

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5902367号
(P5902367)

(45) 発行日 平成28年4月13日(2016.4.13)

(24) 登録日 平成28年3月18日(2016.3.18)

(51) Int.Cl.	F 1		
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	M	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 11/06		

請求項の数 1 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-520393 (P2007-520393)	(73) 特許権者	501083115 メイヨ・ファウンデーション・フォー・メ ディカル・エデュケーション・アンド・リ サーチ アメリカ合衆国、ミネソタ州 55905 、ロチェスター、ファースト・ストリート ・サウスウエスト 200
(86) (22) 出願日	平成17年6月30日(2005.6.30)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(65) 公表番号	特表2008-505639 (P2008-505639A)	(74) 代理人	100128048 弁理士 新見 浩一
(43) 公表日	平成20年2月28日(2008.2.28)	(72) 発明者	ピース ラリー アール、 アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスタ ー コリーン レーン ノースイースト 2426 最終頁に続く
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/023440		
(87) 国際公開番号	W02006/004988		
(87) 国際公開日	平成18年1月12日(2006.1.12)		
審査請求日	平成20年1月10日(2008.1.10)		
審査番号	不服2011-24378 (P2011-24378/J1)		
審査請求日	平成23年11月11日(2011.11.11)		
(31) 優先権主張番号	10/881,661		
(32) 優先日	平成16年6月30日(2004.6.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/983,104		
(32) 優先日	平成16年11月5日(2004.11.5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 抗体

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の(i)または(ii)記載の抗体をコードする単離核酸であって、該核酸が、SEQ ID NO :13またはSEQ ID NO:14に記載の核酸配列を含む、単離核酸：

(i) SEQ ID NO:6に記載のアミノ酸配列と少なくとも97.0%同一、およびSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と少なくとも97.0%同一であるアミノ酸配列を含む、組換えにより産生されるヒト抗体であって、ここで、該抗体は、軽鎖可変領域としてSEQ ID NO:6に記載のアミノ酸配列および重鎖可変領域としてSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列を有するsHIgM 12抗体と結合を競合する、抗体；

(ii) アミノ酸配列が、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と少なくとも99.0%同一である、前記(i)記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

技術分野

本明細書は抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

十価(decavalent)IgM抗体は、結合親和性は低い可能性があるが、抗原への測定可能な

結合親和力を示す。五量体IgMの多価構造は、細胞表面標的を架橋することに対する潜在性を提供し、免疫機能に普通は関連しない生物学的潜在性を可溶性抗体に与える。

【 0 0 0 3 】

樹状細胞(DC)は、効率的な抗原提示細胞(APC)である。これらの細胞は、それらの細胞表面上に、一連の共刺激分子をともなって、クラスIおよびクラスII主要組織適合性複合体(MHC)ペプチド提示分子を発現する(Banchereau and Steinman (1998) Nature 392:245-252(非特許文献1))。ナイーブT細胞は、これらのDCリガンドに対する受容体を発現する。クラスIまたはクラスII分子との関連で提示されるペプチド抗原の認識の後に続いて、T細胞膜の構造は再編成され、T細胞受容体の要素と、共受容体CD4またはCD8ならびに共刺激受容体CD28およびCTLA-4を含むその他の細胞表面分子とを結び付ける(Monks et al. (1998) Nature 395:82-86(非特許文献2); およびWulfing and Davis (1998) Science 282:2266-2269(非特許文献3))。新しく形成されるマクロ分子複合体内の相互作用は、DCによってT細胞へ変換される誘導事象の帰結を決定する。

【 0 0 0 4 】

DCは、様々な組織に存在し、異なった組織関連表現型を示す(Strunk et al. (1997) J. Exp. Med. 185:1131-1136(非特許文献4); Caux et al. (1996) J. Exp. Med. 184:695-706(非特許文献5); Wu et al. (1996) J. Exp. Med. 184:903-911(非特許文献6); およびVremec et al. (1992) J. Exp. Med. 176:47-58(非特許文献7))。細胞のこれらの異なるサブセットの細胞系統間の関係は、しっかりと確立されていない。骨髄または血液前駆体からインビトロで生成されるDCに焦点を合わせる、労働の大きな体が浮上した(Mayordomo et al. (1995) Nat. Med. 1:1297-1302(非特許文献8); Nonacs et al. (1992) J. Exp. Med. 176:519-529(非特許文献9); Steinman and Witmer (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5132-5136(非特許文献10); およびYoung and Steinman (1990) J. Exp. Med. 171:1315-1332(非特許文献11))。インビトロで生成される細胞は、クラスI抗原および内因性DCに関連する一連の共刺激リガンドの高レベルを発現する(Fagnoni et al. (1995) Immunology 85:467-474(非特許文献12); およびBanchereau et al. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18:767-811(非特許文献13))。重要なこととして、それらは、ナイーブT細胞を効率的に活性化することが可能であり、DCの特徴(signature)である機能である。

【 0 0 0 5 】

喘息は、主として気道の慢性炎症性疾患である。この主たる炎症は、2つの二次症候を引き起こす：a)アレルギー、冷たいおよび乾いた空気、煙、ならびにウイルスなどの様々な喘息誘因に対してより敏感な過度反応性気管支、ならびにb)気流閉塞(すなわち、肺の中および外に空気を動かすことの困難)。これらの症候は、典型的には、咳、喘鳴、息切れまたは呼吸促進、および胸部圧迫によって明示される。

【 0 0 0 6 】

アレルギー性喘息は、喘息の最も一般的な型である。アレルギー性および非アレルギー性喘息の症候の多くは、同じである。アレルギー性喘息は、ダニ、ペットの鱗屑、花粉、またはカビなどのアレルギーを吸入することによって誘発される。複雑な反応を介して、次いで、これらのアレルギーは、肺の気道における通路が、炎症を起こしかつ膨張したようになることを引き起こし、喘息症候を引き起こす。

【 0 0 0 7 】

アレルギー性喘息は、肺炎症性浸潤ならびにメタコリンなどの様々な肺刺激剤および刺激に対する過反応性によって特徴付けられる。アレルギー性喘息の特質は、肺におけるTh2細胞の異常な拡大である(Wills-Karp (1999) Annu. Rev. Immunol. 17:255-281(非特許文献14); およびRay and Cohn (1999) J. Clin. Invest. 104:985-993(非特許文献15))。DCは、リンパ系器官におけるナイーブT細胞に対する主要な抗原提示細胞として作用する(Steinman (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:271-296(非特許文献16))。DCは、呼吸路に存在し、気管、気管支、肺胞、および臓側胸膜からの単離に際して、それらはT細胞に対する抗原提示が可能である(Holt and Schon-Hegrad (1987) Immunol. 62:349-356(非特許文献17); およびSertl et al. (1986) J. Exp. Med. 163:436-451(非特許文献18))。加えて、

肺DCが、Th2表現型を含むT細胞をプライムすることが、アレルギー性喘息のオボアルブミン(OVA)モデルを使用して実証されている。GM-CSFでのマウスの処置は、IL-12に対するメッセージにおける付随の増加をともなって、この効果をTh1極性の方へと調節した(Stumbles et al. (1998) J. Exp. Med. 188:2019-2031(非特許文献19))。

【0008】

【非特許文献1】Banchereau and Steinman (1998) Nature 392:245-252

【非特許文献2】Monks et al. (1998) Nature 395:82-86

【非特許文献3】Wulfing and Davis (1998) Science 282:2266-2269

【非特許文献4】Strunk et al. (1997) J. Exp. Med. 185:1131-1136

【非特許文献5】Caux et al. (1996) J. Exp. Med. 184:695-706

10

【非特許文献6】Wu et al. (1996) J. Exp. Med. 184:903-911

【非特許文献7】Vremec et al. (1992) J. Exp. Med. 176:47-58

【非特許文献8】Mayordomo et al. (1995) Nat. Med. 1:1297-1302

【非特許文献9】Nonacs et al. (1992) J. Exp. Med. 176:519-529

【非特許文献10】Steinman and Witmer (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:5132-5136

【非特許文献11】Young and Steinman (1990) J. Exp. Med. 171:1315-1332

【非特許文献12】Fagnoni et al. (1995) Immunology 85:467-474

【非特許文献13】Banchereau et al. (2000) Annu. Rev. Immunol. 18:767-811

【非特許文献14】Wills-Karp (1999) Annu. Rev. Immunol. 17:255-281

20

【非特許文献15】Ray and Cohn (1999) J. Clin. Invest. 104:985-993

【非特許文献16】Steinman (1991) Annu. Rev. Immunol. 9:271-296

【非特許文献17】Holt and Schon-Hegrad (1987) Immunol. 62:349-356

【非特許文献18】Sertl et al. (1986) J. Exp. Med. 163:436-451

【非特許文献19】Stumbles et al. (1998) J. Exp. Med. 188:2019-2031

【発明の開示】

【0009】

概要

sHlgM12抗体のアミノ酸配列と類似または同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドが、本明細書において提供される。sHlgM12のアミノ酸配列と類似または同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする核酸分子も、本明細書において提供される。本明細書において提供される方法は、病的免疫応答に關与するその他の状態(例えば、過敏性腸疾患または多発性硬化症)の発症を治療または低減させるために有用であり得る。

30

【0010】

一つの局面において、本明細書は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と80.0%から99.9%同一であるアミノ酸配列を含む精製ポリペプチドを特徴とする。アミノ酸配列は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と少なくとも95.0%(例えば、99.1%または99.2%)同一であり得る。精製ポリペプチドは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、またはSEQ ID NO:12に記載のアミノ酸配列と少なくとも80.0%同一であるアミノ酸配列をさらに含み得る。

40

【0011】

別の局面において、本明細書は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と80.0%から99.9%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする単離核酸を特徴とする。アミノ酸配列は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と少なくとも95.0%(例えば、99.1%または99.2%)同一であり得る。コードされるポリペプチドは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、またはSEQ ID NO:12に記載のアミノ酸配列と80.0%から99.9%同一であるアミノ酸配列をさらに含み得る。

【0012】

別の局面において、本明細書は、ポリペプチドおよび薬学的に許容される担体を含む組成物を特徴とし、ポリペプチドは、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列

50

と80.0%から99.9%同一であるアミノ酸配列を含む。ポリペプチドは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、またはSEQ ID NO:12に記載のアミノ酸配列と80.0%から99.9%同一であるアミノ酸配列をさらに含み得る。

【0013】

さらに別の局面において、本明細書は、核酸分子および薬学的に許容される担体を含む組成物を特徴とし、核酸は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と80%から99.9%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする。コードされるポリペプチドは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、またはSEQ ID NO:12に記載のアミノ酸配列と80.0%から99.9%同一であるアミノ酸配列をさらに含み得る。

10

【0014】

別の局面において、本明細書は、SEQ ID NO:13またはSEQ ID NO:14に記載のヌクレオチド配列と80.0%から99.9%同一であるヌクレオチド配列を含む単離核酸分子を特徴とする。ヌクレオチド配列は、SEQ ID NO:13またはSEQ ID NO:14に記載のヌクレオチド配列と少なくとも98.0%同一(例えば、少なくとも99%同一)であり得る。

【0015】

別の局面において、本明細書は、組換えにより産生されるポリペプチドを特徴とする。組換えにより産生されるポリペプチドは、抗体(例えばsHlgM12)であり得る。

【0016】

別途定義されない限り、本明細書において使用されるすべての技術的および科学的用語は、本発明が関連する当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。適した方法および材料を以下に記載するが、本明細書において記載されるものと同様または等価の方法および材料が、本発明を實踐するために使用され得る。本明細書において記述されるすべての刊行物、特許出願、特許、およびその他の参照は、全体として参照により組み入れられる。矛盾が生じる場合、定義を含む本明細書が制御する。加えて、材料、方法、および例は、例示するためだけのものであり、制限することを意図されない。

20

【0017】

本発明の一つまたは複数の態様の詳細は、以下の添付の図面および説明に規定される。本発明のその他の特徴、目的、および利点は、説明および図面から、ならびに特許請求の範囲から明白になるとと思われる。

30

【0018】

詳細な説明

sHlgM12抗体内に存在するアミノ酸配列と類似または同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドが、本明細書において提供される。sHlgM12抗体のアミノ酸配列と類似または同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸分子も、本明細書において提供される。

【0019】

本明細書において提供される分子は、典型的には精製される。本明細書において使用される「精製された」という用語は、分子が自然に付随されるその他の細胞構成要素(例えば、その他の細胞タンパク質、ポリヌクレオチド、または細胞構成要素)から分離もしくは単離されている、または分子がインビトロで合成される場合、反応混合物に存在するほとんどもしくはすべてのその他の構成要素から分離されている分子を指す。本明細書において使用される「精製された」とは、分子が付随される構成要素の少なくともいくつかは除去されるように、部分的に精製された分子も包含する。典型的には、分子が自然に結合するまたは分子が合成反応において付随されるタンパク質およびその他の有機分子または構成要素を、乾燥重量によって、少なくとも50%(例えば、55%、60%、70%、80%、90%、95%、または99%)含まない場合、分子は「精製された」と考えられる。

40

【0020】

アダマーは、例えば、当技術分野において公知の方法を使用して、核酸の開始プールから特異的結合活性に対して初めに選択され得る。変異体は、増幅のその後のラウンドの

50

間に獲得され得る。アプタマーは、それが単離されるプールにおけるその他の核酸を、少なくとも50%含まない場合、精製されたと考えられる。

【0021】

2. ポリペプチドおよび抗体

本明細書において提供される分子は、ポリペプチドであり得る。本明細書において使用されるように、ポリペプチドは、長さまたは翻訳後修飾(例えば、リン酸化またはグリコシル化)に関わらず、アミノ酸鎖である。本明細書において提供されるポリペプチドは、B7-DCに特異的に結合し得、哺乳動物(例えば、ヒト)への投与に際して、DC機能を強化しかつ免疫応答を増強し得る。本明細書において提供されるポリペプチドは、インビトロでDCとともにインキュベートされる場合も、DC機能を強化し得る。

10

【0022】

本明細書において特徴とされるポリペプチドは、sHIgM12のアミノ配列と類似または同一のアミノ酸配列を含み得る。例えば、ポリペプチドは、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と少なくとも80.0%同一(例えば、80.0%、85.0%、90.0%、95.0%、97.0%、97.5%、98.0%、98.5%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、または99.9%同一)であるアミノ酸配列を含み得る。いくつかの態様において、ポリペプチドは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、またはSEQ ID NO:12に記載のアミノ酸配列と少なくとも80.0%同一(例えば、80.0%、85.0%、90.0%、95.0%、97.0%、97.5%、98.0%、98.5%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、または99.9%同一)であるア

20

【0023】

パーセント配列同一性を決定するために、標的核酸またはアミノ酸配列は、BLASTNバージョン2.0.14およびBLASTPバージョン2.0.14を含むBLASTZのスタンドアロンバージョンからのBLAST 2 Sequences (B12seq)プログラムを使用して、同定核酸またはアミノ酸配列と比較される。BLASTZのこのスタンドアロンバージョンは、Fish & Richardsonのウェブサイト(fr.com/blastにおけるワールドワイドウェブ)または米国政府のNational Center for Biotechnology Informationウェブサイト(ncbi.nlm.nih.govにおけるワールドワイドウェブ)から獲得され得る。B12seqプログラムをどのように使用するかを説明する取扱説明書は、BLASTZに付随するリードミーファイルにおいて見出され得る。

30

【0024】

B12seqは、BLASTNまたはBLASTPアルゴリズムのいずれかを使用して、2つの配列間の比較を行なう。BLASTNは、核酸配列を比較するために使用され、BLASTPは、アミノ酸配列を比較するために使用される。2つの核酸配列を比較するために、オプションが、以下のように設定される：-iは、比較される第一の核酸配列を含むファイルに設定される(例えば、C:\seq1.txt)；-jは、比較される第二の核酸配列を含むファイルに設定される(例えば、C:\seq2.txt)；-pは、blastnに設定される；-oは、任意の所望のファイル名に設定される(例えば、C:\output.txt)；-qは、-1に設定される；-rは、2に設定される；およびすべてのその他のオプションは、それらのデフォルト設定のままにされる。例えば、以下のコマンドは、2つの配列間の比較を含む出力ファイルを生成するために使用され得る：C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastn -o c:\output.txt -q -1 -r 2。2つのアミノ酸配列を比較するために、B12seqのオプションは、以下のように設定される：-iは、比較される第一のアミノ酸配列を含むファイルに設定される(例えば、C:\seq1.txt)；-jは、比較される第二のアミノ酸配列を含むファイルに設定される(例えば、C:\seq2.txt)；-pは、blastpに設定される；-oは、任意の所望のファイル名に設定される(例えば、C:\output.txt)；およびすべてのその他のオプションは、それらのデフォルト

40

50

設定のままにされる。例えば、以下のコマンドは、2つのアミノ酸配列間の比較を含む出力ファイルを生成するために使用され得る：`C:\B12seq -i c:\seq1.txt -j c:\seq2.txt -p blastp -o c:\output.txt`。2つの比較配列が、相同性を共有する場合、次いで、指定出力ファイルは、相同性のそれらの領域を整列配列として提示すると思われる。2つの比較配列が、相同性を共有しない場合、次いで、指定出力ファイルは、整列配列を提示しないと思われる。

【 0 0 2 5 】

整列されると、適合の数が、同一ヌクレオチドまたはアミノ酸残基が両方の配列において提示される位置の数をカウントすることによって決定される。パーセント配列同一性は、同定配列(例えば、SEQ ID NO:6)に規定される配列の長さまたは接続長(例えば、同定配列に規定される配列からの100連続ヌクレオチドまたはアミノ酸残基)のいずれかによって適合の数を割り、その後結果として生じる値に100をかけることによって、決定される。例えば、SEQ ID NO:6に記載の配列と整列される場合に98の適合を有する核酸配列は、SEQ ID NO:6に記載の配列と92.5パーセント同一である(すなわち、 $98 \div 106 * 100 = 92.5$)。パーセント配列同一性値は、小数第二位で四捨五入されることに留意されたい。例えば、75.11、75.12、75.13、および75.14は、75.1に切り捨てられ、75.15、75.16、75.17、75.18、および75.19は、75.2に切り上げられる。長さの値が、常に整数であることにも留意されたい。

【 0 0 2 6 】

本明細書において提供されるポリペプチドのアミノ酸配列は、SEQ ID NO:6および8に記載のアミノ酸配列に対して置換、欠失、または付加を有し得る。SEQ ID NO:6および/またはSEQ ID NO:8に対して修飾される(例えば、置換による)アミノ酸配列を有するポリペプチドは、SEQ ID NO:6およびSEQ ID NO:8に記載の配列と同一のアミノ酸配列を含むポリペプチドと比較して、実質的には同じまたは改善された質を有し得る。置換は、保存置換であり得る。本明細書において使用されるように、「保存置換」とは、類似の側鎖を有する別のアミノ酸でのアミノ酸の置換である。保存置換は、典型的には、ペプチド全体が、その空間的立体構造を本質的には保有するが、変更された生物学的活性を有するように、アミノ酸の電荷またはアミノ酸の側鎖のサイズにおいて(または、サイズ、電荷、または側鎖内の化学基の種類において)起こり得る最も少ない変化を作るアミノ酸での置換であり得る。保存変化の例は、非限定的に、AspからGlu、Asn、またはGlnへ；HisからLys、Arg、またはPheへ；AsnからGln、Asp、またはGluへ、およびSerからCys、Thr、またはGlyへを含む。アラニンは、その他のアミノ酸を置換するために一般的に使用される。20の必須アミノ酸は、以下のように群化され得る：非極性側鎖を有するアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニン；非荷電極性側鎖を有するグリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミン；酸性側鎖を有するアスパラギン酸およびグルタミン酸；ならびに塩基性側鎖を有するリジン、アルギニン、およびヒスチジン(例えば、Stryer, Biochemistry (2nd edition) W. H. Freeman and Co. San Francisco (1981), pp. 14-15; およびLehninger, Biochemistry (2nd edition, 1975), pp. 73-75を参照されたい)。保存置換は、これらの群内で作られる置換を含み得る。

【 0 0 2 7 】

本明細書において提供される分子は、抗体であり得る。「抗体」および「複数の抗体」という語は、無傷分子ならびにそのフラグメントを包含する。抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体、ヒト化またはキメラ抗体、一本鎖Fv抗体フラグメント、Fabフラグメント、およびF(ab)₂フラグメントであり得る。ポリクローナル抗体は、特定の抗原に特異的である抗体分子の異質集団であるが、モノクローナル抗体は、抗原内に含まれる特定のエピトープに対する抗体の均質集団である。

【 0 0 2 8 】

抗体は、IgM、IgA、IgD、IgE、およびIgGを含む任意の免疫グロブリン(Ig)クラス、ならびにその任意のサブクラスのものであり得る。IgMクラスの抗体(例えば、sHIgM12)は、

10

20

30

40

50

典型的には五価であり、特に有用である。架橋され(例えば、架橋IgG)したがって多価であるIg分子を含む免疫複合体も、特に有用であり得る。

【0029】

本明細書において使用されるように、「エピトープ」とは、抗体が結合する抗原分子の部分である。抗原は、同時に複数のエピトープを提示し得る。ポリペプチド抗原に対して、エピトープは、典型的には、長さが約4~6アミノ酸であり、修飾(例えば、リン酸化またはグリコシル化)アミノ酸を含み得る。2つの異なる免疫グロブリンは、それらが同じエピトープまたはエピトープのセットに結合する場合、同じエピトープ特異性を有し得る。

【0030】

ポリクローナル抗体は、免疫動物の血清に含まれる。モノクローナル抗体は、例えば、標準的ハイブリドーマテクノロジーを使用して調製され得る。特に、モノクローナル抗体は、例えば、Kohler et al. (1975) Nature 256:495-497、Kosbor et al. (1983) Immunology Today 4:72のヒトB細胞ハイブリドーマ技術、およびCote et al. (1983) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:2026-2030、およびCole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc. pp. 77-96 (1983)のEBV-ハイブリドーマ技術によって記載されるような、培養における連続継代細胞系によって抗体分子の産生を提供する任意の技術によって獲得され得る。モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養され得る。

10

【0031】

本明細書において提供される抗体は、例えば、個体の血清から単離されてもよい。例えば、sHIgM12抗体は、本明細書における実施例1において記載されるように、ヒト血清から単離された。単離に適した方法は、例えばクロマトグラフィーを含む技術を使用する哺乳動物血清からの精製を含む。

20

【0032】

抗体は、例えば化学的合成によって、またはナイーブタンパク質の精製によって、組換えにより産生され得、次いで、ポリペプチドの注射によって動物を免疫するために使用され得る。アジュバントは、宿主種に応じて、免疫応答を増加するために使用され得る。適したアジュバントは、フロインドアジュバント(完全または不完全)、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、リゾレシチンなどの表面活性物質、プルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油乳液、キーホールリンペットヘモシアニン(KLH)、およびジニトロフェノールを含む。標準的技術は、抗体を単離するために使用され得る。そのような技術は、sHIgM12と類似の特徴(例えば、類似のエピトープ特異性およびその他の機能的類似性)を有する抗体を生成することに対して有用である。

30

【0033】

sHIgM12などの抗体は、組換えにより産生されてもよい。本明細書において提供される抗体のアミノ酸配列(例えば、部分的アミノ酸配列)は、標準的技術によって決定され得、抗体または抗体の部分にコードするcDNAは、抗体が元来単離された被験体(例えば、ヒト患者または免疫宿主動物)の血清から単離され得る。cDNAは、標準的技術を使用して、発現ベクターにクローニングされ得る。次いで、発現ベクターは、適当な宿主細胞(例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞、COS細胞、またはハイブリドーマ細胞)にトランスフェクトされ得、抗体は、発現および精製され得る。例えば、本明細書における実施例14を参照されたい。

40

【0034】

架橋機能を保有する抗体フラグメントは、上に開示されるものなどの技術によって生成されてもよい。そのような抗体フラグメントは、抗体分子のペプシン分解によって産生され得るF(ab')₂フラグメント、およびF(ab')₂フラグメントのジスルフィド架橋を還元することによって生成され得るFabフラグメントを含むが、それらに限定されない。または、Fab発現ライブラリーが、構築され得る。例えば、Huse et al. (1989) Science 246:1275-1281を参照されたい。一本鎖Fv抗体フラグメントは、アミノ酸架橋(例えば、15~18アミノ酸)によってFv領域の重および軽鎖フラグメントをリンクし、一本鎖ポリペプチドを引

50

き起こすことによって形成される。一本鎖Fv抗体フラグメントは、米国特許第4,946,778号において開示されるものなどの標準的技術を介して産生され得る。そのようなフラグメントは、例えば、ビオチン化および架橋によって多価にされ得る。

【0035】

3. 核酸、ベクター、および宿主細胞

分子(例えば、本明細書において記載されるものなどのポリペプチドおよび抗体)をコードする核酸は、本明細書において提供される。本明細書において使用されるように、「核酸」という語は、RNAならびにcDNA、ゲノムDNA、および合成(例えば、化学的に合成される)DNAを含むDNAの両方をさす。核酸分子は、二本鎖または一本鎖(すなわち、センスまたはアンチセンス一本鎖)であり得る。核酸は、例えば、sHIgM12抗体の軽および重鎖をコードするcDNAを含み得る。

10

【0036】

「単離核酸」は、核酸が普通に見出されるゲノムにおける核酸の片側または両側に普通に隣接するその他の核酸分子から分離される核酸を指す。核酸に関して本明細書において使用されるような「単離」という用語は、任意の非自然発生的核酸配列も含むが、そのような非自然発生的配列は、自然において見出されず、自然発生的ゲノムにおける直接(immediately)隣接配列を有さないからである。

【0037】

単離核酸は、自然発生的なゲノムにおいてDNA分子に直接隣接することが普通に見出される核酸配列の一つが除去されるまたは非存在であるならば、例えば、DNA分子であり得る。したがって、単離核酸は、その他の配列に非依存的な別個の分子として存在するDNA分子(例えば、化学的合成核酸、またはPCRもしくは制限酵素処置によって産生されるcDNAもしくはゲノムDNAフラグメント)、ならびにベクター、自己複製プラスミド、ウイルス(例えば、レトロウイルス、レンチウイルス、アデノウイルス、またはヘルペスウイルス)へ、または原核生物もしくは真核生物のゲノムDNAへ取り込まれるDNAを非限定的に含む。加えて、単離核酸は、ハイブリッドまたは融合核酸の一部であるDNA分子などの人工核酸を含み得る。例えば、cDNAライブラリーもしくはゲノムライブラリー、またはゲノムDNA制限分解(digest)を含むゲルスライス内の数百~数百万のその他の核酸の中に存在する核酸は、単離核酸とは考えられない。

20

【0038】

本明細書において開示される単離核酸は、ポリペプチドをコードし得る。例えば、単離核酸は、sHIgM12の可変または定常領域において見出されるアミノ酸配列と類似または同一のアミノ酸配列を含むペプチドをコードし得る。一つの態様において、核酸は、SEQ ID NO:6またはSEQ ID NO:8に記載のアミノ酸配列と少なくとも80.0%(例えば、80.0%、85.0%、90.0%、95.0%、97.0%、97.5%、98.0%、98.5%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、または99.9%)同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードし得る。コードされるポリペプチドは、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、またはSEQ ID NO:12に記載のアミノ酸配列と少なくとも80.0%(例えば、80.0%、85.0%、90.0%、95.0%、97.0%、97.5%、98.0%、98.5%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、または99.9%)同一であるアミノ酸配列をさらに含み得る。別の態様において、単離核酸は、SEQ ID NO:13またはSEQ ID NO:14に記載のヌクレオチド配列と少なくとも80.0%(例えば、80.0%、85.0%、90.0%、95.0%、97.0%、97.5%、98.0%、98.5%、99.0%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、または99.9%)同一であるヌクレオチド配列を含み得る。パーセント配列同一性を決定するための方法は、本明細書において提供される。

30

40

【0039】

本明細書において提供される単離核酸分子は、一般的な分子クローニングおよび化学的核酸合成技術を非限定的に含む標準的技術によって産生され得る。例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)技術は、sHIgM12などの抗体をコードする単離核酸分子を獲得するために使

50

用され得る。単離核酸は、単一核酸分子として(例えば、ホスホロアミダイトテクノロジーを使用する3'から5'方向における自動DNA合成を使用して)または一連のポリヌクレオチドとして、化学的に合成されてもよい。例えば、所望の配列を含む長いポリヌクレオチド(例えば、>100ヌクレオチド)の一つまたは複数対は、ポリヌクレオチド対がアニールされる場合に二本鎖が形成されるように、各々の対が相補性の短いセグメント(例えば、約15ヌクレオチド)を含んで合成され得る。DNAポリメラーゼは、ポリヌクレオチドを伸長するために使用され、ポリヌクレオチド対ごとに一本、二本鎖核酸分子を引き起こす。

【0040】

前述したものなどの核酸を含むベクターも、本明細書において提供される。本明細書において使用されるように、「ベクター」とは、別のDNAセグメントが挿入されるセグメントの複製をもたらすように挿入され得る、プラスミド、ファージ、またはコスミドなどのレプリコンである。本明細書において提供されるベクターは、発現ベクターであり得る。「発現ベクター」とは、一つまたは複数の発現制御配列を含むベクターであり、「発現制御配列」とは、別のDNA配列の転写および/または翻訳を制御および調節するDNA配列である。

10

【0041】

本明細書において提供される発現ベクターにおいて、核酸(例えば、sHlgM12の軽および/または重鎖をコードする核酸)は、一つまたは複数の発現制御配列に操作可能なように結合される。本明細書において使用されるように、「操作可能なように結合される」とは、発現制御配列が、対象となるコード配列の発現を効果的に制御するように、遺伝的構築体に取り込まれることを意味する。発現制御配列の例は、プロモーター、エンハンサー、および転写終結領域を含む。プロモーターは、典型的には転写が始まるポイント(概して、RNAポリメラーゼIIに対する開始部位の近く)の上流の100~500ヌクレオチド以内の、DNA分子の領域から成る発現制御配列である。コード配列をプロモーターの制御下に持つて行くためには、ポリペプチドの翻訳リーディングフレームの翻訳開始部位を、1から約50ヌクレオチドプロモーターの下流に置く必要がある。エンハンサーは、時間、場所、およびレベルに関して、発現特異性を提供する。プロモーターと異なり、エンハンサーは、転写部位からの様々な距離に位置する場合に、機能し得る。エンハンサーは、転写開始部位から下流にも位置し得る。コード配列は、RNAポリメラーゼがコード配列をmRNAへ転写することができ、次いでそのmRNAがコード配列によってコードされるタンパク質へと翻訳され得る場合に、「操作可能なように結合される」および細胞における発現制御配列の「制御下」にある。したがって、本明細書において提供される発現ベクターは、sHlgM12ならびに本明細書において提供されるその他の分子を産生するために有用である。

20

30

【0042】

適した発現ベクターは、プラスミド、ならびに例えばバクテリオファージ、バキュロウイルス、タバコモザイクウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルスに由来するウイルスベクターを非限定的に含む。多くのベクターおよび発現システムは、Novagen(Madison, WI)、Clontech(Palo Alto, CA)、Stratagene(La Jolla, CA)、およびInvitrogen/Life Technologies(Carlsbad, CA)などの企業から市販されている。

40

【0043】

発現ベクターは、発現される核酸配列のその後の操作(例えば、精製または局在)を容易にするためにデザインされるタグ配列を含み得る。緑色蛍光タンパク質(GFP)、グルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、ポリヒスチジン、c-myc、血球凝集素、またはフラッグ(Flag)(商標)タグ(Kodak, New Haven, CT)配列などのタグ配列は、典型的には、コードポリペプチドとの融合として発現される。そのようなタグは、カルボキシルまたはアミノ末端のいずれかを含む、ポリペプチド内の任意の場所に挿入され得る。

【0044】

本明細書において記載されるようなベクターを含む宿主細胞も、提供される。「宿主細胞」という用語は、組換え発現ベクターが導入され得る原核および真核細胞を含むことを

50

意図される。本明細書において使用されるように、「形質転換された」および「トランスフェクトされた」とは、多くの技術の一つによる細胞への核酸分子(例えば、ベクター)の導入を包含する。特定の技術に限定されないが、多くのこれらの技術が、当技術分野内で良く確立されている。原核細胞は、例えば電気穿孔法または塩化カルシウム媒介形質転換によって、核酸で形質転換され得る。核酸は、例えばリン酸カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン-媒介トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔法、またはマイクロインジェクションを含む技術によって、哺乳動物細胞にトランスフェクトされ得る。宿主細胞を形質転換するおよびトランスフェクトするのに適した方法は、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2nd edition), Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1989)において見出され、形質転換および/またはトランスフェクションのための試薬は、市販されている(例えば、リポフェクション(Lipofectin)(登録商標)(Invitrogen/Life Technologies); Eugene(Roche, Indianapolis, IN); およびスーパーフェクト(SuperFect)(Qiagen, Valencia, CA))。

10

【0045】

4. 組成物

本明細書において記載される分子は、薬剤の製造において使用され得る。したがって、本明細書において記載される分子(例えば、sHlgM12などの抗体)は、組成物に取り込まれ得る。そのような組成物は、本明細書において提供される。本明細書において提供される組成物は、被験体に投与され得る。

【0046】

20

治療的組成物を製剤しその後投与するための方法は、当業者にとって周知である。投薬量は、典型的には、数日~数ヶ月または適した免疫応答が達成されるまで続く処置の経過とともに、分子への被験体の応答性に依存する。当業者は、最適な投薬量、投薬方法論、および繰り返し率を日常的に決定する。最適な投薬量は、抗体の相対的な効能に応じて変化し得、概して、インビトロおよび/またはインビボ動物モデルにおいて効果的であることが見出されたEC₅₀に基づいて推定され得る。投薬量は、典型的には、体重のkgあたり0.01 µg~100 g(例えば、体重のkgあたり1 µg~100 mg、10 µg~10 mg、または50 µg~500 µg)である。本明細書において提供される分子を含む組成物は、1日に、1週間に、1ヶ月に1回もしくは複数回、またはさらに低頻度で与えられ得る。

【0047】

30

本明細書において提供される分子に加えて、本明細書において記載される組成物は、特異的免疫応答を引き起こすと思われる抗原をさらに含み得る。適した抗原は、例えば、腫瘍および病原生物体によって発現されるポリペプチドまたはポリペプチドのフラグメントを含む。殺傷されたウィルスおよびバクテリアの構成要素に加えて、殺傷されたウィルスおよびバクテリアも、有用な抗原である。そのような抗原は、腫瘍または病原体に対する免疫応答を刺激し得る。

【0048】

本明細書において特徴とされる分子(例えば、sHlgM12などの抗体)は、その他の分子、分子構造体、または例えばリポソーム、受容体標的分子などの化合物の混合物、または取り込み、分布、および/もしくは吸収において補助する経口、局所、もしくはその他の製剤と、混和、カプセル化、結合またはそうでなければ関連され得る。

40

【0049】

いくつかの態様において、組成物は、薬学的に許容される担体との組み合わせにおいて、本明細書において提供される分子(例えば、sHlgM12、SEQ ID NO:6もしくはSEQ ID NO:8と少なくとも80.0%同一であるアミノ酸配列を含むポリペプチド、SEQ ID NO:6もしくはSEQ ID NO:8に既定される配列と少なくとも80.0%同一なアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸、またはSEQ ID NO:13もしくはSEQ ID NO:14に既定される配列と少なくとも80.0%同一であるヌクレオチド配列を含む核酸分子)を含み得る。薬学的に許容される担体は、被験体に抗体を送達するための薬学的に許容される溶剤、懸濁剤、または任意のその他の薬理的に不活性な賦形剤である。薬学的に許容される担体は、液体または固

50

体であり得、一つまたは複数の治療的化合物および与えられる薬学的組成物の任意のその他の構成要素と組み合わせられる場合、望ましいバルク、硬度、ならびにその他の付属物輸送および化学的特性を提供するために、投与の計画された様式を考慮して選択され得る。典型的な薬学的に許容される担体は、水；食塩溶液；結合剤(例えば、ポリビニルピロリドンまたはヒドロキシプロピルメチルセルロース)；充填剤(例えば、ラクトースおよびその他の糖、ゼラチン、または硫酸カルシウム)；潤滑剤(例えば、デンプン、ポリエチレングリコール、または酢酸ナトリウム)；崩壊剤(例えば、デンプンまたはデンプングリコール酸ナトリウム)；および湿潤剤(例えば、ラウリル硫酸ナトリウム)を非限定的に含む。

【0050】

10

本明細書において提供される分子を含む薬学的組成物は、局部または全身処置が望ましいかどうかに応じて、多くの方法によって投与され得る。投与は、例えば、非経口(例えば、皮下、髄腔内、心室内、筋内、もしくは腹腔内注射によって、または静脈内(i.v.)点滴によって)；経口；局所(例えば、経皮、舌下、点眼、または鼻腔内)；または肺(例えば、粉末またはエアロゾルの吸入または吹送によって)であり得る。投与は、迅速(例えば、注射によって)であり得る、または時間の期間にわたって(例えば、徐注入または徐放製剤の投与によって)生じ得る。中枢神経系への投与に対しては、抗体は、典型的には血液脳関門の浸透を促進することが可能な一つまたは複数の薬剤とともに、脳脊髄液に注射または注入され得る。

【0051】

20

非経口、髄腔内、または心室内投与に対する組成物および製剤は、滅菌水性溶液(例えば、滅菌生理食塩水)を含み、バッファー、希釈剤、およびその他の適した添加剤(例えば、浸透促進剤、担体化合物、およびその他の薬学的に許容される担体)を含んでもよい。

【0052】

経口投与に対する組成物および製剤は、例えば、粉末もしくは顆粒、水もしくは非水性媒質における懸濁液もしくは溶液、カプセル、小袋、または錠剤を含む。そのような組成物は、増粘剤、香料添加剤、希釈剤、乳化剤、分散補助、または結合剤を取り込んでもよい。

【0053】

30

局所投与に対する製剤は、例えば、滅菌および非滅菌水性溶液、アルコールなどの一般的な溶剤における非水性溶液、または液体もしくは固体油性基剤における溶液を含む。そのような溶液は、バッファー、希釈剤、およびその他の適した添加剤を含んでもよい。局所投与に対する薬学的組成物および製剤は、経皮パッチ、軟膏、ローション、クリーム、ゲル、ドロップ、坐薬、噴霧、液体、および粉末を含み得る。従来の薬学的担体、水性、粉末、または油性基剤、増粘剤、および同様のものは、有用であり得る。

【0054】

薬学的組成物は、溶液、乳液、水性懸濁液、およびリポソーム含有製剤を含むが、それらに限定されない。これらの組成物は、例えば、予備成形液体、自己乳化固体、および自己乳化半固体を含む様々な構成要素から生成され得る。乳液製剤は、それらの製剤の容易さならびに可溶化、吸収、および生体利用性の効力のため、治療的組成物の経口送達に対して特に有用である。リポソームは、薬物送達の観点から、それらが提供するそれらの特異性および作用の期間により、特に有用であり得る。

40

【0055】

本明細書において特徴とされる分子は、被験体への投与に際して、生物学的活性代謝体またはその残基を(直接的または間接的に)提供することが可能な、任意の薬学的に許容される塩、エステル、またはそのようなエステルの塩、または任意のその他の化合物を包含し得る。従って、例えば、本明細書は、抗体(例えば、sHlgM12)などの分子の薬学的に許容される塩、プロドラッグおよびそのようなプロドラッグの薬学的に許容される塩、ならびにその他の生物学的等価物を提供する。プロドラッグは、不活性型において調製され、内因性酵素の作用またはその他の化学物質および/もしくは状態によって、体またはその

50

細胞内で活性型(すなわち、薬物)に変換される治療的薬剤である。「薬学的に許容される塩」という語は、本明細書において記載される方法において有用な抗体の生理学および薬学的に許容される塩を指す(すなわち、望ましくない毒物学的効果を与えることなく親抗体の望ましい生物学的活性を保有する塩)。薬学的に許容される塩の例は、カチオン(例えば、ナトリウム、カリウム、カルシウム、またはスベルミンなどのポリアミン)で形成される塩；無機酸(例えば、塩酸、臭化水素酸、硫酸、リン酸、または硝酸)で形成される酸付加塩；有機酸(例えば、酢酸、クエン酸、シュウ酸、パルミチン酸、またはフマル酸)で形成される塩；および元素アニオン(例えば、臭素、ヨウ素、または塩素)で形成される塩を含むが、それらに限定されない。

【0056】

10

組成物は、薬学的組成物において従来的に見出されたその他の付属構成要素を付加的に含み得る。したがって、組成物は、例えば、痒み止め薬、収斂剤、局部麻酔剤、もしくは抗炎症剤などの適合性の薬学的活性物質、または色素、香料添加剤、防腐剤、抗酸化物質、乳白剤、増粘剤、および安定剤などの、本明細書において提供される組成物の様々な調剤型を物理的に製剤することにおいて有用な付加的な物質を含んでもよい。さらに、組成物は、例えば、潤滑剤、防腐剤、安定剤、湿潤剤、乳化剤、浸透圧に影響する塩、バッファー、着色剤、香味料、浸透促進剤、および芳香剤などの助剤と混合され得る。しかしながら、添加される場合、そのような物質は、本明細書において提供される組成物内のPNA構成要素の生物学的活性を過度に干渉するべきではない。

【0057】

20

単位投薬形態で便宜的に提示され得る、本明細書において開示されるような薬学的製剤は、薬学的業界において周知の従来の技術に従って調製され得る。そのような技術は、活性成分(すなわち、抗体)を望ましい薬学的担体と関連付ける段階を含む。典型的には、製剤は、活性成分を液体担体または微粉化固体担体または両方と均一におよび密接に関連付けることによって、次いで、必要な場合は、製品を成形することによって調製され得る。製剤は、滅菌の方法が製剤に含まれる抗体の有効性を干渉しないならば、必要に応じて滅菌され得る。

【0058】

組成物は、非限定的に、錠剤、カプセル、液体シロップ、ソフトゲル、坐薬、および浣腸剤などの多くの起こり得る任意の調剤型へ処方され得る。組成物は、水性、非水性、または混合媒質における懸濁液として処方されてもよい。水性懸濁液は、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ソルビトール、および/またはデキストランを含む、懸濁液の粘度を増加する物質をさらに含み得る。懸濁液は、安定剤を含んでもよい。

30

【0059】

5. 方法

本明細書において提供される方法は、典型的には、本明細書において提供される分子(例えば、sHlgM12などの抗体)または組成物(例えば、sHlgM12を含む組成物)を、哺乳動物(例えば、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ウサギ、ラット、マウス、またはヒト)に投与することを含む。

【0060】

40

上に記載されるように、分子、組成物、または活性化DCは、任意の適した全身または局部方法によって投与され得る。投与の全身方法は、経口、局所、または非経口投与、ならびに注射による投与を非限定的に含む。投与の局部方法は、例えば、腫瘍への直接的な注射を含む。

【0061】

本明細書において使用されるように、「有効量」という用語は、哺乳動物レシピエントにおける喘息症候の発生を少なくとも10%減少もしくは阻害するのに十分である、または気流、肺容量、および/もしくは気道反応性を少なくとも10%(例えば、10%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%)増加し得る、分子または組成物の量である。いくつかの態様において、本明細書に

50

において提供される方法は、喘息症候の発生を少なくとも50%減少または阻害するのに十分である組成物の量を、哺乳動物に投与することを含み得る。

【0062】

例えば、分子(例えば、sHIgM12などの抗体)の「有効量」とは、分子の投与に先行するまたは分子の投与なしの哺乳動物における症候のレベルと比較して、処置哺乳動物における症候の発生を少なくとも10%減少または阻害する量であり得る。

【0063】

6. 製造の品物

本明細書において提供される製造の品物は、本明細書において開示される一つまたは複数の分子および/または組成物を含み得る。分子および/または組成物は、包装材料と組み合わせられ、アレルギー性喘息を治療またはその発症を低減させるためのキットとして売られ得る。分子および/または組成物は、例えば、バイアル、チューブ、またはシリンジなどの容器に入れられ得、少なくとも部分的に包装材料で包囲され得る。製造の品物を産生するための構成要素および方法は、周知である。

【0064】

製造の品物は、上のセクションに提示される分子の一つまたは複数を組み合わせて得る。例えば、製造の品物は、本明細書において提供される分子(例えば、sHIgM12などの抗体)を含む組成物を含み得る。製造の品物は、特定の免疫応答を刺激し得る一つまたは複数の抗原(例えば、腫瘍抗原または病原体からの抗原)を含んでもよい。製造の品物は、例えば、免疫応答を増強するためのバッファーまたはその他の対照試薬を含んでもよい。取扱説明書も、そのようなキットに含まれ得る。

【0065】

本発明は、特許請求の範囲において記載される本発明の範囲を限定しない、以下の実施例においてさらに記載されると思われる。

【0066】

実施例

実施例1- sHIgM12を単離するおよび特徴付けるための材料および方法

ヒト抗体の単離- ヒト血清試料は、タンパク異常血症クリニックから獲得され、20 mg/mlよりも高いIgクローンピークを示すものが、さらなる評価のために選ばれた。選択された試料は、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、リンパ腫、および意味未確定のモノクローナル免疫グロブリン血症を含む、モノクローナルIgMスパイクによって特徴付けられる多種多様な状態をともなう50人の患者からであった。血清は、水に対して透析され、沈殿は、14,000 rpmで30分間遠心することによって収集され、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)に溶解された。試料は、遠心され、Superose-6カラム(Amersham Pharmacia, Piscataway, NJ)でのクロマトグラフィーを受けた。IgM画分は、プールされ、SDS-PAGEによって分析され、タンパク質濃度は、280 nmにおける吸光度を読むことによって決定された。IgM溶液は、滅菌フィルターされ、凍結保存された。抗体sHIgM12は、同定された(実施例2を参照されたい)。ポリクローナルヒトIgM抗体対照は、以前に記載された(Miller et al. (1994) J. Neurosci. 14:6230-6238)。

【0067】

単量体sHIgM12は、200 mM トリス、150 mM NaCl、1 mM EDTA pH 8.0における5 mM ジチオスレイトール(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)を用いた室温で2時間の還元によって、五量体型から獲得された。その後のアルキル化は、12 mM ヨードアセトアミドを用いて氷上で1時間行なわれた。IgM単量体は、PBSで平衡化されたSuperdex-200カラム(Amersham Pharmacia)でのクロマトグラフィーによって単離され、還元および非還元SDS-PAGEによって特徴付けられた。

【0068】

実施例14- 組換えヒトIgM抗体の産生

sHIgM12などの対象となる抗体が同定されたら、不死化供給源が、これらの重要な試薬を持続するために生成される。ベクターシステムが開発され、sHIgM12ならびにヴァルデ

ンストレームマクログロブリン血症患者の血清において同定された別のヒトIgM抗体(sHIgM22)を不死化するために使用された。抗体のアミノ酸配列は、血清から生成されたFvフラグメントから決定された。悪性B細胞は、ヴァルデンストレーム患者の血液中を循環するので、最高血清濃度で存在するsHIgM22抗体の重および軽鎖遺伝子をコードするcDNAは、うまく単離された。これらのcDNA配列は、患者抗体に由来する可変領域をコードするゲノムヒトIgM重鎖遺伝子を生成するために使用され、cDNAに基づく軽鎖遺伝子は、サイトメガロウィルス(CMV)プロモーターの制御下で発現された。これらの抗体遺伝子配列は、SV40プロモーターの制御下で発現される選択可能なdHfR遺伝子とともに単一ベクター(図14)に取り込まれた。合成抗体遺伝子を持つベクターは、電気穿孔法によってF3B6ハイブリドーマ細胞に導入された。メトトレキサート耐性細胞は、培養培地におけるメトトレキサートの量を上げていくことによって、選択されかつ増幅された。上清のmlあたり100 µg抗体を発現するクローンが回収された。組換え抗体は、患者血清から単離された抗体に対して同定されたすべての機能的特性を示した。

【0069】

この同じ手順は、sHIgM12の組換え供給を生成するために使用された。sHIgM12のアミノ酸配列解析が得られた。抗体重鎖のアミノ末端はブロックされていたので、アミノ末端配列を得る効率性を増加させるために、Fvフラグメントが生成された。sHIgM12重鎖のアミノ末端配列は、

Val-Gln-Leu-Gln-Glu-Ser-Gly-Pro-Gly-Leu-

Leu-Lys-Pro-Ser-Glu-Thr-Leu-Arg/Ser-Leu-Thr-Asn (SEQ ID NO:4)

であることが決定され、軽鎖のアミノ末端配列は、

Asp-Ile-Gln-Met-Thr-Gln-Ser-

Pro-Ser-Ser-Leu-Ser-Ala-Ser-Val-Gly-Asp-Arg-Val (SEQ ID NO:5)

であることが決定された。

【0070】

cDNAは、sHIgM12をコードするmRNAの完全長cDNAコピーを回収することに対して使用されるために、患者の末梢血細胞から単離された。回収されたcDNAが本当に対象となる抗体を示したのかを裏付けるために、sHIgM12のCDR3領域のアミノ酸配列が決定された。これは、Fvフラグメントのタンパク質溶解性分解および分解産物の従来のアミノ酸シーケンシングによって遂行された。sHIgM12 cDNAが獲得されると、それらは、上に記載されるのと同様であるが軽鎖定常領域を置換することによってIgM/Kappa抗体の発現に対して改変されたベクターに挿入された。次いで、組換えsHIgM12は、上に記載されるように、ヒト/マウスハイブリドーマ系F3B6において発現された。sHIgM12軽鎖の可変(Vk)および定常(Ck)ドメインに対するアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO:6および7に記載する。sHIgM12重鎖の可変(Vh)および定常(CH1、CH2、CH3、およびCH4)ドメインに対するアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO:8、9、10、11、および12に記載する。これらのアミノ酸配列は、図19Aおよび19Bにおいても提供される。sHIgM12軽および重鎖の可変領域をコードするヌクレオチド配列は、図20において示される(それぞれSEQ ID NO:13および14)。改変ベクターも、ヒト抗体rHIgM46を発現するために成功して使用された。

【0071】

その他の態様

本発明は、その詳細な説明と併せて記載されているが、前述の説明は、例示することを意図されており、添付の特許請求の範囲によって定義される、本発明の範囲を限定することを意図されないことが理解されるべきである。その他の局面、利点、および改変は、特許請求の範囲内である。

【図面の簡単な説明】

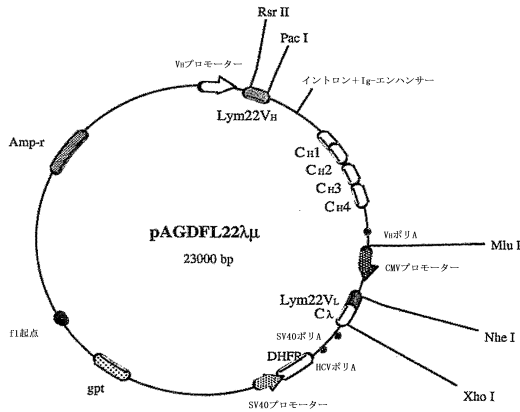
【0072】

【図14】図14は、抗体を産生するために使用され得る発現ベクターの地図である。

【図19】図19Aは、sHIgM12軽鎖の可変(Vk)および定常(Ck)領域のアミノ酸配列(それぞれ、SEQ ID NO:6および7)を示す。図19Bは、sHIgM12重鎖の可変(Vh)および定常(CH1、CH2、CH3、CH4)領域のアミノ酸配列(それぞれ、SEQ ID NO:8、9、10、11、および12)を示す。

【図20】図20は、sHIgM12のVkおよびVh領域コードする核酸配列(それぞれ、SEQ ID NO:13および14)を示す。

【図14】



【図19A】

Vk:
 DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASGSISSYLNWYQQKPKAPKVIYAASLRSGVP
 SRFSGSGGTDFTLTVSSSLQPEDFATYYCQQSYHTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO:6)

Ck:
 RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:7)

【 1 9 B 】

Vh: QVQLQESGPGLLKPSSETLSLTCTVSGGSVSLYYMSWIRQSPGKEPEWIGYIYSSGSDYNPSLRSRV
TISLDTSNRFLNLRSVTAADTAVYWCARSASIRGWFDPWGQGLTVYSS (SEQ ID NO:8)

CH1: GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSTFFSWKYKNNSDISSSTRGFPSVLRGGKYAA
TSQVLLPSKDYMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVLP (SEQ ID NO:9)

CH2: VIAELPPKVSFVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVYTTDQVQAEAKES
GPTTYKVTSTLTIKESDWLSQSMFTCRVDHRGLTFFQNASMCVP (SEQ ID NO:10)

CH3: DQDQTAIRVFAIPPSFASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRONGEAVKHTHNISESHPNATFSAVG
EASICEDDWNSGERFTCTVHTHDLPSPLKQTISRPK (SEQ ID NO:11)

CH4: GVALHRPDVYLLPPAREQLNLRRESATITCLVTFSPADVQVMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQA
PGRYFAHSILTVSEEWNTGETYTCVVAHEALPNRVTERVTVDKSTGKPTLYNLSVMSDTAGTCY
(SEQ ID NO:12)

【 2 0 】

Vk: GACATCCAGATGACCCAGTCCATCCTCCTCTGCTCGGTGTAGGACAGAGTACCATCACTTG
CCGGCAAGTCAGAGATTAAGTAGTTATCAAAATGGTATCAGCAGAAACCCAGGAAAGCCCTAAGG
TCCTGATCTATGCTGCATCCACTTTCGAAAGTGGGGTCCCGTCAAGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGG
ACAGATTCACCTCACCGTCAGCAGTGCACACCTGAAGATTTTGCACCTACTACTGCAACAGAGTT
ACCATACCCCGTGGACGTTCCGGTCCAGGGGACC AAGGTGGAATCAAAACGAACTGTGGCTGCAC
(SEQ ID NO:13)

Vh: CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGGTCCAGGACTGCTGAAGCCTTCGGAGACCCCTGTCCTCACATGCA
CTGCTCTGGTGGCTCGTCACTTTACTGAGTGGAGTGGATCCGGCAGTCCCGCAGGAAAGAACCC
GGAGTGGATTGGATATATCTATTCCAGTGGAAAGCACCGATTACAACCCCTCCCTCAGGAGTCGAGTCA
CCATACACTGGACACGTCAAAACCCGGTTTCCCTAAACCTGAGGCTGTGACCCCGCAGATACA
GCGGTCTATTGGTGTGGAGAAAGTGGTCAATTAGGGGCTGGTTCCGACCCCTGGGGGCCAGGGAACCC
TGGTCACCCGTCCTCAGGGAGTGCATCCGCC
(SEQ ID NO:14)

【 配列表 】

0005902367000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	A 6 1 P	37/02
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	A 6 1 P	37/08
			C 0 7 K	16/28
			G 0 1 N	33/53
				Z N A
				P

- (72)発明者 ラダクリシュナン スーシュ
アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスター 49 - 1 / 2 レーン ノースイースト 2105
- (72)発明者 ヴァン コイレン ヴァージニア
アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスター 第15 ストリート サウスイースト 3005
- (72)発明者 チリチ ボゴルフ
アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 フィラデルフィア フランクリン タウン ブールバード
1 アパートメント #1107
- (72)発明者 飯島 宏治
アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスター イースト センター ストリート 626
- (72)発明者 紀太 博仁
アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスター キングス ラン ドライブ ノースウエスト 17
14

合議体

審判長 鈴木 恵理子
審判官 中島 庸子
審判官 飯室 里美

- (56)参考文献 J . Neuropathol Exp . Neurol . 2004 May ; 63 (5) : 4
61 - 473

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

IPC C12N 15/00-15/90
PubMed
JSTPlus(JDreamII)
WPI/BIOSIS/CAPLus(STN)
GeneCards
Uniprot/GeneSeq
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq

专利名称(译)	抗体		
公开(公告)号	JP5902367B2	公开(公告)日	2016-04-13
申请号	JP2007520393	申请日	2005-06-30
[标]申请(专利权)人(译)	梅奥基金会四医学教育家李化研究		
申请(专利权)人(译)	梅奥基金会四医学教育家李化研究		
当前申请(专利权)人(译)	梅奥基金会的医学教育和研究		
[标]发明人	ピースラリーアール ラダクリシュナン スーシュ ヴァンコイレン ヴァージニア チリチボゴルフ 飯島宏治 紀太博仁		
发明人	ピース ラリー アール. ラダクリシュナン スーシュ ヴァン コイレン ヴァージニア チリチ ボゴルフ 飯島 宏治 紀太 博仁		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61P11/06 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/28 G01N33/53		
CPC分类号	A61P11/06 C07K16/2827 C07K2317/56 C07K2317/74		
FI分类号	C12N15/00.A A61K39/395.D A61K39/395.M A61K39/395.N A61P11/06 A61P37/02 A61P37/08 C07K16/28.ZNA G01N33/53.P		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	10/881661 2004-06-30 US 10/983104 2004-11-05 US		
其他公开文献	JP2008505639A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

作为抗体序列，公开了能够增强免疫应答和改变现有免疫活性条件的抗体。包含抗体和组合物的组合物，所述组合物包含抗体以增强免疫应答，增强DC功能，改变现有的免疫应答条件，免疫个体，或治疗或抑制诸如过敏性哮喘的病症并且还描述了使用该组合物的方法。

(21) 出願番号	特願2007-520393 (P2007-520393)	(73) 特許権者	501083115
(86) (22) 出願日	平成17年6月30日 (2005. 6. 30)		メイヨ・ファウンデーション・フォー・メディカル・エデュケーション・アンド・リサーチ
(65) 公表番号	特表2008-505639 (P2008-505639A)		
(43) 公表日	平成20年2月28日 (2008. 2. 28)		
(86) 国際出願番号	PCT/US2005/023440		アメリカ合衆国、ミネソタ州 55905
(87) 国際公開番号	W02006/004988		、ロチェスター、ファースト・ストリート・サウスウエスト 200
(87) 国際公開日	平成18年1月12日 (2006. 1. 12)	(74) 代理人	100102978
審査請求日	平成20年1月10日 (2008. 1. 10)		弁理士 清水 初志
審判番号	不服2011-24378 (P2011-24378/11)	(74) 代理人	100128048
審判請求日	平成23年11月11日 (2011. 11. 11)		弁理士 新見 浩一
(31) 優先権主張番号	10/881, 661	(72) 発明者	ピース ラリー アール、 アメリカ合衆国 ミネソタ州 ロチェスター コーリン レーン ノースイスト 2426
(32) 優先日	平成16年6月30日 (2004. 6. 30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	10/983, 104		
(32) 優先日	平成16年11月5日 (2004. 11. 5)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		