

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4216720号  
(P4216720)

(45) 発行日 平成21年1月28日 (2009. 1. 28)

(24) 登録日 平成20年11月14日 (2008. 11. 14)

(51) Int. Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/68 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68	Z N A Z
C 1 2 N 15/09 (2006. 01)	C 1 2 Q 1/68	A
G O 1 N 27/447 (2006. 01)	C 1 2 N 15/00	A
G O 1 N 33/53 (2006. 01)	G O 1 N 27/26	3 O 1 A
G O 1 N 33/566 (2006. 01)	G O 1 N 33/53	M
請求項の数 20 (全 36 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2003-538404 (P2003-538404)  
 (86) (22) 出願日 平成14年10月11日 (2002. 10. 11)  
 (65) 公表番号 特表2005-506093 (P2005-506093A)  
 (43) 公表日 平成17年3月3日 (2005. 3. 3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2002/011397  
 (87) 国際公開番号 W02003/035904  
 (87) 国際公開日 平成15年5月1日 (2003. 5. 1)  
 審査請求日 平成17年9月9日 (2005. 9. 9)  
 (31) 優先権主張番号 01402718.9  
 (32) 優先日 平成13年10月19日 (2001. 10. 19)  
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 504154665  
 サントル・オスピタリエ・レジオナル・エ  
 ・ユニヴェルシタイル・ドゥ・トゥール  
 CENTRE HOSPITALIER  
 REGIONAL ET UNIVERS  
 ITAIRE DE TOURS  
 フランス国、エフー37044 トゥール  
 ・セデックス、ブルヴァール・トネル  
 2  
 (73) 特許権者 504022515  
 イネイト・ファーマ  
 INNATE PHARMA  
 フランス国、エフー13009 マルセイ  
 ユ、アンシヤン・シュマン・デ・カシ、イ  
 ムーブル・グラン・ブレ 121  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体処置応答を評価するための方法および組成物

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験者の Fc R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基をインビトロで決定すること及び被験者において標的細胞を著減させる治療用抗体処置に対する被験者の応答を査定するためのデータを与えることを含む方法であって、1 5 8 位のフェニルアラニンが、処置に対するより低い応答を示し、抗体が I g G である、方法。

【請求項 2】

治療用抗体処置に対する患者を選択するためのデータを与えることをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

被験者における治療用抗体処置の効力または処置条件もしくはプロトコルを改良するためのデータを与えることをさらに含む、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

Fc R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、Fc R I I I a 受容体遺伝子もしくは R N A またはアミノ酸残基 1 5 8 をコード化するヌクレオチドを含むそれらの一部を配列決定する工程を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

Fc R I I I a 受容体の 1 5 8 位のアミノ酸残基の決定が、Fc R I I I a 受容体遺伝子もしくは R N A またはアミノ酸残基 1 5 8 をコード化するヌクレオチドを含むそれらの一部を増幅する工程を含む、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

## 【請求項 6】

増幅を、PCR、RT-PCRおよびネステッドPCRのようなポリメラーゼ連鎖反応(PCR)で実施する、請求項 5に記載の方法。

## 【請求項 7】

Fc RIIIIa 受容体の158位のアミノ酸残基の決定が、対立遺伝子特異的制限酵素消化の工程を含む、請求項 1 ~ 6のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 8】

Fc RIIIIa 受容体の158位のアミノ酸残基の決定が、Fc RIIIIa 受容体遺伝子もしくはRNAまたはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むそれらの一部と、遺伝子型バリンまたはフェニルアラニンに特異的な核酸プローブとのハイブリダイゼーション工程を含む、請求項 1 ~ 7のいずれか1項に記載の方法。

10

## 【請求項 9】

Fc RIIIIa 受容体の158位のアミノ酸残基の決定が、  
 - 生物学的サンプルからゲノムDNAを得ること、  
 - Fc RIIIIa 受容体遺伝子、またはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅すること、及び  
 - 前記Fc RIIIIa 受容体遺伝子の158位のアミノ酸残基を決定すること、  
 を含む、請求項 1 ~ 8のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 10】

Fc RIIIIa 受容体の158位のアミノ酸残基の決定が、  
 - 生物学的サンプルからゲノムDNAを得ること、  
 - Fc RIIIIa 受容体遺伝子、またはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅すること、  
 - 対立遺伝子特異的制限部位を導入すること、  
 - 前記制限部位に特異的な酵素で核酸を消化すること、及び  
 - 消化産物を分析すること、すなわち、電気泳動で、消化産物の存在が対立遺伝子の存在を示すこと、  
 を含む、請求項 1 ~ 8のいずれか1項に記載の方法。

20

## 【請求項 11】

Fc RIIIIa 受容体の158位のアミノ酸残基の決定が、インビトロまたはエキソピボでの、細胞または生物学的サンプルもしくは流体からの総(またはメッセンジャー)RNA抽出、cDNA合成、特異的オリゴヌクレオチドプライマーによる(PCR)増幅、およびPCR産物の分析を含む、請求項 1 ~ 8のいずれか1項に記載の方法。

30

## 【請求項 12】

Fc RIIIIa 受容体の158位のアミノ酸残基の決定が、Fc RIIIIa 受容体ポリペプチドまたはアミノ酸残基158を含むその一部を配列決定する工程を含む、請求項 1 ~ 3のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 13】

被験者がヒト被験者である、請求項 1 ~ 12のいずれか1項に記載の方法。

## 【請求項 14】

被験者が、腫瘍、ウイルス感染症、または同種もしくは病理学的免疫担当細胞と関連した疾患状態を有する、請求項 13に記載の方法。

40

## 【請求項 15】

被験者が腫瘍を有し、治療用抗体処置が腫瘍負担の減少を目標とする、請求項 14に記載の方法。

## 【請求項 16】

腫瘍がリンパ腫である、請求項 15に記載の方法。

## 【請求項 17】

リンパ腫がNHLである、請求項 16に記載の方法。

## 【請求項 18】

50

抗体が I g G 1 または I g G 3 である、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 1 9】

抗体が抗 C D 2 0 抗体である、請求項 1 8 に記載の方法。

【請求項 2 0】

抗 C D 2 0 抗体がリツキシマブである、請求項 1 9 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、特定の治療的処置に対する被験者の応答を評価または査定するための方法および組成物に関する。より詳細には、本発明は、被験者の応答を決定する方法、または治療用抗体で処置される被験者の治療プロトコルを適合させる方法を提供する。本発明は、悪性腫瘍、特にリンパ腫の患者に使用することができ、また最高の応答者を選択しかつ/または低応答者向けに処置条件またはプロトコルを調整するのに適する。

10

【背景技術】

【0002】

序文

ヒトにおける様々な治療方針は、治療用抗体の使用を基本とする。これは、たとえば、標的細胞、特に罹患細胞、たとえばウイルス感染細胞、腫瘍細胞または同種異系免疫担当細胞を含む他の病原細胞を著減させるために開発された治療用抗体の使用を含む。一般に、このような抗体は、I g G 種、一般に I g G 1 および I g G 3 の、モノクローナル抗体である。こうした抗体は、様々な種または起源由来の機能ドメインまたは特異性を含む、組換え抗体およびヒト化抗体であってもよい。このような治療用抗体の具体例は、ネズミ可変領域に連結したヒト  $\text{CD}20$  I g G 1 モノクローナル抗体である、リツキシマブ（マブテラ（Mabthera）（登録商標）、リツキササン（Rituxan）（登録商標））である<sup>1</sup>。数年間にわたって、リツキシマブは、Bリンパ増殖性悪性腫瘍、特に非ホジキンリンパ腫（NHL）に対する治療方針をかなり修正してきた。原型を保ったヒト化 I g G 1 抗体の他の例としては、B細胞悪性腫瘍の処置に使用されるアレムツズマブ（alemtuzumab）（キャンパス 1 H（Campath-1H）（登録商標））、または乳癌の処置に使用されるトラスツズマブ（trastuzumab）（ハーセプチン（Herceptin）（登録商標））などがある。開発中の治療用抗体のさらなる例は、当該技術分野で

20

30

【0003】

これらの抗体は、特に腫瘍を処置するためのヒト治療の、新規な効果的な方法を代表するが、常に強力な効果を示すとは限らず、それらの使用は、それらに対する対象の応答を評価することにより改良することができる。たとえば、単独のまたは化学療法と併用したリツキシマブは、低悪性度 NHL<sup>2-8</sup> および高悪性度 NHL<sup>6,9</sup> の両者の処置に有効なことが証明されていたが、低悪性度 NHL の患者の 30% ~ 50% は、リツキシマブに対する臨床応答を示さなかった<sup>4,5</sup>。リンパ腫細胞上での CD 2 0 発現レベル<sup>2</sup>、処置時における高い腫瘍負担の存在<sup>6</sup> または低い血清リツキシマブ濃度<sup>2</sup> が、一部の患者でリツキシマブの効果が欠如している理由であることが示唆されてきた。しかし、処置不成功の実際の原因は、大部分は不明のままである。

40

【0004】

抗体処置に対する患者応答の評価を可能にする方法を利用できることにより、これらの製品の治療効力が大いに高められるであろう。しかし、このような治療用抗体の精確なインビボ（in vivo）作用様式は、明白に立証されていない。事実、インビトロ（in vitro）試験から、リツキシマブの様々な可能性のある作用様式（抗体依存性細胞介在性細胞傷害（ADCC）<sup>10,11</sup>、補体依存性細胞傷害<sup>10,12,13</sup>、アポトーシスにつながる直接情報伝達<sup>14,15</sup>等々）が示唆されるが、インビボにおけるこれらの標的細胞著減抗体の明白な作用は、ヒトで立証されていない。さらに、ADCC は細胞内病原体および腫瘍細胞の根絶における重要なエフェクター機構であるが、ADCC の役割は未だ議論の余地がある<sup>12</sup>

50

, 13。

## 【 0 0 0 5 】

本発明は、ここで、治療用抗体に対する対象の治療的応答を査定するための新規な方法および組成物を提示する。本発明は、治療用抗体処置に対して最高の応答プロフィールを有する患者を選択する方法も提示する。本発明は、患者の応答を評価する事前工程を含む、治療用抗体で患者を処置する方法にも関する。本発明は、本発明を実施するのに適した組成物およびキットにも関する。本発明は、対象の応答を査定またはモニタリングするために、または抗体の作用様式を検証するために、臨床治験または実験環境でも使用することが可能である。

## 【 0 0 0 6 】

本発明は、ある程度、対象の遺伝子型と、治療用抗体処置に反応するその能力との間の相関関係の証明に基づく。より具体的には、本発明は、FcγRIIIa受容体の遺伝子型が、治療用抗体処置に対する対象の応答と直接的な相関関係があることを示す。

## 【 0 0 0 7 】

3種類のFcγR (FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIII) およびそれらのサブクラスは、ヒトでは、全て染色体1の長腕上に位置する、8つの遺伝子によりコード化されている。これらの遺伝子の幾つかは、異なる受容体特性を有するアロタイプを生成する機能的対立遺伝子多型を示す。これらの多型は、自己免疫性疾患または感染症<sup>19-21</sup>に対する罹病性を上昇させる遺伝因子として認定されてきた。これらの遺伝因子の1つは、アミノ酸158位にフェニルアラニン(F)またはバリン(V)のいずれかを有するFcγRIIIaをコード化する、FCGR3Aにおける遺伝子二型性である<sup>22, 23</sup>。この残基は、IgG1-FcγRIII共結晶化によって最近証明された<sup>24</sup>通り、IgG1の下側のヒンジ領域と直接、相互に作用する。ヒトIgG1は、ホモ接合型FcγRIIIa-158F型またはヘテロ接合型ナチュラル・キラー細胞(NK)よりホモ接合型FcγRIIIa-158V型NKに、より強く結合することが明白に証明されている<sup>22, 23</sup>。

## 【 0 0 0 8 】

我々は、FCGR3A遺伝子型と、治療用抗体処置に対するインビボでの患者応答との間の、可能性がある相関関係の評価に着手した。我々の発明の根幹は、幾分は、上記遺伝子型と上記応答プロフィールとの間に非常に強い相関関係が存在し、158位にバリン残基が存在することは、高い応答率を示すという、予期せぬ発見に由来する。より具体的には、リツキシマブのみを受けており、応答率が非常に高い特殊な状況にある、以前に処置を受けていなかった濾胞性NHL患者で、FCGR3Aの遺伝子型特定を実施した<sup>5</sup>。FCGR2A-131H/Rは、FCGR3Aと共に染色体1q22上に共局在化し、マクロファージFcγRIIIa受容体をコード化するので、対照として決定した。

## 【 0 0 0 9 】

以前に処置を受けていなかった濾胞性非ホジキンリンパ腫のためにリツキシマブを受けていた患者47例で、FCGR3A-158V/F遺伝子型が決定された。2ヶ月(M2)および1年(M12)に、臨床応答および分子応答を評価した。陽性の分子応答は、末梢血および骨髄の両者におけるBCL2-JH遺伝子再構成の消失として定義された。FCGR3A-158Vホモ接合型患者は21%であったが、FCGR3A-158Fホモ接合型およびヘテロ接合型患者(FCGR3A-158Fキャリアー)は、それぞれ34%および45%であった。M2およびM12における客観的応答率は、FCGR3A-158Vホモ接合型患者では100%および90%であったのに対して、FCGR3A-158Fキャリアーでは65%(p=0.02)および51%(p=0.03)であった。M12で、ホモ接合型FCGR3A-158V患者の5/6に陽性の分子応答が確認されたのに対して、FCGR3A-158Fキャリアーではその5/16であった(p=0.04)。さらに、ホモ接合型FCGR3A-158V遺伝子型は、臨床応答および分子応答と関連した単一パラメーターであることが多変量解析で立証され、また低率の疾患進行度とも関連していた(p=0.05)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 0 】

## 発明の効果

したがって、本発明は、FCGR3A遺伝子型と、治療用抗体に対する臨床応答および分子応答との間の関連を、初めて立証するものである。したがって、本発明は、患者の応答をモニター、評価または選択するために使用することができる第1の独特のマーカーを提供する。したがって、本発明は、悪性腫瘍、ウイルス感染症または病的細胞が対象に存在することに関連した他の疾患、特に非ホジキンリンパ腫の患者の管理に、新しい薬理遺伝学的方法を導入する。

## 【 0 0 1 1 】

本発明の目的は、対象のFCGR3A遺伝子型および/または上記被験者のFcRIIIa受容体に多型が存在することをインビトロで決定することを含む、治療用抗体処置に対する被験者の応答を査定する方法にある。より具体的には、本方法は、上記対象のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定することを含む。

10

## 【 0 0 1 2 】

本発明のさらなる目的は、被験者のFCGR3A遺伝子型および/または上記対象のFcRIIIa受容体に多型が存在することをインビトロで決定することを含む、治療用抗体処置に対する患者を選択する方法である。より具体的には、本方法は、上記被験者のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定することを含む。

## 【 0 0 1 3 】

本発明のもう1つの目的は、被験者のFCGR3A遺伝子型および/または上記被験者のFcRIIIa受容体に多型が存在することをインビトロで決定することを含む、被験者における治療用抗体処置の効力または処置条件またはプロトコルを改良する方法である。より具体的には、本方法は、上記被験者のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定することを含む。

20

## 【 0 0 1 4 】

より具体的には、被験者のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定することは、FcRIIIa受容体の158位のアミノ酸残基(またはFCGR3A遺伝子の対応するコドン)を決定することを含み、158位のバリンが上記処置に対するより良い応答を示し、158位のフェニルアラニンが上記処置に対する低い応答を示す。

## 【 0 0 1 5 】

本発明の中で、用語「治療用抗体または抗体」は、より具体的には、患者において、標的細胞を著減させる役目を果たす抗体を示す。このような標的細胞の具体例には、アレルギー、自己免疫疾患、同種異系反応等々に関する腫瘍細胞、ウイルス感染細胞、同種異系細胞、病理学的免疫担当細胞(たとえば、Bリンパ球、Tリンパ球、抗原提示細胞等々)、または健康な細胞(たとえば、抗血管形成治療方針における内皮細胞)さえも含まれる。本発明の脈絡の中で最も好ましい標的細胞は、腫瘍細胞およびウイルス感染細胞である。治療用抗体は、たとえば、特に抗体依存性細胞介在性細胞傷害(ADCC)により、細胞障害作用または細胞融解を仲介することが可能である。ADCCは、IgG感作抗原をFcR担持細胞障害性細胞に連結し、細胞活性化機構を始動させる機能を有する、IgGのFc部分(FcR)に対する白血球受容体を必要とする。この作用機序は、ヒトでは、インビボで立証されていないが、このような標的細胞除去治療用抗体の効力の説明となる。治療用抗体は、ポリクローナルによってもよく、好ましくは、モノクローナルによってもよい。治療用抗体は、ハイブリドーマ、または所望の可変領域および定常領域を発現するように操作された組換え細胞により産生することが可能である。抗体は、一本鎖抗体であってもよく、または抗原特異性および下側のヒンジ領域を保持する他の抗体誘導体またはその変異体であってもよい。これらは、多機能抗体、組換え抗体、ScFv、人化抗体、またはそれらの変異体であってもよい。治療用抗体は、表面抗原、たとえば、膜抗原に特異的である。最も好ましい治療用抗体は、腫瘍抗原(たとえば、腫瘍細胞に特異的に発現される分子)、たとえば、CD20、CD52、Erbb2(またはHER2/Neu)、CD33、CD22、CD25、MUC-1、CEA、KDR、aV<sub>3</sub>等々

30

40

50

、特にリンパ腫抗原（たとえば、CD20）に特異的である。治療用抗体は、好ましくはIgG1またはIgG3であり、より好ましくはIgG1である。

【0016】

本発明の治療用抗体の代表例は、リツキシマブ、アレムツズマブ（alemtuzumab）およびトラスツズマブ（trastuzumab）である。このような抗体は、ヒト対象での使用に関して認可された臨床プロトコールに従って使用することができる。治療用抗体のさらなる具体例としては、たとえば、下表に記載の通り、エブラツズマブ（epratuzumab）、バシリキシマブ、ダシリツマブ、セツキシマブ、ラベツズマブ（labetuzumab）、セビルマブ（sevirumab）、ツプリマブ（tuvurimab）、パリビズマブ（palivizumab）、インフリキシマブ、オマリズマブ、エファリズマブ、ナタリズマブ（natalizumab）、クレノリキシマブ等々が挙げられる：

【0017】

【表 1】

Ab特異性	DCI	商用名	代表的な適応症
抗CD20	リツキシマブ	マブテラ (MabThera (登録商標)) リツキサン (Rituxan (登録商標))	LNH B
抗CD52	アレムツズマブ (alemtuzumab)	キャンパス-1H (CAMPATH-1H (登録商標))	LLC, 同種移植片
抗CD33		ザミル (Zamyl (商標))	急性骨髄性白血病
抗HLA-DR		レミトゲン (Remitogen (商標))	LNH B
抗CD22	エブラツズマブ (epratuzumab)	リンフォサイド (LymphoCide (商標))	LNH B
抗erbB2 (HER-2/neu)	トラスツズマブ (trastuzumab)	ハーセプチン (Herceptin (登録商標))	転移性乳癌
抗EGFR (HER-1, erbB1)	セツキシマブ		ORLおよび結腸直腸癌
抗MUC-1		テレックス Therex (登録商標)	乳癌および上皮癌
抗CEA	ラベツズマブ (labetuzumab)	CEAサイド (CEA-Cide (商標))	
抗 $\alpha V \beta 3$		ビタキシン (Vitaxin)	癌(抗血管形成)
抗KDR (VEGFR2)			癌(抗血管形成)
抗-VRS 融合タンパク質	パリビズマブ (palivizumab)	シナジス (Synagis (登録商標))	ウイルス性疾患
Idem		ヌマックス (Numax (商標))	Idem
CMV	セビルマブ (sevirumab)	プロトビル (Protovir)	CMV感染症
HBs	ツビルマブ	オスタビル (Ostavir (商標))	B型肝炎
抗CD25	バシリキシマブ	シムレクト (Simulect (登録商標))	予防/処置 同種移植片拒絶
抗CD25	ダシリツマブ	ゼナパクス (Zenapax (登録商標))	予防/処置 同種移植片拒絶
抗TNF- $\alpha$	インフリキシマブ	レミケード (Remicade (商標))	クローン病, 多発性関節リウマチ
抗IgE	オマリズマブ	キソレア (Xolair (商標))	喘息
抗インテグリン $\alpha L$ (CD11a, LFA-1)	エファリズマブ	キサニリム (Xanelim (商標))	乾癬
抗CD4	ケリキシマブ (keliximab)		
抗CD2	シプリツマブ (siplizumab)		
抗CD64			貧血
抗CD147			GvH
抗インテグリン $\alpha 4$ ( $\alpha 4 \beta 1 - \alpha 4 \beta 7$ )	ナタリズマブ (natalizumab)	アンテグレン (Antegren (登録商標))	硬化症, クローン
抗インテグリン $\beta 7$			クローン, RCH
抗CD4*	クレノリキシマブ		

10

20

30

40

## 【0018】

本発明の脈絡の中で、対象または患者は、哺乳動物対象または患者、より好ましくはヒト対象または患者を含む。

## 【0019】

本発明によれば、用語FCGR3A遺伝子は、対象における、FcRIIIaポリペプチドをコードする核酸分子を指す。この用語は、特に、ゲノムDNA、cDNA、RN

50

A (プレ-rRNA、メッセンジャーRNA等々)等々、またはそれらの配列の全部または一部を含む合成核酸を含む。合成核酸は、RNAから調製され、たとえば1つ以上のイントロン、または1つ以上の突然変異を含む部分として、FCGR3AゲノムDNAの配列の少なくとも一部を含む、cDNAを含む。最も好ましくは、用語FCGR3A遺伝子は、ゲノムDNA、cDNAまたはmRNA、一般に、ゲノムDNAまたはmRNAを指す。FCGR3A遺伝子は、好ましくは、ヒトFCGR1IIa遺伝子または核酸である、すなわち、ヒトFcRIIIaポリペプチドの配列を有するFcRIIIaポリペプチドの全部または一部をコードする核酸の配列を含む。このような核酸は、既知の技術により単離または調製することができる。たとえば、このような核酸は、ハイブリダイゼーション技術で、遺伝子ライブラリーまたは遺伝子バンクから単離することが可能である。また、このような核酸は、遺伝学的または化学的に合成することもできる。ヒトFCGR1IIa遺伝子の遺伝子編成を図2に示す。ヒトFcRIIIaのアミノ酸配列は、図3に示す。アミノ酸158位は、成熟タンパク質の残基1から番号が付けられている。アミノ酸158位は、シグナルペプチドを有するプレタンパク質の残基176に対応する。野生型FCGR3A遺伝子の配列を、図4に示す(部分配列については、ジーンバンク(Genbank)寄託番号AL590385またはNM\_000569を参照されたい)。

10

## 【0020】

本発明の脈絡の中で、一部または部分は、少なくとも3ヌクレオチド(たとえば、コドン)、好ましくは少なくとも9ヌクレオチド、さらにより好ましくは少なくとも15ヌクレオチドを意味し、1000ヌクレオチドも含むことができる。このような部分は、当該技術分野で周知の技術、たとえば、酵素的および/または化学的切断、化学合成またはそれらの組合せによって得ることができる。明確にするために、アミノ酸158位をコード化するFCGR3A遺伝子の一部の配列を以下に示す：

20

## 【0021】

## 【表2】

cDNA	540	550	560	570	580
ゲノムDNA	4970	4980	4990	5000.	
158F 対立遺伝子	tcctacttctgcagggggcttttgggagtaaaaatgtgtcttca				
	S Y F C R G L <u>F</u> G S K N V S S				
158V 対立遺伝子	tcctacttctgcagggggcttgttgggagtaaaaatgtgtcttca				
	S Y F C R G L <u>V</u> G S K N V S S				

30

## 【0022】

上述の通り、本発明は、上記対象のFCGR3A158遺伝子型をインビトロで決定する方法を含む。これは、より詳細には、FcRIIIaポリペプチドの158位に存在する(またはコード化される)アミノ酸残基の性質を決定することを含む。

## 【0023】

上記対象におけるFCGR3A遺伝子または対応するポリペプチドの遺伝子型特定は、コーディング核酸分子またはコード化されたポリペプチドの分析を含む、様々な技術で達成することが可能である。分析は、配列決定、移動、電気泳動、免疫技術、増幅、特異的消化またはハイブリダイゼーション等々を含んでも良い。

40

## 【0024】

ある特定の実施形態において、FcRIIIa受容体の158位のアミノ酸残基の決定は、FCGR3A受容体遺伝子またはRNAまたはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部を配列決定する工程を含む。

## 【0025】

他の特定の実施形態において、FcRIIIa受容体の158位のアミノ酸残基決定は、FCGR3A受容体遺伝子またはRNAまたはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅する工程を含む。増幅は、たとえば、従来の方法およびプライマーを使用して、単純PCR、RT-PCRまたはネステッドPCRのようなポリ

50

メラゼ連鎖反応 (PCR) で、実施することが可能である。

【0026】

この点に関して、本発明で使用するための増幅プライマーは、より好ましくは、約50未満のヌクレオチド、さらにより好ましくは、30未満のヌクレオチド、一般に約25未満または20未満のヌクレオチドを含む。また、好ましいプライマーは、特異性を確実にするために、通常は少なくとも5ヌクレオチド、好ましくは少なくとも8ヌクレオチドを含む。プライマーの配列は、FCGR3A遺伝子の配列に基づいて、好ましくは、それと共に完全な補足性を与えるように調製することができる。放射能、蛍光、酵素的、化学的等々の既知の技術を使用して、プローブを標識することが可能である。この標識は、たとえばホスファール32 (Phosphor 32)、ビオチン (16-dUTP)、ジゴキシゲニン (11-dUTP) を使用することができる。当然のことながら、本発明は、特定の検出または標識技術に束縛または限定されるものではない。以下に開示する通り、プライマーは、増幅された核酸に対立遺伝子特異的制限部位を導入するための、制限部位をさらに含むことができる。

10

【0027】

このような増幅プライマーの具体例は、たとえば、配列番号1~4である。

【0028】

当然のことながら、当業者は、他のプライマー、たとえば増幅工程で使用するためのFCGR3A遺伝子の断片、および特に順方向配列および逆方向配列を含む1対のプライマーであって、FCGR3A遺伝子のある領域とハイブリダイズし、コドン158を含むFCGR3A遺伝子の少なくとも一部の増幅を可能にする上記対の上記プライマーをデザインすることができる。好ましい実施形態において、各対のプライマーは、コドン158と相補的であり、コドン158と重複し、かつ158V (g t t) と158F (t t t) との間の判別を可能にする、少なくとも1つのプライマーを含む。当業者は、周知の一般知識および明細書に記載の指針に基づいて、増幅条件も調節することができる。

20

【0029】

ある特定の実施形態において、本発明の方法は、このように、細胞または生物学的サンプル中の、特異的オリゴヌクレオチドプライマーを使用したFCGR3a mRNAまたはgDNAの一部のPCR増幅であって、上記部分がコドン158を含むPCR増幅と、たとえば、電気泳動、特に変性剤ゲル濃度勾配電気泳動 (Denaturing Gel Gradient Electrophoresis (DGGE)) によるPCR産物の直接または間接的分析とを含む。

30

【0030】

他の特定の実施形態において、FcRIIIa受容体の158位のアミノ酸残基の決定は、対立遺伝子特異的制限酵素消化の工程を含む。これは、ある特定の対立遺伝子 (たとえば、158V対立遺伝子) のコード配列を切断し、他の対立遺伝子 (たとえば、158F対立遺伝子、またはその逆) を切断しない制限酵素を使用することにより実施できる。このような対立遺伝子特異的制限酵素部位が配列中に天然に存在しない場合、このような部位を配列中に含む対立遺伝子特異的増幅プライマーを用いて核酸を増幅することにより、人工的にその中に導入することができる。増幅時の、対立遺伝子の存在の決定は、たとえば、電気泳動で、消化産物を分析することにより実行することが可能である。この技術は、選択された対立遺伝子に関して、ホモ接合型またはヘテロ接合型である対象の判別を可能にする。

40

【0031】

対立遺伝子特異的増幅プライマーの例としては、たとえば、配列番号3などが挙げられる。配列番号3は、N1am部位の第1の3ヌクレオチドを導入する。(5'-CATG-3')。Gの後ろで切断が起きる。このプライマーは、増幅産物の電気泳動分析を容易にするために、プライマーを伸長する、FCGR3Aとハイブリダイズしない11塩基と、制限部位をもたらずヌクレオチド31 (A) を除き、FCGR3Aにハイブリダイズする21塩基とを含む。

【0032】

さらなる特定の実施形態において、FcRIIIa受容体の158位のアミノ酸残基

50

の決定は、FCGR3A受容体遺伝子またはRNAまたはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部と、遺伝子型バリンまたはフェニルアラニンに特異的な核酸プローブとのハイブリダイゼーション工程、およびハイブリッドの有無の決定を含む。

#### 【0033】

当然のことながら、上記の方法は、単独または様々な組合せのいずれでも使用することができる。さらに、FCGR3A158遺伝子型を決定するための、当業者に周知の他の技術、たとえば増幅（たとえばPCR）、特異的プライマー、特異的プローブ、移動等々を使用する方法、一般的な定量的RT-PCR、LCR（リガーゼ連鎖反応）、TMA（転写介在増幅）、PCE（酵素増幅イムノアッセイ）およびbDNA（分岐DNAシグナル増幅）アッセイを使用することが可能である。

10

#### 【0034】

本発明の好ましい実施形態において、FcRIIIa受容体の158位のアミノ酸残基の決定は、以下を含む：

- 生体サンプルからゲノムDNAを得ること、
- FcRIIIa受容体遺伝子、またはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅すること、および
- 上記FcRIIIa受容体遺伝子の158位のアミノ酸残基を決定すること。

#### 【0035】

増幅は、上述の特異的プライマーを使用して、ネステッド（nested）PCRを含むPCRのような特定の技術で遂行することができる。最も好ましい実施形態において、158位のアミノ酸残基の決定は、対立遺伝子特異的制限酵素消化により実施される。その場合、本方法は以下を含む。

20

- 生体サンプルからゲノムDNAを得ること、
- FcRIIIa受容体遺伝子、またはアミノ酸残基158をコード化するヌクレオチドを含むその一部を増幅すること、
- 対立遺伝子特異的制限部位を導入すること、
- 上記制限部位に特異的な酵素で核酸を消化すること、および
- 消化産物を分析すること、すなわち、電気泳動で、消化産物の存在は対立遺伝子の存在を示す分析。

30

#### 【0036】

他の特定の実施形態において、遺伝子型は以下を含む方法で決定される：インビトロまたはエキソビボ（ex vivo）での、細胞または生物学的サンプルまたは流体からの総（またはメッセンジャー）RNA抽出、場合によりcDNA合成、FCGR3A-特異的オリゴヌクレオチドプライマーによる（PCR）増幅、およびPCR産物の分析。

#### 【0037】

本発明の方法は、FcRIIIa受容体ポリペプチド、またはアミノ酸残基158を含むその一部を配列決定することによって、またはFcRIIIaポリペプチドの各対立遺伝子に特異的な試薬を使用することによって、FcRIIIa受容体の158位のアミノ酸残基を直接決定することも含んでもよい。これは、イムノアッセイ（ELISA、EIA、RIA等々）を含む、当業者に周知の適当な技術で決定することができる。これは、FcRIIIa158ポリペプチドに特異的な親和性試薬、より好ましくは抗体またはその断片または誘導体を使用して、成すことができる。ある特定の実施形態において、FcRIIIa158ポリペプチドは、FcRIIIa158VとFcRIIIa158Fとを判別する抗FcRIIIa158抗体（またはその断片）で、より好ましくはモノクローナル抗体で、検出される。抗体（または親和性試薬）は、任意の適当な方法（放射能、蛍光、酵素的、化学的等々）で標識することが可能である。あるいは、たとえば、抗FcRIIIa158抗体に結合する、標識された、第2の試薬（たとえば、抗体）を使用して、FcRIIIa158抗体免疫複合体を明らかに（かつ/または定量化）してもよい。

40

50

## 【0038】

上記の方法は、被験者の生体サンプル中のFCGR3A158遺伝子型特定に基づく。生体サンプルは、FCGR3A遺伝子または対応するポリペプチドを含む任意のサンプル、特に血液、骨髄、リンパ節または流体、特に血液またはFCGR3A158遺伝子またはポリペプチドを含む尿であってもよい。さらに、FCGR3A158遺伝子は一般に上述の細胞、組織または流体の中に存在するため、本発明の方法は通常、遺伝子またはポリペプチドを検出または分析に使用できるように処理したサンプルを使用する。処理は、従来の固定技術、細胞融解（機械的または化学的または物理的）、または、たとえば、免疫組織学または生物学で使用される他の従来の方法を含んでもよい。

## 【0039】

本方法は、抗腫瘍治療用抗体処置に対する対象の応答を決定するのに特に適する。この点に関して、ある特定の実施形態において、対象は腫瘍を有し、治療用抗体処置は腫瘍負担の減少を目標とし、特に腫瘍細胞の著減を目標とする。より好ましくは、腫瘍はリンパ腫、たとえば、より好ましくはBリンパ腫、特にNHLである。上述の通り、抗体は好ましくはIgG1またはIgG3、特に抗CD20 IgG1またはIgG3であり、さらに好ましくはヒト化抗体、たとえば、リツキシマブである。

## 【0040】

本発明は、二重特異性抗体にも関し、上記二重特異性抗体がCD16および腫瘍抗原、たとえば、CD20抗原を特異的に結合することを特徴とする。本発明は、このような二重特異性抗体および薬学的に許容し得る賦形剤またはアジュバントを含む医薬組成物も包

## 【0041】

本発明のさらなる態様および利点は、本願を説明するものとみなすべきであり、本願をの範囲を限定するものとみなしてはならない、以下の実施例で開示する。

## 【実施例】

## 【0042】

材料および方法

患者および処置

臨床試験デザイン、適格基準およびエンドポイント査定は、既報の通りである<sup>5</sup>。簡単に記載すると、REAL分類<sup>26</sup>による、以前に処置を受けていない濾胞性CD20陽性NHLを有していた場合、患者は、本試験に含めるのに適格であった。患者は、Ann-Arbor分類による、ステージII~IVの疾患および少なくとも1つの測定可能な疾患部位を呈することが必要であった。全ての患者が、GELF基準<sup>27</sup>による低い腫瘍負担を有することが必要であった。合計4回の、用量375mg/m<sup>2</sup>のリツキシマブ（フランスのヌイにあるロシュ（Roche, Neuilly, France）を静脈内注入で投与した（1、8、15、22日）。注入および有害事象の管理は、既報の通りである<sup>5</sup>。試験プロトコールは倫理委員会に承認され、全ての患者がインフォームドコンセントを与えた。

## 【0043】

モニタリングおよびエンドポイント

ベースライン評価は、臨床検査、胸部X線、胸部、腹部および骨盤のコンピューター断層撮影（CT）、および片側の骨髄生検を含んでいた。含まれた患者の全CTスキャンを再吟味した、独立した放射線医師団が、応答を査定した。一次効力エンドポイントは、客観的応答率、すなわち、国際専門委員会が最近提唱した基準による、完全寛解（CR）、未確認のCR（CRu）または部分的応答（PR）のいずれかを達成している患者の比率であった<sup>28</sup>。臨床応答は、50日および78日に評価した。最大の応答のみを考慮に入れ、その査定時点をM2と名づけた。1年（M12）における進行について、全患者を評価した。M2に骨髄浸潤が消失し、かつM12に、骨髄にリンパ腫細胞が再発したCRまたはCRuの患者を、「進行性」と考え；M2に骨髄生検陰性であり、かつM12に生検陽性であったPRの患者を、PR状態であると考えた。診断時に得たリンパ節、および診断時、M2およびM12の、末梢血および骨髄の両者に対して、BCL2-JH遺伝子再構

10

20

30

40

50

成の分子分析を、前述<sup>5</sup>の通りに、PCRにより実施した。

【0044】

FCGR3A - 158V/F 遺伝子型特定

臨床治験に含まれた患者50例のうち1例を、組織学的再吟味後に除外し、他の2例について、DNAを入手できなかった。したがって、患者47例を、FCGR3A 遺伝子型分析に使用できた。全サンプルを同一試験室で分析し、交差汚染を回避するための予防措置を含む標準手順を使用して、DNAを抽出した。DNAを、末梢血 (n = 43)、骨髓 (n = 3) またはリンパ節 (n = 1) から単離した。Koeneら<sup>22</sup>による記載通りに、ネステッドPCRに続いて対立遺伝子特異的制限酵素消化を用いて、FCGR3A - 158V/F 多型の遺伝子型特定を実施した。簡単に記載すると、2種のFCGR3A 特異的プライマー (5' - ATATTTACAGAA TGGCACAGG - 3'、配列番号1; 5' - GACTTGGTACCCAGGTTGAA - 3'、配列番号2) (フランスのLes Ulisにあるユーロバイオ (Eurobio, Les Ulis, France)) を使用して、多型部位を含む1.2 kbの断片を増幅した。製造会社の推奨通り、ゲノムDNA 1.25 µg、各プライマー200 ng、200 µmol/Lの各dNTP (リトアニアのピリニウスにあるMBI・ファーマンタス (MBI Fermentas, Vilnius, Lithuania)) および1 UのTaq DNAポリメラーゼ (フランスのシャルボニエールにあるプロメガ (Promega, Charbonniere, France)) を用いて、PCRアッセイを実施した。この第1のPCRは、95℃にて10分、次いで35サイクル (それぞれ、95℃ 1分間、57℃ 1.5分間、72℃ 1.5分間の3工程からなる) および完全な伸張を達成するための72℃にて8分で構成されていた。第2のPCRは、94 bpの断片を増幅し、FCGR3A - 158V対立遺伝子だけにNlaIII制限部位を作るプライマー (5' - ATCAGATTTCGATCCTACTTCTGCAGGGGGCAT - 3'、配列番号3; 5' - ACGTGCTGAGCTTGTGAGTGATGGTGTGTTTCAC - 3'、配列番号4) (ユーロバイオ (Eurobio)) を使用した。このネステッドPCRは、増幅されたDNA 1 µl、各プライマー150 ng、200 µmol/Lの各dNTPおよび1 UのTaq DNAポリメラーゼで実施した。第1のサイクルは、95℃にて5分、次いで35サイクル (それぞれ、95℃ 1分間、64℃ 1分間、72℃ 1分間の3工程からなる) および完全な伸張を達成するための72℃にて9.5分で構成されていた。次いで、増幅されたDNA (10 µl) を、10 UのNlaIII (イギリスのヒッチンにあるニュー・イングランド・バイオラズ (New England Biolabs, Hitchin, England)) で、37℃にて12時間消化し、8%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で分離した。臭化エチジウムで染色した後、DNAバンドをUV光で可視化した。ホモ接合型FCGR3A - 158F患者の場合、唯一の未消化バンド (94 bp) が見られた。ヘテロ接合型患者では3つのバンド (94 bp、61 bpおよび33 bp) が見られたが、ホモ接合型FCGR3A - 158V患者では、2つの消化されたバンド (61 bpおよび33 bp) が得られただけであった。

【0045】

FCGR2A - 131H/R 遺伝子型特定

Liangら<sup>28</sup>に従って、PCRに続く対立遺伝子特異的制限酵素消化により、FCGR2A - 131H/Rの遺伝子型特定を実施した。R対立遺伝子の場合には、BstUI制限部位を作るために、センスプライマー (5' - GGAAAATCC CAGAAATTC TCGC - 3'、配列番号5) (ユーロバイオ (Eurobio)) を修飾しておき、内部コントロールの役目をする第2のBstUI制限部位を担持するために、アンチセンスプライマー (5' - CAACAGCCTGACTACCTA TTA CGCGGG - 3'、配列ID番号6) (ユーロバイオ (Eurobio)) を修飾しておいた。PCR増幅は、ゲノムDNA 1.25 µg、各プライマー170 ng、200 µmol/Lの各dNTP、0.5 UのTaq DNAポリメラーゼ、および製造会社の緩衝液を用いて、50 µl反応で実施した。第1のサイクルは、94℃にて3分に続いて35サイクル (それぞれ、94℃にて15秒間、55℃ 30秒間、72℃ 40秒間の3工程からなる) および伸張を完成するための72℃にて7分で構成されていた。次いで、増幅されたDNA (7 µl) を、20 Uの

B s t U I ( ニュー・イングランド・バイオラブズ ( MewEnglandBiolabs ) ) で、60にて12時間消化した。F C G R 3 A 遺伝子型特定に関する記載の通りに、さらなる分析を実施した。F C G R 2 A - 1 3 1 H および - 1 3 1 R 対立遺伝子は、それぞれ337bpおよび316bpのDNA断片として、可視化された。

【0046】

#### 統計解析

適切な場合、二乗検定またはフィッシャーの正確確率検定 ( Fisher's exact test ) を使用して、異なる遺伝子型群の患者の、臨床上の特徴および生物学的特徴ならびに臨床応答および分子応答を比較した。診断時の性別、年齢、( > または 60才 )、冒された節外部位数 ( 2 または < 2 )、骨髄関与、B C L 2 - J H 構成状態およびF C G R 3 A 遺  
10  
伝子型を含むロジスティック回帰分析を使用して、臨床応答および分子応答に影響する予後の独立変数を同定した。 Kaplan 及びマイヤー ( Kaplan and Meier )<sup>29</sup>の方法に従って無進行性生存率を算出し、処置開始から進行/再発または死亡までを測定した。ロジランク ( log-rank ) 検定を使用して、F C G R 3 A 遺伝子型による無進行性生存率の比較を実施した。P < 0 . 0 5 を、統計学的に有意であると考えた。

【0047】

#### 結果

##### 臨床応答

F C G R 3 A - 1 5 8 V / F 多型について試験した患者49例のうち10例 ( 20% )  
20  
および17例 ( 35% ) が、それぞれ、ホモ接合型F C G R 3 A - 1 5 8 V およびホモ接合型F C G R 3 A - 1 5 8 F であり、22例 ( 45% ) がヘテロ接合型であった。診断時の、性別、病期、骨髄関与、冒された節外部位数または末梢血および骨髄におけるB C L 2 - J H 再構成の存在に関して、3つのグループに差はなかった ( 表1 )。ホモ接合型F C G R 3 A - 1 5 8 V 患者を、F C G R 3 A - 1 5 8 F キャリヤー ( F C G R 3 A - 1 5 8 F ホモ接合型およびヘテロ接合型患者 ) と比較したとき、またはホモ接合型F C G R 3 A - 1 5 8 F 患者を、F C G R 3 A - 1 5 8 V キャリヤー ( F C G R 3 A - 1 5 8 V ホモ接合型およびヘテロ接合型患者 ) と比較したとき、差は認められなかった。F C G R 3 A - 1 5 8 V ホモ接合型、F C G R 3 A - 1 5 8 F ホモ接合型およびヘテロ接合型患者の、M 2 における客観的応答率は、それぞれ100% ( C R + C R u = 40% )、70% ( C R + C R u = 29% ) および64% ( C R + C R u = 18% ) であった ( P = 0 . 09 )。  
30  
F C G R 3 A - 1 5 8 V ホモ接合型患者とF C G R 3 A - 1 5 8 F キャリヤーとの間で、客観的応答率に有意差が認められ、この後者のグループの客観的応答率は67% ( C R + C R u = 23% ) であった ( 相対危険度 = 1 . 5 ; 95% C I、1 . 2 ~ 1 . 9 ; P = 0 . 03 ) ( 表2 )。F C G R 3 A - 1 5 8 F ホモ接合型患者とF C G R 3 A - 1 5 8 V キャリヤーとの間に、差は認められなかった。M 1 2 における、F C G R 3 A - 1 5 8 V ホモ接合型、F C G R 3 A - 1 5 8 F ホモ接合型およびヘテロ接合型患者の客観的応答率は、それぞれ、90% ( C R + C R u = 70% )、59% ( C R + C R u = 35% ) および45% ( C R + C R u = 32% ) であった ( P = 0 . 06 )。処置後1年に、F C G R 3 A - 1 5 8 V ホモ接合型群とF C G R 3 A - 1 5 8 F キャリヤーとの間で、客観的応答率に依然として差が存在し、この後者のグループでは、客観的応答率は51% ( C R + C R u = 33% ) であった ( 相対危険度 = 1 . 7 ; 95% C I、1 . 2 ~ 2 . 5 ; P = 0 . 03 )。ロジスティック回帰分析から、ホモ接合型F C G R 3 A - 1 5 8 V 遺伝子型は、M 2 ( P = 0 . 02 ) でもM 1 2 ( P = 0 . 01 ) でも、臨床応答に関する唯一の予測因子であることが分かった。3年における無進行性生存率 ( 平均フォローアップ : 35ヵ月 ; 31 - 41 ) ( 図1 ) は、F C G R 3 A - 1 5 8 V ホモ接合型患者で56%であり、F C G R 3 A - 1 5 8 F キャリヤー ( n s ) では35%であった。F C G R 2 A - 1 3 1 H / R 多型に関して分析した患者45例のうち、9例 ( 20% ) および13例 ( 29% ) が、それぞれF C G R 2 A - 1 3 1 R およびF C G R 2 A - 1 3 1 H に関してホモ接合型であり、23 ( 51% ) 例がヘテロ接合型であった。これらの3グループで、またはホモ接合型F C G R 2 A - 1 3 1 H 患者とF C G R 2 A - 1 3 1 R キャリヤーで、またはホモ接合型  
40  
50

FCGR2A - 131R患者とFCGR2A - 131Hキャリアーで、包含時の特徴またはリツキシマブ処置に対する臨床応答に、差はなかった（データ示さず）。

#### 【0048】

##### 分子応答

診断時に、患者30例（64%）で、BCL2 - JH再構成が末梢血および骨髄の両方で検出されたため、さらなるフォローアップが可能になった。M2およびM12において、患者25例（FCGR3A - 158Vホモ接合型患者6例およびFCGR3A - 158Fキャリアー19例）および患者23例（FCGR3A - 158Vホモ接合型患者6例およびFCGR3A - 158Fキャリアー17例）を、末梢血および骨髄の両者におけるBCL2 - JH再構成について分析した（表3）。M2において、FCGR3A - 158Vホモ接合型患者の3/6、およびFCGR3A - 158Fキャリアー（ns）の5/19で、BCL2 - JH再構成の浄化が確認された。対照的に、M12におけるBCL2 - JH再構成浄化率は、FCGR3A - 158Fキャリアー（5/17）よりFCGR3A - 158Vホモ接合型患者（5/6）で高かった（相対危険度 = 2.8 ; 95% CI、1.2 ~ 6.4 ; P = 0.03）。FCGR3A - 158Vホモ接合型遺伝子型は、M12における、BCL2 - JH再構成浄化を示すより大きい確率と関連した唯一の因子である（P = 0.04）ことが、ロジスティック回帰分析から分かった。M12において、末梢血および骨髄で、依然としてBCL2 - JH再構成を呈していたこのホモ接合型FCGR3A - 158V患者1例は、リツキシマブ処置の23ヵ月後にCRであった。対照的に、M2およびM12における分子応答は、FCGR2A - 131H/R多型による影響を受けなかった（データ示さず）。

#### 【0049】

##### 考察

B細胞リンパ増殖性悪性腫瘍でリツキシマブの使用が増加しているため、処置不成功およびリツキシマブの作用様式について理解を深めることが必要である。この点に関して、我々は、明確な臨床上的および検査室の特徴を有する濾胞性NHL患者でFCGR3Aを遺伝子型特定し、リツキシマブのみを投与した<sup>5</sup>。特に、診断時およびフォローアップの間に、この試験に含まれた全ての患者が、低い腫瘍負担NHLおよびBCL2 - JH atの分子分析を示した。この集団におけるFCGR3A対立遺伝子頻度は、一般的な白人集団のものに似ていた<sup>23, 24</sup>。我々の結果から、FCGR3A遺伝子型と、リツキシマブに対する応答との間の関連が分かる。事実、集団の5分の1を占めるホモ接合型FCGR3A - 158V患者は臨床応答を経験する確率が大きく、M2およびM12に、それぞれ、100%および90%の客観的応答率を示した。さらに、BCL2 - JH再構成について分析を実施したFCGR3A - 158Vホモ接合型患者6例中5例が、M12に分子応答を示したのに対して、FCGR3A - 158Fキャリアーでは17例中5例であった。FCGR3A - 158Vホモ接合性は、臨床応答および分子応答と関連した唯一の因子であった。しかし、これらのより高い臨床応答および分子応答は、ホモ接合型FCGR3A - 158V患者の無進行性生存率を有意に改善するためには、未だ不十分であった。

#### 【0050】

これは、リツキシマブに対する臨床応答および分子応答の両者に関する、容易に査定できる遺伝学的予測因子の第1報である。しかし、遺伝学的関連では、FcRIIIaを含むリツキシマブの作用様式が証明されてない。FCGR3A遺伝子型と、リツキシマブに対する応答との間で認められた関連は、連鎖不平衡にある別の遺伝子多型に起因するのかもしれない。FCGR3Aは、3つのFCGR2遺伝子およびFCGR3Bを含む染色体1の長腕上に位置する<sup>32</sup>ため、これらの多型は、3対立遺伝子FCGR3A - 48L/H/R多型<sup>31</sup>のようにFCGR3Aそれ自体に位置することも、他のFcR - コード化遺伝子に位置することもあり得る。FCGR2AとFCGR3Bとの間で連鎖不平衡が報告されている<sup>33</sup>。しかし、FCGR2A - 131H/R多型はリツキシマブに対するより良好な応答と関連していなかったことにより、FCGR3Aに非常に近い遺伝子またはFCGR3Aそれ自体が、直接関与することが強く裏付けられる。

## 【 0 0 5 1 】

幾つかの *in vitro* 試験は、FCGR3A - 158V/F多型の直接関与を支持して論じている。第1に、Koeneら<sup>23</sup>は、先に報告した、3つのFcRIIIa - 48L/H/Rアイソフォーム<sup>31</sup>間のIgG結合の差は、連結したFcRIIIa - 158V/F多型の結果であることを示し、幾つかのチームは、FCGR3A - 158Vアロタイプに関して個々のホモ接合型に由来するNK細胞は、ヒト複合IgG1に対してより高いアフィニティを有し、IgG1感作標的に対して、より細胞障害性であることを証明した<sup>23, 24, 34</sup>。我々の今回の結果は、FCGR3A - 158Vホモ接合型患者は、たぶん、そのキメラ・ヒトIgG1がFcRIIIaにより良くインビボ結合するため、リツキシマブに対して、より良好な応答を示すことを実証するものである。第2に、NK細胞 - およびマクロファージ介在ADCCは、インビトロ<sup>8, 11, 12</sup>ならびにネズミ・モデルのインビボにおいて<sup>17 - 19</sup>抗CD20抗体により誘発される機構の1つであり、リツキシマブ介在アポトーシスは、FcR発現細胞により増幅される<sup>15, 16</sup>。全てのFcRの中で、FcRIIIaはNK細胞およびマクロファージに共有される唯一の受容体である。そこで我々は、FCGR3A - 158V患者は、リンパ腫細胞に対してより良好なADCC活性を有するため、リツキシマブに対してより良好な応答を示すという仮説を立てた。FCGR3A - 158Fキャリアーの50%より多くが、それでもなおリツキシマブに対して臨床応答を示すという事実は、低いものの、それでも十分なADCC活性によって、または、より公算が高い、*in vivo*で機能する他の機構、たとえば、補体依存性細胞傷害、補体依存性細胞介在性細胞傷害<sup>11, 13, 14</sup>および/またはアポトーシス<sup>15, 16</sup>によって、説明されるであろう。ADCCは、FCGR3A - 158Vホモ接合型患者で特に有効なリツキシマブに対する応答における、補足的な機構と考えられる。

10

20

## 【 0 0 5 2 】

FCGR3Aヘテロ接合型ドナー由来のNK細胞へのIgG1結合レベルを有する「遺伝子用量」効果は、FCGR3A - 158VおよびFCGR3A - 158Fホモ接合体<sup>23</sup>からのNK細胞で見られたものの中間にあることがインビトロ試験から示唆される。しかし、ヘテロ接合型患者の臨床応答は、FCGR3A - 158Fホモ接合型患者のものに似ているようである。より大きい患者群で実施されるさらなる試験は、インビボ「遺伝子用量」効果に不利な結論を下さなければならないであろう。

30

## 【 0 0 5 3 】

FcRIIIaは、リツキシマブに対するより良好な応答と強く関連しているため、CD20抗原を標的とする新薬を開発する際に、考慮に入れる必要がある。たとえば、B細胞リンパ腫に罹ったFCGR3A - 158F - キャリヤー患者を処置するために、遺伝子操作されたリツキシマブを使用できる可能性がある。事実、IgG1の下側のヒンジ領域の様々な残基を修飾することによって、Shieldsらは、最近、天然のIgG1より強力にFcRIIIa - 158Fに結合するIgG1突然変異体を得た<sup>34</sup>。

## 【 0 0 5 4 】

総合すると、これらの結果から、患者FCGR3A遺伝子型の事前決定に基づいて、Bリンパ増殖性疾患に対する新たな治療方針を設定することが可能になる。この多型は、黒人および日本人を含む様々な民族集団で同一分布を有するため、このような方針は、世界的に応用することが可能である<sup>23, 35, 36</sup>。さらに、このような薬理遺伝学的方法は、B細胞悪性腫瘍の処置に使用される他の原型を保ったヒト化IgG1抗体、たとえば、キャンパス1H (Campath-1H)、または他の悪性腫瘍の処置に使用されるもの、たとえば、トラストズマブ (trastuzumab) (ハーセプチン (Herceptin) (登録商標)) にも応用することができる。さらに一般的には、この方法は、標的細胞を激減させるために開発された、他の原型を保った (ヒト化) 治療用 (IgG1) 抗体に応用することが可能である。

40

## 【 0 0 5 5 】

【表3】

表1. FCGR3A-158V/F多型による患者の特徴

		FCGR3A- 158VV	FCGR3A- 158VF	FCGR3A- 158FF	p*	
n (%)		10 (20%)	22 (45%)	17 (35%)		
性別						
	M	3	12	10	ns	10
	F	7	10	7		
病期						
	II-III	3	6	6	ns	
	IV	7	16	11		
骨髄関与						
	あり	7	16	9	ns	
	なし	3	6	8		
冒された節外部位						
	< 2	8	20	13	ns	20
	≥ 2	2	2	4		
末梢血におけるBCL2-JH再構成		8	12	11	ns	
骨髄におけるBCL2-JH再構成		7	12	11	ns	

\*ホモ接合型FCGR3A-158V患者対FCGR3A-158Fキャリアーの3グループおよび  
ホモ接合型FCGR3A-158F患者対FCGR3A-158Vキャリアーの3グループの統計学的比較

【0056】

30

## 【表4】

表2. FCGR3A-158V/F多型による、リツキシマブに対する臨床応答

	FCGR3A-158VV	FCGR3A-158F キャリアー	p*
M2における臨床応答			
客観的応答	10 (100%)	26 (67%)	0.03
完全寛解	3	7	
未確定の完全寛解	1	2	
部分的応答	6	17	
無応答	0 (0%)	13 (33%)	
無変化	0	10	
進行性疾患	0	3	
M12における臨床応答			
客観的応答	9 (90%)	20 (51%)	0.03
完全寛解	6	11	
未確定の完全寛解	1	2	
部分的応答	2	7	
無応答	1 (10%)	19 (49%)	
無変化	0	2	
進行性疾患	1	17	

\* ホモ接合型FCGR3A-158V患者対FCGR3A-158Fキャリアーの統計学的比較。  
3つの遺伝子型サブグループに関するデータは、本文中に記載されている。

## 【0057】

## 【表5】

表3. M2およびM12における、FCGR3A-158V/F多型によるリツキシマブに対する分子応答

	FCGR3A-158VV	FCGR3A-158F キャリアー	p
M2における分子応答			
BCL2-JH再構成の浄化	3	5	ns
持続性BCL2-JH再構成	3	14	
M12における分子応答			
BCL2-JH再構成の浄化	5	5	0.03
持続性BCL2-JH再構成	1	12	

## 【0058】

## 【表 6】

## 参考文献

1. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, et al.: Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood*. 1994;84:2457-2466.
2. McLaughlin P, Grillo-Lopez AJ, Link BK, et al.: Rituximab chimeric anti-CD20 monoclonal antibody therapy for relapsed indolent lymphoma: half of patients respond to a four-dose treatment program. *J Clin Oncol*. 1998;16:2825-2833.
3. Maloney DG, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al.: IDEC-C2B8 (Rituximab) anti-CD20 monoclonal antibody therapy in patients with relapsed low-grade non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;90:2188-2195. 10
4. Hainsworth JD, Burris HA, 3rd, Morrissey LH, et al.: Rituximab monoclonal antibody as initial systemic therapy for patients with low-grade non-Hodgkin lymphoma. *Blood*. 2000;95:3052-3056.
5. Colombat P, Salles G, Brousse N, et al.: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) as first-line therapy of follicular lymphoma patients with low tumor burden: clinical and molecular evaluation. *Blood*. 2001;97:101-106.
6. Coiffier B, Haioun C, Ketterer N, et al.: Rituximab (anti-CD20 monoclonal antibody) for the treatment of patients with relapsing or refractory aggressive lymphoma: a multicenter phase II study. *Blood*. 1998;92:1927-1932. 20
7. Foran JM, Rohatiner AZ, Cunningham D, et al.: European phase II study of rituximab (chimeric anti-CD20 monoclonal antibody) for patients with newly diagnosed mantle-cell lymphoma and previously treated mantle-cell lymphoma, immunocytoma, and small B-cell lymphocytic lymphoma. *J Clin Oncol*. 2000;18:317-324.
8. Anderson DR, Grillo-Lopez A, Varns C, Chambers KS, Hanna N: Targeted anti-cancer therapy using rituximab, a chimaeric anti-CD20 antibody (IDEC-C2B8) in the treatment of non-Hodgkin's B-cell lymphoma. *Biochem Soc Trans*. 1997;25:705-708.
9. Vose J, Link B, Grossbard M, et al.: Phase II study of rituximab in combination with CHOP chemotherapy in patients with previously untreated intermediate or high-grade non-Hodgkin's lymphoma (NHL). *Ann Oncol*. 1999;10:58. 30
10. Berinstein NL, Grillo-Lopez AJ, White CA, et al.: Association of serum Rituximab (IDEC-C2B8) concentration and anti-tumor response in the treatment of recurrent low-grade or follicular non-Hodgkin's lymphoma. *Ann Oncol*. 1998;9:995-1001.
11. Harjunpaa A, Junnikkala S, Meri S: Rituximab (anti-CD20) therapy of B-cell lymphomas: direct complement killing is superior to cellular effector mechanisms. *Scand J Immunol*. 2000;51:634-641.
12. Reff ME, Carner K, Chambers KS, et al.: Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20. *Blood*. 1994;83:435-445.

13. Idusogie EE, Presta LG, Gazzano-Santoro H, et al.: Mapping of the C1q binding site on rituxan, a chimeric antibody with a human IgG1 Fc. *J Immunol.* 2000;164:4178-4184.
14. Golay J, Zaffaroni L, Vaccari T, et al.: Biologic response of B lymphoma cells to anti-CD20 monoclonal antibody rituximab in vitro: CD55 and CD59 regulate complement-mediated cell lysis. *Blood.* 2000;95:3900-3908.
15. Shan D, Ledbetter JA, Press OW: Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies. *Blood.* 1998;91:1644-1652.
16. Shan D, Ledbetter JA, Press OW: Signaling events involved in anti-CD20-induced apoptosis of malignant human B cells. *Cancer Immunol Immunother.* 2000;48:673-683.
17. Hooijberg E, Sein JJ, van den Berk PC, et al.: Eradication of large human B cell tumors in nude mice with unconjugated CD20 monoclonal antibodies and interleukin 2. *Cancer Res.* 1995;55:2627-2634.
18. Funakoshi S, Longo DL, Murphy WJ: Differential in vitro and in vivo antitumor effects mediated by anti-CD40 and anti-CD20 monoclonal antibodies against human B-cell lymphomas. *J Immunother Emphasis Tumor Immunol.* 1996;19:93-101.
19. Clynes RA, Towers TL, Presta LG, Ravetch JV: Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med.* 2000;6:443-446.
20. Fijen CA, Bredius RG, Kuijper EJ, et al.: The role of Fc $\gamma$  receptor polymorphisms and C3 in the immune defence against *Neisseria meningitidis* in complement-deficient individuals. *Clin Exp Immunol.* 2000;120:338-345.
21. Dijkstra HM, Scheepers RH, Oost WW, et al.: Fc $\gamma$  receptor polymorphisms in Wegener's granulomatosis: risk factors for disease relapse. *Arthritis Rheum.* 1999;42:1823-1827.
22. Myhr KM, Raknes G, Nyland H, Vedeler C: Immunoglobulin G Fc-receptor (Fc $\gamma$ R) IIA and IIIB polymorphisms related to disability in MS. *Neurology.* 1999;52:1771-1776.
23. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M: Fc  $\gamma$ R IIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell Fc  $\gamma$ R IIIa, independently of the Fc  $\gamma$ R IIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 1997;90:1109-1114.
24. Wu J, Edberg JC, Redecha PB, et al.: A novel polymorphism of Fc $\gamma$ R IIIa (CD16) alters receptor function and predisposes to autoimmune disease. *J Clin Invest.* 1997;100:1059-1070.
25. Sondermann P, Huber R, Oosthuizen V, Jacob U: The 3.2-A crystal structure of the human IgG1 Fc fragment-Fc  $\gamma$ R III complex. *Nature.* 2000;406:267-273.
26. Harris NL, Jaffe ES, Stein H, et al.: A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood.* 1994;84:1361-1392.
27. Brice P, Bastion Y, Lepage E, et al.: Comparison in low-tumor-burden follicular lymphomas between an initial no-treatment policy, prednimustine, or interferon alfa: a randomized study from the Groupe d'Etude des Lymphomes Folliculaires. Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol.* 1997;15:1110-1117.

10

20

30

28. Cheson BD, Horning SJ, Coiffier B, et al.: Report of an international workshop to standardize response criteria for non-Hodgkin's lymphomas. NCI Sponsored International Working. *J Clin Oncol.* 1999;17:1244.
29. Jiang XM, Arepally G, Poncz M, McKenzie SE: Rapid detection of the Fc $\gamma$ RIIA-H/R 131 ligand-binding polymorphism using an allele-specific restriction enzyme digestion (ASRED). *J Immunol Methods.* 1996;199:55-59.
30. Kaplan E, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958;53:457-481.
31. de Haas M, Koene HR, Kleijer M, et al.: A triallelic Fc $\gamma$  receptor type IIIA polymorphism influences the binding of human IgG by NK cell Fc $\gamma$ RIIIa. *J Immunol.* 1996;156:3948-3955. 10
32. Peltz GA, Grundy HO, Lebo RV, Yssel H, Barsh GS, Moore KW: Human Fc $\gamma$ RIII: cloning, expression, and identification of the chromosomal locus of two Fc receptors for IgG. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989;86:1013-1017.
33. Schnackenberg L, Flesch BK, Neppert J: Linkage disequilibria between Duffy blood groups, Fc $\gamma$ IIa and Fc $\gamma$ IIIb allotypes. *Exp Clin Immunogenet.* 1997;14:235-242.
34. Shields RL, Namenuk AK, Hong K, et al.: High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc $\gamma$ RI, Fc $\gamma$ RII, Fc $\gamma$ RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc $\gamma$ R. *J Biol Chem.* 2001;276:6591-6604.
35. Leppers-van de Straat FG, van der Pol W, Jansen MD, et al.: A novel PCR-based method for direct Fc $\gamma$  receptor IIIa (CD16) allotyping. *J Immunol Methods.* 2000;242:127-132. 20
36. Lehrnbecher T, Foster CB, Zhu S, et al.: Variant genotypes of the low-affinity Fc $\gamma$  receptors in two control populations and a review of low-affinity Fc $\gamma$  receptor polymorphisms in control and disease populations. *Blood.* 1999;94:4220-4232.

【図面の簡単な説明】

【0059】

【図1】Fc R3a-158V/F遺伝子型による、リツキシマブ処置後の無進行性生存率の調整済カプラン-マイヤー推定量 ( $p = 0.05$ ) を示す図である。

【図2】ヒトFCGR3A遺伝子の遺伝子編成を示す図である。 30

【図3】ヒトFc RIIIIa158F (配列番号7) のアミノ酸配列を示す図である。

【図4】ヒトFCGR3A158F (配列番号8) の核酸配列を示す図である。

【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> CHRU de Tours

<120> Methods and compositions to evaluate antibody treatment response.

<130> B0095W0

<140>

<141>

<160> 8 10

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FCGR3A specific primer. 20

<400> 1

atatttacag aatggcacag g 21

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: FCGR3A specific primer. 30

<400> 2

gacttggtag ccaggttgaa 20

<210> 3

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220> 40

<223> Description of Artificial Sequence: Amplification primer.

<400> 3

atcagattcg atcctacttc tgcagggggc at

32

<210> 4

<211> 32

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amplification primer.

<400> 4

acgtgctgag cttgagtgat ggtgatgttc ac

32

<210> 5

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

20

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amplification sense primer.

<400> 5

ggaaaatccc agaaattctc gc

22

<210> 6

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

30

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: Amplification antisens primer.

<400> 6

caacagcctg actacctatt acgcggg

27

<210> 7

<211> 254

40

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Amino acid sequence of human FCGR3A158F.

&lt;400&gt; 7

Met Trp Gln Leu Leu Leu Pro Thr Ala Leu Leu Leu Leu Val Ser Ala  
 1 5 10 15

Gly Met Arg Thr Glu Asp Leu Pro Lys Ala Val Val Phe Leu Glu Pro  
 20 25 30

10

Gln Trp Tyr Arg Val Leu Glu Lys Asp Ser Val Thr Leu Lys Cys Gln  
 35 40 45

Gly Ala Tyr Ser Pro Glu Asp Asn Ser Thr Gln Trp Phe His Asn Glu  
 50 55 60

Ser Leu Ile Ser Ser Gln Ala Ser Ser Tyr Phe Ile Asp Ala Ala Thr  
 65 70 75 80

Val Asp Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Thr Asn Leu Ser Thr Leu  
 85 90 95

20

Ser Asp Pro Val Gln Leu Glu Val His Ile Gly Trp Leu Leu Leu Gln  
 100 105 110

Ala Pro Arg Trp Val Phe Lys Glu Glu Asp Pro Ile His Leu Arg Cys  
 115 120 125

His Ser Trp Lys Asn Thr Ala Leu His Lys Val Thr Tyr Leu Gln Asn  
 130 135 140

Gly Lys Gly Arg Lys Tyr Phe His His Asn Ser Asp Phe Tyr Ile Pro  
 145 150 155 160

30

Lys Ala Thr Leu Lys Asp Ser Gly Ser Tyr Phe Cys Arg Gly Leu Phe  
 165 170 175

Gly Ser Lys Asn Val Ser Ser Glu Thr Val Asn Ile Thr Ile Thr Gln  
 180 185 190

Gly Leu Ala Val Ser Thr Ile Ser Ser Phe Phe Pro Pro Gly Tyr Gln  
 195 200 205

Val Ser Phe Cys Leu Val Met Val Leu Leu Phe Ala Val Asp Thr Gly

40



gtgggcttat aacttctggt gattagacta cagcagaaag agaagctgta tagcttctta 1800  
 aatgttataa agtccttaagg atagctgcca gcaagacctt aggacaaaat gagcccttgt 1860  
 tcacgtccag tgggagagag agagagagac cctctctccc aaatatggca atcctctcta 1920  
 cctataacat ttacataaat gttataggtt aaacgttcca caacaaacta agtactatct 1980  
 aacatcaaga ggaaaaagag acaggagaaa gggtaataa gcctgttgat gaggatctaa 2040  
 gaagaacaaa ggaggcctgg tttgggcctg gctaccogtt ggtcttgcaa agaagagtct 2100  
 gaggtggcag agccttcagt ggcagatgcc aaattatcat catgagtgc tgcaagacag 2160  
 tgtcagctaa gatagccatt tcaagctgct gaaggccttc tcttttagtc gtggagtcct 2220  
 gtgataagaa ctgaaaagttg gaagagtgtg ctltgtctgtg gccttatttg gtcggatgca 2280  
 gtctttatca tttttaatct gtttctttaga acattttatc ttgttggcca aatgccctac 2340  
 gaaatataaa atggagtctt tttctaagat ggagttagtt atgtcaaggg tcctttatac 2400  
 agtcttcctc ctttttctctg gcatacaact cctaaaatcc ttagaatctc caaagtgatg 2460  
 tcttttgggt tgctaagtga gtaactgatg gctggcagct cttaggtagc ttcataacag 2520  
 gggctgggca caagaagat catggcaagg tcagaggatt ggggcttcca gctccaccct 2580  
 ccaaaactccc tctgggaagt ggagaggggc tgaaggttga attgatcacc aatagccaat 2640  
 gacttaatta atcattccta agtaataaag ctcccataaa aacccaaaag gacaggggtt 2700  
 ggagatcctc cagagagccg aacacagaga ggttcttggg gggtagtgca ccagagggca 2760  
 tggaaagctc aagcccttc ccacaggtct tgccctatgt actctttact tgtgtccttt 2820  
 gtaatattct ttatcaciaa ctgataaatg taaatgtttc cctgagtact gagagccact 2880  
 ctagcaaat aattgaacct aagatgcagg tgggtgggaa cccatttat aactggttgg 2940  
 tcaaaagcac aggtaaaaca acctggggct tcatctgga gtatcagaag tgtcttgtga 3000  
 gactgagccc ttcacttgtg tcacctgatg ctatttccag ttagatagtg ttggaattca 3060  
 attgaatttg agcagaagtc ccaatcccca gacctgtagt tgtcagtgc ctcttaggaa 3120  
 ctgggctgca cagcaggaag tgaggggagc gtggggagca aagctttatc tglatttaca 3180  
 gtatagcccc atggctcaca tcaccgctg agctcctcct cctatcagat cagctgtggc 3240  
 attaaattat cacaggagca tgaacctat tgtgaagtac gcatgcaagg gatctaggtt 3300  
 gcattctcct tatgagaatc taatgcctga tgacctggca ttgtctccca tcacctaga 3360  
 tgggactgtc tagttgcaag aaaacaagct cggggctccc cctgattceta cattatggtg 3420  
 agttgtataa ttacttcatt aaatattaca ctgtaataat aatagaaatg aagtgcacaa 3480  
 taaatgtaat gcacttgaat catctgaaa ccatccccca cccccctacc cctgtccgag 3540  
 gaaaaattgt cttccatgaa gccaatccct ggtgcacaaa attttggaga ccaactggatt 3600  
 agaagacacc cagttgggtg ccaactgctga attgcttgc tgccttgcctg ctgtcttggc 3660  
 agtggagaga aatccccaca tatctgttgt cagaaatgtg ttgtgagagc atagtgggag 3720  
 gaactgagtt tgltttttct acagttacag caataggtaa ctggaattca actgctggac 3780  
 tataccaaag actgccaggc cagcctacct ttctcacagc cttcttgact acctgtcttg 3840  
 gatgagctca ctgaaagccc acataccttc attctagcat ttcctcagtc tggtttagct 3900  
 gctttggagg taatacaggt tglaggactt ccctccactc ctgctcagga cogttttcag 3960  
 caggctaatc agacagcagt tggcactgag tacaactgga gaaatgttat cagcaactgaa 4020  
 gactgctcca gctacaaatg cacagcgacc cacctcagct ggacctttgg cattgcttgg 4080  
 caatccttac aactgtttgg aattcttgggt aattcttcta catacaaaaca gtgggctcct 4140  
 tctcccatgc accacaatgg ccattctcaa ctctgggtgt ctcaaaccct caccacaact 4200  
 gttaccact cttctctgac aagtgtctt gactcctcct taaccaagaa aatcaggacc 4260  
 agcagatgtg gatggctact caacatctga aaatggattt gcataatgtac cccctcagct 4320  
 cctgcttca gctcagagcg agaggtaatc cgtatccagt tcacagccaa ctccctgtcc 4380  
 atgtcccatt ccatctcct caggaccac acttgcctct ctaggtgttc cgtccctgtt 4440  
 aggcattcaa cttctccac cctgctggct tcttccaaa gacctataac caagctcgtg 4500  
 tctttcactt aaaagaaaac aaaaactccc attctcttgt aactacctt gcagaattgt 4560  
 gtctgaaaca gtgagagaga tctaacttaa ttgactccat cttgcttcta acctccaagc 4620

10

20

30

40

tgcctttcct cattcttggg cataggtga actaactttg ggagaaactt agtttatagt 4680  
 ttgtggttta aagcaagat gataacagcc ctttcccagg gcagacctcc ttttttctg 4740  
 aagactagat tgcctttgta ggactaacat tagccacaag attggaaatt atggtttagg 4800  
 aatcatgcag gtggaggcta caagattctg acccttccta agcaactgac ctaagatcgg 4860  
 tgcttgagat attttgcaga ccctgcactt gatggatcac ctggcaacac ccagatcaat 4920  
 aaactggctc atctgatctt gtggtgcccc cccaggact gactcagaac aagaagacag 4980  
 cttaacttc ctgtgatttc atccctgacc aatcaacact cctggctcac tggcttcccc 5040  
 tccaccaacc aagtgtcct taaaaactct gctccccgaa tgctctggaa gactgatttg 5100  
 agtaataata aaactccagt ctctggtca gtcagctctg catgaattac tctttctcta 5160  
 ttgaattcc cctgtcttga tgaatcagct ctgtctagtt accatcctcc acttctcctt 5220  
 tcttattgtg tcaattaggg ctctgggtta taaacaactt tatcagaatc cagatctttt 5280  
 aagtagagga aaaagattta ttggatggaa actagaggag gtgagcccat cccactgctg 5340  
 tgatgactgg gaccaacca tctcctctc ctagaagtga atctcctta tgagtaaaaa 5400  
 agtgtcactt attcaggatt catctcagaa gagactctaa tggggcaaac ctcagttata 5460  
 tgctgtcct ctgtctgcct gtatcagtta gctagcactt ttataacaaa gtaccacaga 5520  
 ctgggtggct taaacaacaa aaatgtatct tcttacagtt cttgaggctg caagtccaag 5580  
 atcaagggtg tgaagggtt ggtttctttt aattttttt ttaaaaattt tatttttagat 5640  
 ttaggggtat gcgtgcagg ttgctacata ggtaaacctc tatcacgggg gtttgttga 5700  
 cacattattt catcaccat gtactaagcc tagttactca atagttatct tttccgatcc 5760  
 tctcctctt cctaccctcc accctcaagt agggcccagt gtgtctgttg ttcttctttt 5820  
 gagtccatag ggttggtttc ttctgaggcc tctctccttg gottgtaggt gtccatcttc 5880  
 tcctgtatg ggtctgtgtc ccaactaaca aggacatcag tcatattgga ctagagccca 5940  
 cctaattgatt ttattttaac ttaattacct ctttaaagge tctatatcca catatagtea 6000  
 catcctgagg tataggggtt tccacatgtg gacttcaaca tatgaactgg gagagacaaa 6060  
 atttagctct taatagtgcc ccaaagtggt gaaaaggaag atctggacc cgggtttcc 6120  
 atagtagaaa gcaatcactg cttctatta agtactcaca gtggggcttc tccagaaga 6180  
 atgatatgct aataagaagg ggaggaggaa gtgatcctgg acagccagat gatatgtga 6240  
 ctattccttc ataattggaga ttctgaagag gagaagcact tgactaaaca ctttttcatt 6300  
 cctactcctg cttaaccaaa aagctgtcaa acttctgttt ctcagcccca gccctgaaa 6360  
 ttgctcagga aaaggtcatt aatagttcct tgattgccat atttcaatca aactcttgtt 6420  
 tgaattcttt tctacaacat taatactgtt actgttgact actccttctc tgaagatctg 6480  
 ttcccactaa acttctctgt tccctcctct tcagcccctc ctatacaaac tcttttgtca 6540  
 gctatttttc ctgtgcacgc ttcaaaaatg ttgcatgtc aagtttctgt cattgactct 6600  
 ctctctctc cctctcctc tcaatcctc cttcctttcc ctcactgttt ccttttaatt 6660  
 ctctctcaat actcttacag ttccagagat cttatcctta ctttatctta acctaggatc 6720  
 tctggatgga ttcaaataga gcttcttaaa ttaaaggaaa cataatgtgt atatttgcac 6780  
 cctttcttgg gagaaggccc aaaggttttt atcagaggtt tgaaacctca accgtgttgg 6840  
 tgctcctaa attgtgtctt ttgtcaagac ctgtctctg agttccaggg ccatgtgtct 6900  
 cactgcctac tggaaatctt cacctgaaac cttcacagct acctcaaact caataacatc 6960  
 aaaagctgaa atcattgtct ctcctccca aagcctgctc atcttccat ttttctttt 7020  
 tccatgaaag ctactgccat cctccttacc acccaaatta gaaatccgag catcaccacg 7080  
 acctctcccc ctctatcacc cctcagccaa tcaactacca agtcttgtcc atccttctt 7140  
 cctaacttct ctctggatg ctctcattgc atalccactt tttaaacaga gtggctcttg 7200  
 tctcaactag actgttgaat taatcttcca acttttccct ccaccttcca tctctctccc 7260  
 ctctaactca tctctggac tgctgtcaga gtacttttca taaaatataa aacagatctt 7320  
 gtgattcccc agtclaaagc ctttttatta gtcccatta ccttttagaa taaaatatgt 7380  
 actgttcatc ctgacacaca aaactcttcg tgataaatac taattgagtg cctagtatgt 7440  
 gcttgcctt gtgctaaatg ttgagggtac aggggtaaac aaggtgaaca gcttccctgc 7500

10

20

30

40

tctccaagac ctttcagtcc acaaatgcaa tgagtttaca gaggagaagc acaagctcct 7560  
aaaggagttg ggggtggggtt ggggggtcaga acctaattta gaaaattgag gaagggtctca 7620  
acctcccatc ttgcatttac aatagtaatc agcaggtgtg gtaccaaata tggaaaccaac 7680  
aatlttatct gcattatctc atttaagcca tgagtgccat tattgtllagc ctcactttac 7740  
agataaggaa actgagggct agaaggttaa ataagtggca gagttgggat ttctctcaga 7800  
ttctctgtgag acccagacat cttaatcctt ttggaacctg tgcttctcct ttgtagtact 7860  
cactacactt gtggaactac atccaactac acttgtggaa ctacagccag ctctgcaaac 7920  
atgacagtct acttcaactc aagtcctttgc tcatgtgtct cctcttgctt ggaatgccta 7980  
tttctctcaa aaatcttctt gctgaatatt ttgcgateta attaaagtgt tctctcttcc 8040  
atgtacactc ctccctcaga tagaattagc cactgtcttc tttgtgcata cacagcattt 8100  
cataaatact gtcacagtcc ctctcgcact tcaaatactt atctgatgtt ctccccctaa 8160  
gaaactgtaa gtcctagagg atgacaatca actgaattcc atagtcagaa acttctgtctg 8220  
tgcctggcct tccaatgaga aaaggagaga agaggagggg aaggaagaaa aagggaagga 8280  
gaagaaagaa aagcaaacat gaagataaac acttcaatat atgatalccc aagaccatct 8340  
acccttttgt aaaaattttg cttttttttt ttcccccca agagtcaggg tctcaactctg 8400  
tcgcccaggc tagagtgcag tgccatgaac ataactcact gtagcctcta actccggggc 8460  
tcaagcaatc ctctcgcctc agcctcctgg gtagctggga ctacaggcat gcaccaccac 8520  
atctggctat tattattatt actatattag tagagatggg gtctttctat gttgcctagg 8580  
ctggtctcaa attcctggcc tcaagcaatt ctccacctc acattggcct tccaaaagtgc 8640  
tgggattaca ataagccacc ataggccaaa atlttgcat ttatccatta ctgtaaaatt 8700  
aaccttaga aatccaacaa cactcaattt gagaattggt caacaaccac tlaatgaaa 8760  
cccctgaaa gcttcccatc ctgttgcagt ccctttctct cctcctgtgc tctctcctct 8820  
tcttctatc tagcccacc ttttggcagc taagaattcc tccctccatt ggagagccac 8880  
agaccaaaaga ggagtcaaat aagaaaataa gacctcaaag aaggaaaaca aagtgaaggc 8940  
cttgcacag aagtcacgtg gcagaaagcc acctggatat ctgaaaagaa gaaagaattg 9000  
agggatatcc gctttttgcc tcagagacca tccctagccc tgaaggcttt gtttctgctt 9060  
taggtttccc agataagcat ccgaagtgtc acagcaagga actttaagtt tccagatact 9120  
tgtctggatt ttgcaaggcg tagatgagtc acttgagaag gagaactgga atggctgctt 9180  
gggttcattt ccattgtcca atccaagggc ctgtggagaa ggggctgctg caagactctg 9240  
tgtgtggcgg ggggaggggt gggtagctgg atggcaatgg gaggatcaat taactccacc 9300  
caggagccaa atgaaacaca caaataaaaa acaaaacctg agtagtggtt tttaggctcat 9360  
tctggagtag aaagagcatt catttatagc aaaggttggc gggcacctgt gtcagccctt 9420  
gcctccactc caccctaac aagtatcagg tgcccacacg ggcctgctgc tgcctcctg 9480  
ggcttttcta agccaggtga gacctgtccc agatgtccac gaatccactg ggggagtggc 9540  
actatcaagc agagtcatct gattttctgc ctgggacctg gaccattgtg agagtaacca 9600  
acgtgggggtt acgggggaga atctggagag aagagaagag gttaacaacc ctcccacttc 9660  
ctggccacc cctccacct tttctggtaa ggagccctgg agccccggct cctaggctga 9720  
cagaccagcc cagatccagt ggcccgagg ggcctgagct aaatccgcag gacctgggta 9780  
acacgaggaa ggtaaagagt tctgtctc tcacctcccc acccccacct tttctgtgat 9840  
cttttcagcc tttcgtggt gactgttct tccagggccc atttctctac cctacctggg 9900  
tttcttctaa cctggaaatc taatgatcaa atcacactaa aaagtcagta gctcctgtgg 9960  
attacatata ccaggagcat atagattttg aattttgaat tttgaaagaa attctgcgtg 10020  
gagataatat tgaggcagag aactgctag tggctgaag atttgaaagg accactttct 10080  
gtgtgcaggc agggcctcag ctggagatag atgggtctgg gcgaggcagg agagtgacaa 10140  
gttctgaggt gaaatgaagg aagccctcag agaatgctcc tcccaccttg aatctcctcc 10200  
ccagggctct actgtcccat tcttgggtct ggggtgatcc aaatccagga gatggggcaa 10260  
gcacacctgg atggctgagg gcacactctg gcagattctg tgtgtctcct cagatgctca 10320  
gccacagacc tttgaggggag taaagggggc agaccacc accctgcctc caggctcttt 10380

10

20

30

40

```

ccttcctggg cctgttctat ggtggggctc ccttgccaga cttcagactg agaagtcaga 10440
tgaagtttca agaaaaggaa attggtgggt gacagagatg ggtggagggg ctggggaaag 10500
gctgtttact tccctctgtc tagtccggtt ggteccctta gggctccgga tatcttttgt 10560
gacttgtcca ctccagtgtg goatcagggg ctggggaaag gctgtttact tccctctgtc 10620
tagtccggtt ggtcccttta gggctccgga tatcttttgt gacttgtcca ctccagtgtg 10680
gcacatgtg gcagctgtc ctcccaactg ctctgtact tctaggttag tcagggtctc 10740
cctggttgag ggagaagttt gagatgcctt gggttcagca gagaccctt ttcaggctac 10800
gaatgagact cccacgaagg gatgggacct ctaccacat ctatagctgt ggattgagct 10860
cctaggacaa gccaaagatg ggctagaaat gaggagaatg ctggttccaa ttggggcata 10920
ctcatgagtg aggccagtca cttcaccctt ctgggtacca gaatcactct gtggaaccaa 10980
agagcttcga ctagatggtc cctagggctt gtctcttca gtttgacatt ccagggttct 11040
cctctatgat tttcaatttc taccctttct tgtggggata tgggttgagg ctctttctgt 11100
agcttggttc agggaaattc aacctgtacc cttaatttgt gagtttgac agggagcaag 11160
gggtaaggga gcagtggtga aaatagggat ttgtgtgac agtggcgcaa gaggcatgaa 11220
cagtgaggac cagagagcag gttagcaagg tccaccaga aacatctga ttcttgggaa 11280
aatlgggctc ctggggcaga ggagggcagg ggagttttaa actcactcta tgttctaate 11340
actctgatct ctgcccctac tcaatatttg atttatcttt tttcttgag tttcagctgg 11400
catgaggact ggtgagtcag cttcatggtc ttggattgac ccagtggggc acatatgggg 11460
acaaggcca taagatattg ggaatgctt gttgaatggg aaaatgctga tgtggggtta 11520
gcagggatag ttctccaac acagcagaac ttggcctgt gcttctctgg ccagctttcc 11580
ttaagatact gaacaggcca aaaatggggc caagatgctc taagactgag ccaccaagca 11640
tgggtttgca atgagctcat tctggctttg aggctccctg ggaatggcag tgtagagcct 11700
gtcctctcc ctgtcctcac cccacattat cttggctcct cagaagatct cccaaaggct 11760
gtggtgttcc tggagcctca atggtacagg gtgctcgaga aggacagtgt gactctgaag 11820
tgccagggag cctactcccc tgaggacaat tccacacagt ggtttcacia tgagagcctc 11880
atctcaagcc aggcctcgag ctacttcatt gacgctgcca cagtcgacga cagtggagag 11940
tacagggtcc agacaaacct ctccaccctc agtgaccctg tgcagctaga agtccatctc 12000
ggtgagtgca tgaaggggaa gaggaaaate accaataaag ggtgaaacaa agggctctga 12060
aatacttggg aagagccaga gatgatattc ttagagataa aagctaagat gagatgatgt 12120
gtggtcccac tgaatgggat cagagttgta gtcttagctc taagtaggtc ttggggcaaaa 12180
tgtcaaaagc tgtcagacag tagatatagg actgctgcat tgcacaattc caagaatccc 12240
catatggagt gcatacaatg tgaatgtgtc atgtgaagggt taggccatgg catagatgct 12300
caataatagt tatttatata tttattttca ttttttttaa ttttattttt tgagacagag 12360
tatcactctg taccaccaggc tggagtgcaa tgcggcaatc tcagctcact gcaacttctg 12420
cccccttggg ttgtagtgat tctcctgctc cagcctcccg agtagctgag attacaggca 12480
cccgccacca cgcccagcta atttttgtat ttttagtaga gacaggggtt caccatgttg 12540
gtcagctctg tctcaaactc ctgacctcag gtgattcacc agccttggct tcccaaagtg 12600
ctgggactac aggcgtgagc caccacacct ggccaataat atttattgaa taaattaatg 12660
aatlttggtg taggacctca atctccttct cgctctcaga catglaatgc cctaagccac 12720
ctcccaaagc aatcctagtg gcctagcctc atatctttct gtctcctcat caatgctata 12780
ctcaaaccta taattaagca taaatlttggt aatgtgatag ctcttccaat agaggcagat 12840
acatgttcag cctgcacatt aatcatgaca tgaagttct tgtgtactat taacagaata 12900
tagacgtcag acacaggtag gagaaatatt ttgaaggcag aggtctttcc tgggttccct 12960
acaatcttac cacataggct ggtccctgca gtgtcgcctt gcaaacctaa ctctacttcc 13020
acggctgttc cattcataka atgtttatgg gtggaacaag ctttggggga agaagggcat 13080
aaggaggtgg atctgcaaga gagctccatg gaattgggct tctgaaactg atttttgtgg 13140
ctctttggcc tctgacagta ccaactcaact gacatggctt tcaactctca gagctacaag 13200
aagatatgct catttctagc taggtaagag atgtccacct acaaccaaat aaaatggggg 13260

```

10

20

30

40

aattaccaag agaaagcaat agaaaaatca agtctaagag ttactagttt gccttgaact 13320  
tggctctaga aactggcttt agaagtctag ccaatcaagg ctatattaaa ctgtgacccat 13380  
gagaatttagc ttcaccaggt aaacttctga gcatccttta atccttttagg acccatttca 13440  
cttatgtcct cctctgagaa gcatttttta ctctcttttt tgtttgtttg tttgtgtttg 13500  
tttttgtttt tgtttttgag acagagtctc tctctgtcac ccaagctgga gtgcagtggc 13560  
gcaatcttgg ctcaactgcaa cctccacctc ccgggttcaa gcaattctcc tgcctcagcc 13620  
tcccagaatg ctgggactac aggtgcatgc caccacgccc ggctaatttt ttgtattttt 13680  
agtagagaca gggtttcgca gcggttagcca ggatggtcct gatctcctga ctcatgatc 13740  
tgcccacctc ggcctcccaa agtactagga ttacagatgt gagccaccgc gcccagcctg 13800  
cattttttac ttctttcagg cagaatttct ttattccaat ctagtccagc ccgcagtcct 13860  
ttattcttag cctgtttagc cacttgtcat attgtattgt gattatttct gaatatttat 13920  
gtttctatgt ctgactgtga gattctttga ggctgagaac tatatgtccc atcatctggg 13980  
tatctccagt ccacagtgtg tcatacatag tgagtgcttg atgaaatctc acttgaagga 14040  
atatacatat ggacattcac tgggtccatg acaggataga ttogaacaag aatgttccctc 14100  
caaaggccac cagactatat actaacatg actttatgct aataatgatt catctctctg 14160  
ctgaaaaagt aagtggatag ataggcacat ggcttctttt gataaatgat atctcttaat 14220  
aggtaatgaa gattactttc tgtttggcaa atctttgtgg tagagaatca tgaccaacac 14280  
acgtccctacc aattttgttt agcatcaggt agtagatttt ttaaattata gtaattcaag 14340  
ctgagaatgt agatttaaaa aataaaatta ttgtaattt tgttttgttc ttattacaaa 14400  
agtcattttg ggtcaatttc aaaaatatat aaaagtaaac aggagaaatt taaatgtcc 14460  
ttcagtecca ctctctcaga gaaaaacctt gttaatatgt aagtgcata cctctctttt 14520  
tctgtgcata atacttttta aatatattga agtattatgc ttttttaact taaattgtc 14580  
tcatgaatat tttcttatgc cattataata ctacctata acatcattat tttttaatta 14640  
ttcaggccct ttcccgacca tgacctcatg ttctctcttt gtgaagtctg attacttggg 14700  
gacatgatcg tgagaataag ctctggcgat ataagaattt cctctcttga aggccatgct 14760  
cagtaatta ctgggtgaca tgatcgtgag aataagctct ggcgatata gaatttcctc 14820  
tcttgaaggc catgctcagt aataaagttg gtctcaccga ggcctgtga cacttagaa 14880  
accacgaatl gccaggctga gcaataccag tcccgccctt cccctccctg gtgtttacat 14940  
tgagttctcc ttcacaattt ctgcagccac tccgtggcca ccgtcacctt attcctgact 15000  
gccacaagag tctttcaata ttctttgat tgcctattcc ttctgaaatc taccttttcc 15060  
tctaataagg caattcatca ttttcaaat caatttttac tctgatctag aacttactgt 15120  
gaatccttgt cacctgccac agcaaatcta agtctagcac ttaaggatcc tgcagatatg 15180  
ctcatcgttg ctctcactt acctcattgc ttagtccctc tgccttaacc ctgtgtgttg 15240  
atcacatgtg tgtgtgtccc tcttccccat tagacaaagg tcttggtatg acttcagttc 15300  
tcttgcaggg ccccatcagc tcttcccaa agggagctat gcagggttga ctcccaatct 15360  
ggctttccct tatgtctcag gatctgggtg gtacgtggcc ccttcacaaa gctctgcact 15420  
gagagctgag gcctcccggt cctggggtgt ctgtgtcttt caggctggct gttgtccag 15480  
gccctcgggt ggggtttcaa ggaggaagac cctattcacc tgagggtgca cagctggaag 15540  
aacactgtct tgcataaggt cacatattta cagaatggca aaggcaggaa gtattttcat 15600  
cataattctg acttctacat tccaaaagcc aactcaaag acagcggctc ctactctctg 15660  
agggggcttt ttgggagtaa aatgtgtct tcaagactg tgaacatcac catcaactca 15720  
ggtgagacat gtgccaccct ggaatgcccc gggacgctg tgtgtggaac ctgcaatcac 15780  
actgggaagt tgagttggga ggagattcct gatcttaca cgcacttctt catatgtggg 15840  
tccctcctgg tgatcaccag gaggtcccca aaagtccctg attgcagggt aggtttgcag 15900  
ctctgtttca gtccattctt ttggggtagc taggaggtgt cactcactct gcagcatgat 15960  
ggcaggagca gaagccacat ctccctccca ataaatacct ctgtctttcc ttacgctaat 16020  
cacacccacg gtgtcatatg ttctatcgt gctggcctcc ttcttateca agccttttag 16080  
ccacgatcca aactggcagg agccccctat cccctcacag aaagagccca gaacctgggt 16140

10

20

30

40

tctggccctg cagctaatta accatctgac cagagggtgag ccacttagtc tctctgaacc 16200  
ccaatttctt ctcccgtaac aaaaataagc tgacatttat tgggcacctt tcagtgtgct 16260  
agactctgtg ctaaaccaatt ctttacatgc acctgggttg actatcacag tagaccttca 16320  
caacatgaga taggtaatat tccattttac agatgaagta accgagggtgc aaaaataaat 16380  
aaataagttt cctaaggtc acatcaaga ctccaagcc tgtatattta accagtaagt 16440  
aaaagatttg aacaagcact aatatacctat gateccatta agtcatccac aaaacatctc 16500  
taggttctgt agcaccagcc tccagaatca gagctctaga gtggtgtgcc tggactttcc 16560  
agtttcacag aacttctatc tgtaactagc ccaagacata aattgtaaac aattgcatg 16620  
tagaaaggca gcaaacacc ttttgagatt ttgacactac aatgccataa ttgtacaaa 16680  
aataatttca tgacacttta aactgaaagt aaatactccc aagtggtag ggaagagag 16740  
caaaataagc aaatggggtg acatgtaaac aatgagtggg tctgggtaa gataatcga 16800  
gattaaacta ttctggtcat tttttttta agtttgaaa tatatcaaaa tcaagagttt 16860  
aaaaaattga aatgcaaat caacaaatt gtcccagtt ctagaccata gcattgtctg 16920  
acaatttctt aactgtcaca caaacaccag cttacaacct aactgttaa cgctccctgt 16980  
cacatctctg tcaacaagc aggagcctt gctcagtgt tggtagctg tctctgctc 17040  
agatagcact aagatcagga accaatggga ggaagcaata ctttcccca gacttcccca 17100  
ccattcctac cacttgctg ttggtgttg tcaagactt tctactggtg acctcactgt 17160  
ttgttccaaa tatctgcctt agtgactgtc atttttttc atctctccac ttctcctaat 17220  
aggtttgga gtgtcaacca telcatcatt ctttccacct gggtagcaag tctctttctg 17280  
cttggtagt gtactcctt ttgcagtggg cacaggacta ttttctctg tgaagacaaa 17340  
cattcgaagc tcaacaagag actggaagga ccataaattt aatggagaa aggaccctca 17400  
agacaaatga cccccatccc atgggggtaa taagagcagt agcagcagca tctctgaaca 17460  
tttctctgga ttgcaaccc catcatcctc aggcctctct acaagcagca ggaacatag 17520  
aactcagagc cagatccctt atccaactct cgacttttcc ttggtctcca gtggaaggga 17580  
aaagcccatg atcttcaagc agggaagccc cagtgagtag ctgcattcct agaaattgaa 17640  
gttctcagagc tacacaaaca cttttctgt cccaaccgtt cctcacagc aaagcaaca 17700  
tacaggctag ggatggtaat cctttaaaca tacaanaatt gctcgtgta taaattacc 17760  
agttagagg ggaaaaaaaaa acaattatc ctaaataaat ggataagtag aattaatggt 17820  
tgaggcagga ccatacagag tgtgggaact gctggggatc tagggaattc agtgggacca 17880  
atgaaagcat ggctgagaaa tagcaggtag tccaggatag tctaaggag gtgttcccat 17940  
ctgagcccag agataagggt gtcttcttag aacattagcc gtagtggaat taacaggaaa 18000  
tcatgagggt gacgtagaat tgagtcttcc aggggactct atcagaactg gaccatctcc 18060  
aagtatataa cgatgagtcc tcttaatgct aggagtagaa aatggtccta ggaaggggac 18120  
tgaggattgc ggtgggggt ggggtgaaa agaaagtaca gaacaaacc tgtgtcactg 18180  
tccaagttg ctaagtgaac agaactatct cagcatcaga atgagaaagc ctgagaagaa 18240  
agaaccaacc acaagcacac aggaagaaa gcgcaggag tgaaaatgct ttcttgcca 18300  
ggtagtaag aattagaggt taatgcagg actgtaaac cacctttct gcttcaatat 18360  
ctaattcctg ttagctttg ttcatgcat ttattaaaca aatgtgtat aaccaatact 18420  
aaatgtacta ctgacttctg ctgagttaag ttatgaaact ttcaaatcct tcatcatgtc 18480  
agttccaatg aggtggggat ggagaagaca attgttgcct atgaaagaaa gctttagctg 18540  
tctctgtttt gtaagcttta agcgaacat ttcttgggtc caataaagca ttttacaaga 18600  
tcttgcagtc tactcttaga tagaagatgg gaaaaccatg gtaataaaat atgaatgata 18660  
aaattcttct ttcttccctt tgtccaacat tgtaacagag attggtttgg attggtaga 18720  
aacaccccct cctcccagca accatctcac cacaactcat ataaattagc cagcttgcct 18780  
tccaaatctt gctgagacaa ttgggctaag gaggattctt atgggaagta tgggatagga 18840  
gggtgaataa gcattagaga tctttttaga gcattggggc agataggaga aggcacagct 18900  
acacaggagg tagaggcctg ggcagaggta gagggtcagc ctgattgtat gaattatgag 18960  
ctatatacca agacgattca agctagattg catacataaa tattacataa gattccgaca 19020

10

20

30

40

cgacacaggt gcatttggaa accttggaca ttcaactcac atttatttac tacctacaat 19080  
gtgcaagcct gagttcaggt gctgaagata ccagatgaac aacacagggc cattccctgg 19140  
agaagcctta tttctagtga gaaaaacagt taaataggaa gagaatgaag aaagggtgc 19200  
agaaaagagg cttgatttgg ggggtgtggt catgaaggat gagtaggagt tgcaccaggca 19260  
aagaagagaa gaaaagccca aggttcatag gcaaagattc aaaaaccaga gtgtgagttc 19320  
aagaaagcag tttggttctg tgtcgggtgag ggagagggaaa gagtttcagg gccagatcat 19380  
gaagggcatt accttccaaa ctaaggagat cgtatcagac cctgcaatac attgagagag 19440  
tttaagcaga ccaggtttgt accgtatagt altttagaag gattctctcg caactacttg 19500  
atggatggac gggacaggag agttgaagac cagaagccaa atagggcagc aaggcaggat 19560  
gcagtaaccc aaaggagca atgaggaagt aactggcggg gaggctggag aggaaggtgc 19620  
ttaatcaaca aggtatttag gaggccgact ctccaagaat tggcagccag cagtacacgg 19680  
cgtgactaag gaccaggttc cacacatagt gcccgtttcc tgagtttaga aatagaaagg 19740  
caaggcaggt acaggtttgg tggaaagaca aacaattcgt tttggtatta ttagtactta 19800  
cttcccttgg tcagtaaaatt ttcttaaagt gtcagtttcc ataacgtaat tgccgtggtt 19860  
aagcagctaa gagttatcac tacaacccta gtcggaaaaa ccaaatacct caaaattacc 19920  
cgtacagcac taaggcagaa gaggacattg ggaaccacac aacgcggagg tctgctacca 19980  
gagctccctg cggtttagcac cgcggctggt tttgagcggc aaggcccccag cgctcccagc 20040  
ggatagcacc gcaccgagtt ttttcagtca aagtttcaaa aaccagggtt tcacaaaaatg 20100  
cgaactccgt ccctgggtgg gatcgaacca ccaaccttcc ggttaacagc cgaaccgct 20160  
aaccgattgc gccacagaga cgggcggttg cgattttggc tgccaagtca cttcactgaa 20220  
gaaaaaatgc tcagcactca cgtctccaaa aaaattgagg ttgatttgaa accagtgaca 20280  
caattagcct tccgtgcttc agggcggggc tcatagccct gagcggagca ggtctttttt 20340  
ctgcgctagc acttgccctag atctggagca ggaactcagct tccagcagaa gaggttgaga 20400  
aaagagagc agaagagaat gcaggaacga agggctcttc gggaaatccaa aatggatgct 20460  
ctctgtgggt tcgggggttc cgttgatltt ggtcagagaa gtacgacgat aagctttttt 20520  
tgctgatgta gacaacttat gtatgcatgt gcacacgltt agtgctgact cataataagc 20580  
ttaltatcgt gagcaltaaa aatattttct ttcaggcca atcacgtcca gcaaaatgtg 20640  
atgtctaagt aagtgagttt tgtgttacia aattagtctt caaccacgc tgttttgaaa 20700  
ggtttctacc ggcatattag acatgcagac agaacacgga gcttaaaaag cctgtaacat 20760  
tccaatlaat ggtatlcagc ttgaaataa aaaatatttt ttaaaaaatg cgtgcaactt 20820  
aaggacttcc atgctgacat atccagatcc aaatatctga ggacagagac ccctaattcc 20880  
accaccatcg acctagggaa cctcgtcagt gctgggtcta aaaaggcttt tttttttct 20940  
ttaattcata tqtatatata ctttattcat atatatatat actttaagtt ctaggctaca 21000  
tgtgcacaag gtgcaggttc gttacatata catgtgccat gttggtgtgc tgcaccatt 21060  
aactcgtcat ctacattagg tgtttctcct aatgttatcc ctccctcctt cccccacca 21120  
cgacaggtcc cgggtgtgta tgttccctac catgcacacg tatgtttatt gtggaactat 21180  
tcacaatagc aaagacttgg aaccaacca aatgtccatc aatgatagac tggattaaga 21240  
aaatgtggca catatacact atggaatact atgcagccat aaaaaaggat gagttcatgt 21300  
cctttgtagg gacatagatg aagctggaaa ccatcagctc gaacaaacta tcacaaggac 21360  
agaaaaatcag acaccgcatg ttctcactca taggtgggaa ttgaacaata agaacacttg 21420  
gacgaaagcc attttctata ttgocaaaa accagggtct ctccatagcc tccacacaga 21480  
atctccttcc tttctgccct gccatcctct gtcacagtg ggctccagtt taggagcagg 21540  
tggaaagttt caatgatgtt cagtgaaatg agaagacatg caaacataga tatgtatatg 21600  
cagaaattat atatgcatat atgtttatat gtacacagta tcatatgtat aataaataag 21660  
taaataaata aataaatttg ccaaatgatc tttaaactag agtcatttat tttttttatt 21720  
aatttttttt ttgagatgg agtcttgctc tgtcggccag gctggagtgc agtggcgcaa 21780  
tcttggctca ctgcaacctc cacctcccac atccaagcaa ttctcctgtc tcagcctcct 21840  
gagtagctga gattacagtc atgggcccac atgcccggct aatttttcta tttttttttt 21900

10

20

30

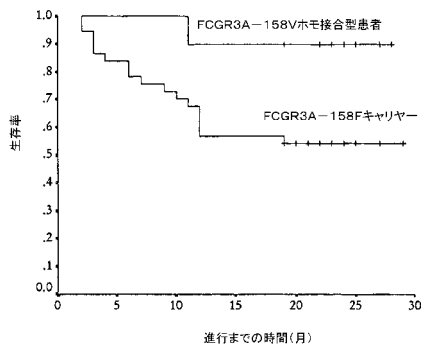
40

```

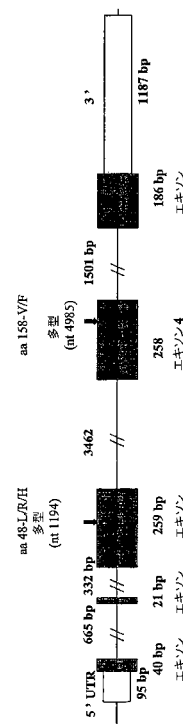
ttttttttg agacagagtc tcgctgtcgc ccaggttgga gtgcagtggc gcgatctcgg 21960
ctcactgcag gctccgcccc cgggattca cgccattctc ctgcctcagc ctctgagta 22020
gctgggacta caggcacctg ccacctcgcc cggctaattt ttttgtattt ttggtagaga 22080
tgggctttcg ctatgttggc caggctggtc tcaaacctct gacctcaggt gatcctcctg 22140
cctcagcctc ccaaactgct gggattacag gtgagagcca ctgtaccagg cctagagtca 22200
tttcttttat actttaaatt tttgtctctg ttcttttctg cagacctgtg gagctggcaa 22260
tatgggcaag tgtcatggac tgtctactgc caggaagctc cattgtcacc gacaggatca 22320
gaagtggcat ggtaaatggt acaagaaagc ccattcgggc acagtctcga agaccagcct 22380
ttttggaggt gcttctcatg caaagggaat tgggctggaa aaagttagga ttggagccaa 22440
atagcccagc tctgccactg agaagtgtgc cagggccaag ctgatcatcc agcataagct 22500
agatgctgtg gtctccactg gcacagctga tctctctgtt acaggatgga ggctgtgagg 22560
cagatgagag aacagcaaga aatcacagc ctttgtacct gatgatgatt gcttgaattt 22620
tattgaaaaa aatgatgaag ttctgtatca ggggaaccag cacccaatat ttcaatgtag 22680
gttct 22685

```

【 図 1 】



【 図 2 】









---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

G 0 1 N 33/566

(74)代理人 100078662

弁理士 津国 肇

(74)代理人 100075225

弁理士 篠田 文雄

(72)発明者 ワティエ, エルヴェ

フランス国、エフ - 3 7 5 1 0 バラン - ミール、リュ・デュ・マレシャル・フォッシュ 5 8

(72)発明者 カルトロン, ギョーム

フランス国、エフ - 3 7 5 1 0 サヴォニエール、ルート・デュ・プティ・プワ 6 8

(72)発明者 コロンバ, フィリップ

フランス国、エフ - 3 7 2 7 0 ラルケ、ロシュカーヴ

審査官 三原 健治

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

COLOMBAT, BLOOD, V97, P101-106

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

C12Q 1/68

C12N 15/00-15/90

专利名称(译)	用于评估抗体治疗反应的方法和组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP4216720B2</a>	公开(公告)日	2009-01-28
申请号	JP2003538404	申请日	2002-10-11
[标]申请(专利权)人(译)	CENT HOSPITALER区域和UNIV DE TOURS 伊纳特医药公司		
申请(专利权)人(译)	中心 - Osupitarie , 商业中心菜等技术的Uni威赛瓷砖去旅游 Ineito制药		
当前申请(专利权)人(译)	中心 - Osupitarie , 商业中心菜等技术的Uni威赛瓷砖去旅游 Ineito制药		
[标]发明人	ワティエエルヴェ カルトロンギョーム コロンバフィリップ		
发明人	ワティエ,エルヴェ カルトロン,ギョーム コロンバ,フィリップ		
IPC分类号	C12Q1/68 C12N15/09 G01N27/447 G01N33/53 G01N33/566 C12Q1/6886		
CPC分类号	C12Q1/6881 C12Q1/6886 C12Q2600/106 C12Q2600/156		
FI分类号	C12Q1/68.ZNAZ C12Q1/68.A C12N15/00.A G01N27/26.301.A G01N33/53.M G01N33/566		
代理人(译)	津国 肇 筱田文雄		
审查员(译)	三原贤治		
优先权	2001402718 2001-10-19 EP		
其他公开文献	JP2005506093A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

本发明涉及用于评估或评估受试者对特定治疗性治疗的反应的方法和组合物。更具体地,本发明提供了确定受试者反应的方法,或适应待治疗抗体治疗对象的治疗方案的方法。本发明基于受试者的FCGR3A基因型的确定。另外,本发明的恶性肿瘤,特别是在淋巴瘤患者,适于调节至最佳的选择和/或低应答者为应答者治疗病症或协议使用。

Ab特异性	DCI	商用名	代表的な適応症
抗CD20	リツキシマブ	リツプテラ (MabThera (登録商標)) リツパタン (Rituxan (登録商標))	LNH B
抗CD52	アレムツズマブ (alemtuzumab)	キャンパス-1H (CAMPATH-1H (登録商標))	LLC, 同種移植片
抗CD33		アマミル (Amyl (商標))	急性骨髄性白血病
抗HLA-DR		レミトゲン (Remitogen (商標))	LNH B
抗CD22	セプラツズマブ (ceprazuzumab)	リンフォサイド (LymphoCide (商標))	LNH B
抗erbB2 (HER-2/neu)	トラズツズマブ (trastuzumab)	ハーセプチン (Herceptin (登録商標))	転移性乳癌
抗EGFR (HER-1, erbB1)	セツキシマブ		ORLおよび結腸直腸癌
抗MUC-1		テラツタス Theras (登録商標)	乳癌および上皮癌
抗CEA	ラベツズマブ (labetuzumab)	CEAサイド (CEA-Cide (商標))	癌(抗血管形成)
抗αVβ3 抗RDR (MEGTR2)		ビタキシン (Vitaxin)	癌(抗血管形成)
抗VRS 融合タンパク質 Idom	パリビツズマブ (palivizumab)	シナジス (Synagis (登録商標))	ウイルス性疾患
CMV	セビルマブ (sevirumab)	シマックス (Numax (商標))	Idom
HRs	セビルマブ ツビルマブ	オスタビル (Ostavir (商標))	CMV感染症
抗CD25	バシリキシマブ (basiliximab)	シムレク (Simulect (登録商標))	B型肝炎
抗CD25	ダシリンマブ	ゼナパックス (Zenapax (登録商標))	予防/絶縁 同種移植片拒絶
抗TNF-α	インフリキシマブ	レミケード (Remicade (商標))	予防/絶縁 同種移植片拒絶
抗IgE	オマリズマブ	キツレフ (Xolair (商標))	クローン病, 多発性関節炎, アレルギー
抗インテグリンαL (CD11a, LFA-1)	エファリズマブ	キサンレル (Xanarel (商標))	乾癬
抗CD4	ケリキシマブ (keliximab)		
抗CD2	シプリツマブ (sipilizumab)		
抗CD64			腎臓
抗CD147			GVHD
抗インテグリンα4 (α4β1-α4β7)	ナタリズマブ (natalizumab)	アンテグレン (Antegren (登録商標))	硬化症, クローン
抗インテグリンβ7			クローン, RCH
抗CD44	クレノキシマブ		