免疫毒素を調製し、フォーマット「HmLn」(mおよびnは、VHおよびVLのヒト化バージョンの番号である)に従って命名した。

【0109】

3.1 標的相互作用

本開示において提供されるヒト化抗CD22組換え免疫毒素またはHA22分子を捕捉する固定化抗原としての組換えヒトSiglec-2/CD22 Fcキメラタンパク質 (R&D systems、カタログ番号1968-SL)、および検出のための酵素コンジュゲートを含有する二次抗体としての抗シュードモナス外毒素A抗体 (Sigma-Aldrich、カタログ番号P2318) によって、ELISAを実施した。

30

【0110】

本開示において提供される組換え免疫毒素またはHA22分子のK_D測定のため、ビオチン化CD22とコンジュゲートされたストレプトアビジン (SA) バイオセンサー (ForteBio、カタログ番号18-5019) によって、オクテット (Octet) アッセイを実施した。

【0111】

表1に示されるように、(V_Hバージョン1 + V_Lバージョン2を含有する) 組換え免疫毒素H1L2および (V_Hバージョン2 + V_Lバージョン2を含有する) H2L2は、HA22と比較可能なEC₅₀およびK_Dを示した。

40

【0112】

(表1) CD22結合アッセイ結果

試料	EC ₅₀ (ELISA)	KD (Octet)
HA22	0.47 ± 0.48 nM	4.08 - 5.81 nM
H1L2	0.54 ± 0.24 nM	4.66 - 7.21 nM
H2L2	0.56 ± 0.33 nM	5.01 - 7.02 nM

【 0 1 1 3 】

ヒト化組換え免疫毒素の異なるバージョンを、表2および表3に示されるように、CD22結合親和性について分析した。表2には、ELISAによるEC₅₀の範囲が、生成物の2つまたは3つ以上のバッチを別々の分析においてそれぞれアッセイした時の平均値 ± SDとして与えられるか、または提示される。HA22と比べたヒト化組換え免疫毒素のEC₅₀の結果は、表3に示される。

【 0 1 1 4 】

(表2) CD22結合親和性 (nM)

		→ ヒト化変化の数の減少 →					
ヒト化変化の数の減少 ↑		V _H ver 3	V _H ver 4	V _H ver 5	V _H ver 1	V _H ver 2	HA22 V _H
	V _L ver 3	ND	/	/	ND	/	/
	V _L ver 4	/	6.73	2.15	0.2	/	/
	V _L ver 1	V _L ver 1 発現なし					
	V _L ver 2	/	/	/	0.54 ± 0.24	0.56 ± 0.33	/
	HA22 V _L	/	/	/	/	0.64 ± 0.12	0.47 ± 0.48

【 0 1 1 5 】

(表3) CD22結合親和性 (HA22に対して正規化されたEC₅₀)

		→ ヒト化変化の数の減少 →					
ヒト化変化の数の減少 ↑		V _H ver 3	V _H ver 4	V _H ver 5	V _H ver 1	V _H ver 2	HA22 V _H
	V _L ver 3	>>1000	/	/	>>1000	/	/
	V _L ver 4	/	39.07	12.49	1.17	/	/
	V _L ver 1	発現なし					
	V _L ver 2	/	/	/	0.81 ± 0.18	1.1	/
	HA22 V _L	/	/	/	/	0.89 ± 0.05	1

【 0 1 1 6 】

3.2 細胞ベースの力価アッセイ

本開示におけるヒト化抗CD22組換え免疫毒素の増殖阻害効果およびアポトーシス細胞死効果を評価するため、細胞ベースのアッセイにおいて、CD22発現細胞モデルを利用した。これは、力価の指標として細胞増殖/阻害を使用したエンドポイントアッセイである。細胞モデルは、CD22結合、内部移行、およびPE38によって触媒されるEF-2のADPリボシル化が、全て、観察された阻害効果を発揮するために関与しているインビボの条件を、結合アッセイと比較して、よりよく模倣する。

10

20

30

40

50

【0117】

このアッセイにおいては、高レベルのCD22を発現するDaudi細胞株(ATCC)を、本開示において提供される組換え免疫毒素またはHA22分子と一定期間共培養し、アッセイの最後に、培養物中の生細胞を比色アッセイによって定量化した。手順は以下の通りである。

【0118】

前記のDaudi細胞をRPMI-1640完全培地において培養し、採集し、HBSSによって1回洗浄した。細胞をRPMI-1640培地に 2.5×10^5 /mLの密度で再懸濁させ、100 μ L/ウェル(ウェル当たり 2.5×10^4 生細胞に相当)で96穴プレートに移した。検出すべき、本開示において提供される組換え免疫毒素またはHA22を、所定の濃度に希釈し、段階希釈液を調製した。

10

【0119】

各希釈液100 μ Lをウェル内の細胞に添加し、細胞を37 $^{\circ}$ C、5%CO₂で48~72時間インキュベートした。その後、10 μ LのCCK-8剤をプレートの各ウェルに添加し、次いで、それを37 $^{\circ}$ Cで4~8時間インキュベートした。バックグラウンド活性を補正するため、細胞の100%が死滅するまで、10 μ g/mLシクロヘキシミドの存在下で細胞を培養した。

【0120】

450nmにおける吸光度を検出することによって、ホルマザンの生成を測定した。値を、シクロヘキシミドおよび培地対照に対して正規化し、細胞の50%が死滅した時の、本開示において提供されるヒト化組換え免疫毒素およびHA22の各々の濃度を、EC₅₀として測定した。

20

【0121】

ヒト化組換え免疫毒素の種々のバージョンを、表4および表5に示されるように、CD22結合親和性について分析した。表4には、EC₅₀の範囲が、生成物の2つまたは3つ以上のバッチを別々の分析においてそれぞれアッセイした時の平均値 \pm SDとして与えられるか、または提示される。HA22と比べたヒト化組換え免疫毒素のEC₅₀の結果は、表5に示される。示されるように、ヒト化組換え免疫毒素、特に、H1L2は、インビトロの細胞ベースの力価アッセイにおいて、HA22と比較可能なEC₅₀を示した。

【0122】

(表4) インビトロ力価アッセイ(pM)

		→ヒト化変化の数の減少→					
ヒト化変化の数の減少 ↑		V _H ver 3	V _H ver 4	V _H ver 5	V _H ver 1	V _H ver 2	HA22 V _H
	V _L ver 3	ND	/	/	57.16	/	/
	V _L ver 4	/	ND	34.85 \pm 0.12	13.83 \pm 0.38	/	/
	V _L ver 1	発現なし					
	V _L ver 2	/	/	/	4.58 \pm 1.57	4.26 \pm 1.59	/
	HA22 V _L	/	/	/	/	/	2.72 \pm 0.55

30

40

【0123】

(表5) インビトロ力価アッセイ(HA22に対して正規化されたEC₅₀)

50

		→ ヒト化変化の数の減少 →					
↑ ヒト化変化の数の減少		V _H ver 3	V _H ver 4	V _H ver 5	V _H ver 1	V _H ver 2	HA22 V _H
	V _L ver 3	ND	/	/	4.59	/	/
	V _L ver 4	/	ND	10.7	4.12	/	/
	V _L ver 1	V _L ver 1 発現なし					
	V _L ver 2	/	/	/	1.32 ± 0.17	1.23	/
	HA22 V _L	/	/	/	/	/	1

10

【0124】

実施例4：ヒト化抗CD22組換え免疫毒素の非臨床薬物動態および薬物代謝

4.1 インビボPK研究

この研究においては、C57BL/6マウスモデル（4～6週齢、雌）を使用した。45匹のマウスをランダムに3つの群に分けた：（1）対照（製剤化緩衝液）、（2）500 μg/kg HA22；および（3）500 μg/kg H1L2。対照群または処置群に尾静脈注射を与え、注射後の指定された時点（5分、15分、30分、45分、1時間、2時間、4時間、8時間、24時間、48時間、96時間）で、後眼窩試料採取を介して、100 μLの全血を収集した。3反復（Three replicate）の動物を各時点に割り当てた。分析のため、血液試料から50 μLの血漿を回収した。

20

【0125】

表6および表7に示されるように、結果は、マウスモデルH1L2が、HA22と比較可能な薬物動態特性を示すことを示した：両分子は、類似した半減期（ $T_{1/2}$ ）、最大濃度に達するまでの時間（ T_{max} ）、最大濃度（ C_{max} ）、および曲線下面積（ AUC_{0-t} ）を示した。PKプロファイルは、図4に示される。

【0126】

（表6）HA22 PK結果

30

	$T_{1/2}$ (min)	T_{max} (min)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng/mL×min)
レプリケート1	44.38	5	1.671×10^4	7.329×10^5
レプリケート2	46.32	5	1.275×10^4	6.385×10^5
レプリケート3	57.26	5	1.863×10^4	7.125×10^5
平均値	49.32	5	1.603×10^4	6.947×10^5

40

【0127】

（表7）H1L2 PK結果

50

	T _{1/2} (min)	T _{max} (min)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{0-t} (ng/mL×min)
レプリケート1	41.69	5	1.906×10 ⁴	7.416×10 ⁵
レプリケート2	41.76	5	1.581×10 ⁴	7.458×10 ⁵
レプリケート3	42.48	5	1.910×10 ⁴	7.474×10 ⁵
平均値	41.98	5	1.799×10 ⁴	7.449×10 ⁵

10

【0128】

4.2 インビボ効力

異種移植動物モデルおよびCD22陽性Raji Bリンパ球を、腫瘍確立のために利用した。投与した後、組換え免疫毒素分子は、循環系に入り、悪性B細胞の表面上のCD22と結合し、アポトーシス経路を介して細胞増殖を抑制する。従って、腫瘍増殖の阻害を、この実施例における効力研究のエンドポイントとして指定した。

【0129】

胸腺欠損NCrヌードマウスモデル(4~6週齢、雌)を使用した。25匹のマウスを、表8に示されるように、ランダムに5つの群に分けた。CD-22陽性ホモサピエンス(Homo sapiens)リンパ芽球Raji細胞株(ATCC CCL-86)を、異種移植片を確立するため、使用した。Raji細胞を5×10⁷細胞/mLの最終濃度で皮下注射し、処置前に100~200mm³に増殖させた。異種移植腫瘍が確立された後、指示された用量レベルでの処置を、尾静脈注射を介して単回投与した。処置後24日間、異種移植マウスを観察し、腫瘍サイズを測定した。

20

【0130】

図5に示されるように、対照群(群1)と比較して、HA22高用量群は、腫瘍増殖の84.9%の抑制を示し、低用量群は、腫瘍増殖の95.8%の抑制を示し; H1L2高用量群は、腫瘍増殖の87.7%の抑制を示し、低用量群は、腫瘍増殖の34.2%の抑制を示した。T検定を実施したところ、低用量のヒト化組換え免疫毒素H1L2を除き、全ての処置が、有意な腫瘍抑制効力を示した(図5中、* P<0.05、** P<0.01、*** P<0.005)。HA22高用量群とH1L2高用量群との間に、統計的有意差はなかった。

30

【0131】

(表8)効力研究の群および投薬情報

群	処置	用量レベル(μg/kg)	動物数
1	製剤化緩衝液	0	5
2	HA22	100	5
3	HA22	300	5
4	H1L2	100	5
5	H1L2	300	5

40

【0132】

本発明の態様の前記の説明は、本発明を限定するためのものではなく、当業者は、本発明の本旨を逸脱することなく、様々な変化および修飾を本発明に施すことができ、それらは添付の特許請求の範囲に含まれるものとする。

【0133】

参考文献:

50

1. Macauley, M.S., P.R. Crocker および J.C. Paulson, *Siglec-mediated regulation of immune cell function in disease*. Nature Reviews Immunology, 2014. 14(10): p.

653.

2. Naeim, F., *Atlas of hematopathology: morphology, immunophenotype, cytogenetics, and molecular approaches*. 2012: Academic Press. Ch. 2, p. 33.

3. Kreitman, R.J. および E. Arons, *Update on hairy cell leukemia*. Clinical advances in hematology & oncology: H&O, 2018. 16(3): p. 205. 10

4. Grever, M.R. と , *Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with classic hairy cell leukemia*. Blood, 2017. 129(5): p. 553-60.

5. Holzman, D., *Has success spoiled hairy cell leukemia research? Key questions go unanswered, despite big gains*. 2009, Oxford University Press.

6. Grever, M.R. と , *Consensus guidelines for the diagnosis and management of patients with classic hairy cell leukemia*. Blood, 2017. 129(5): p. 553-60. 20

7. Getta, B.M., J.H. Park および M.S. Tallman, *Hairy cell leukemia: past, present and future*. Best Practice & Research Clinical Haematology, 2015. 28(4): p. 269-72.

8. Kreitman, R.J., *Immunoconjugates and new molecular targets in hairy cell leukemia*. ASH Education Program Book, 2012. 2012(1): p. 660-6.

9. Pastan, I., *Immunotoxins containing Pseudomonas exotoxin A: a short history*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2003. 52(5): p. 338-41.

10. Rust, A. と , *The Use of Plant-Derived Ribosome Inactivating Proteins in Immunotoxin Development: Past, Present and Future Generations*. Toxins (Basel), 2017. 9(11): p.344. 30

11. Sievers, E.L. および P.D. Senter, *Antibody-drug conjugates in cancer therapy*. Annu Rev Med, 2013. 64: p. 15-29.

12. Mansfield, E., I. Pastan および D.J. FitzGerald, *Characterization of RFB4-Pseudomonas Exotoxin A Immunotoxins Targeted to CD22 on B-Cell Malignancies*. Bioconjugate chemistry, 1996. 7(5): p. 557-63. 40

13. Mansfield, E. と , *Recombinant RFB4 immunotoxins exhibit potent cytotoxic activity for CD22-bearing cells and tumors*. Blood, 1997. 90(5): p. 2020-6.

14. Kreitman, R.J. 他 , *Efficacy of the anti-CD22 recombinant immunotoxin BL22 in chemotherapy-resistant hairy-cell leukemia*. New England Journal of Medicine, 2001. 345(4): p. 241-7.

15. Kreitman, R.J. 他 , *Phase I trial of recombinant immunotoxin RFB4 (dsFv)-PE38 (BL22) in patients with B-cell malignancies*. J Clin Oncol, 2005. 23(27): p. 6719-29.

16. Wayne, A.S. 他 , *Anti-CD22 Immunotoxin RFB4(dsFv)-PE38 (BL22) for CD22-Positive Hematologic Malignancies of Childhood: Preclinical Studies and Phase I Clinical Trial*. Clinical Cancer Research, 2010: p. 1078-0432.CCR-09-2980. 10

17. Mussai, F. 他 , *Cytotoxicity of the anti - CD22 immunotoxin HA22 (CAT - 8015) against paediatric acute lymphoblastic leukaemia*. British journal of haematology, 2010. 150(3): p. 352-358.

18. Wayne, A.S. 他 , *Immunotoxins for leukemia*. Blood, 2014. 123(16): p. 2470-7. 20

19. Alewine, C., R. Hassan および I. Pastan, *Advances in anticancer immunotoxin therapy*. Oncologist, 2015. 20(2): p. 176-85.

20. Kreitman 他 , *Moxetumomab pasudotox in relapsed/refractory hairy cell leukemia*, Leukemia. 2018; 32(8): 1768–1777.

21. Mazor, R. 他 , *Elimination of murine and human T-cell epitopes in recombinant immunotoxin eliminates neutralizing and anti-drug antibodies in vivo*. Cell Mol Immunol 14, 432–442 (2017). 30

22. Liu, W. 他 , *Recombinant immunotoxin engineered for low immunogenicity and antigenicity by identifying and silencing human B-cell epitopes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2012, 109, 11782–11787.

23. Mazor, R. 他 , *Recombinant immunotoxin for cancer treatment with low immunogenicity by identification and silencing of human T-cell epitopes*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 2014, 111, 8571–8576.

24. Mazor, R. 他 , *Recombinant immunotoxin with T-cell epitope mutations* 40

that greatly reduce immunogenicity for Treatment of mesothelin-expressing tumors. Mol. Cancer Ther. 2015, 14, 2789–2796.

25. Moss, D.L. 他 , *Deimmunizing substitutions in Pseudomonas exotoxin domain III perturb antigen processing without eliminating T-cell epitopes.* J. Biol. Chem. 2019, 294, 4667–4681.

26. Varkey, R. 他 , *Discovery and characterization of potent IL-21 neutralizing antibodies via a novel alternating antigen immunization and humanization strategy.* PLOS ONE, 2019. 14(1): p. e0211236.

10

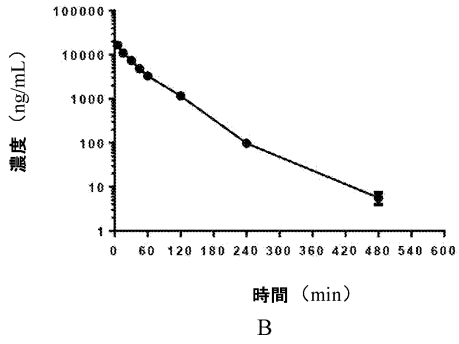
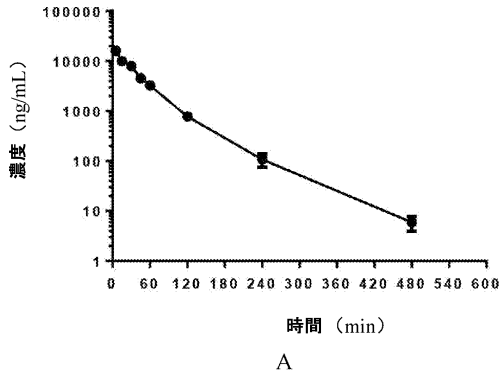
20

30

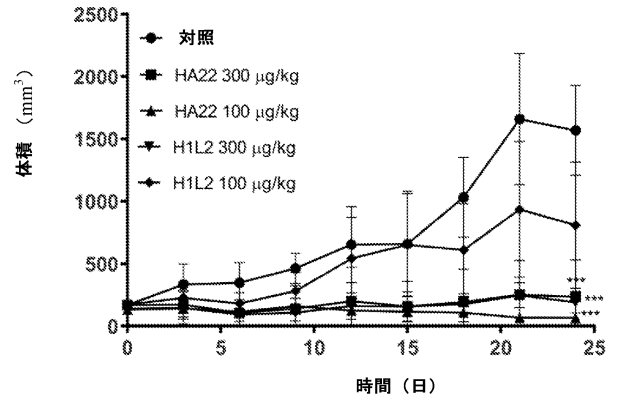
40

50

【 図 4 】



【 図 5 】



10

20

【 配列表 】

0007696648000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	47/68	(2017.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 K	48/00	(2006.01)	A 6 1 K	48/00	
A 6 1 K	38/16	(2006.01)	A 6 1 K	38/16	
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12	

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433

弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100205707

弁理士 小寺 秀紀

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396

弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ハオ ジェンピン

中華人民共和国 6 5 0 2 1 7 ユンナン クンミン エコノミック アンド テクニカル ディベロプ
メント ゾーン インフォメーション インダストリー ベース リンシー ロード ナンバー 1 6 0

(72)発明者 チュー ジャンウェイ

中華人民共和国 6 5 0 2 1 7 ユンナン クンミン エコノミック アンド テクニカル ディベロプ
メント ゾーン インフォメーション インダストリー ベース リンシー ロード ナンバー 1 6 0

(72)発明者 シュ リー

中華人民共和国 6 5 0 2 1 7 ユンナン クンミン エコノミック アンド テクニカル ディベロプ
メント ゾーン インフォメーション インダストリー ベース リンシー ロード ナンバー 1 6 0

審査官 上村 直子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 9 / 1 1 8 4 1 1 (W O , A 2)

特表 2 0 1 6 - 5 0 3 0 6 2 (J P , A)

特表 2 0 1 9 - 5 0 9 0 5 4 (J P , A)

特表 2 0 0 7 - 5 3 6 9 0 5 (J P , A)

特表 2 0 1 7 - 5 3 6 0 9 1 (J P , A)

米国特許出願公開第 2 0 1 2 / 0 1 7 7 5 6 7 (U S , A 1)

国際公開第 2 0 1 5 / 1 0 5 9 2 6 (W O , A 1)

特表 2 0 0 8 - 5 3 7 8 7 6 (J P , A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 1 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 4 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 P

A 6 1 K

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

U n i P r o t / G e n e S e q