

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3835827号
(P3835827)

(45) 発行日 平成18年10月18日(2006.10.18)

(24) 登録日 平成18年8月4日(2006.8.4)

(51) Int. Cl.	F I	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	A 6 1 K 37/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	H
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	

請求項の数 27 (全 25 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平10-548301	(73) 特許権者	505395582
(86) (22) 出願日	平成10年5月1日(1998.5.1)		ザ ガバメント オブ ザ ユナイテッド
(65) 公表番号	特表2001-507944 (P2001-507944A)		ステイツ オブ アメリカ, アズ リブ
(43) 公表日	平成13年6月19日(2001.6.19)		レゼンティッド バイ ザ セクレタリー
(86) 国際出願番号	PCT/US1998/008983		オブ ザ デパートメント オブ ヘルス
(87) 国際公開番号	W01998/050435		アンド ヒューマン サービスズ
(87) 国際公開日	平成10年11月12日(1998.11.12)		アメリカ合衆国 メリーランド 2089
審査請求日	平成12年6月12日(2000.6.12)		2, ベセスダ(番地なし)
(31) 優先権主張番号	60/046,895	(73) 特許権者	503387743
(32) 優先日	平成9年5月2日(1997.5.2)		イミュノメディックス, インコーポレイ
(33) 優先権主張国	米国(US)		テッド
			アメリカ合衆国 ニュージャージー 07
			950, モリス プレインズ, アメリ
			カン ロード 300

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 悪性細胞に対する、oncタンパク質を含む、免疫毒素

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗CD22抗体に連結した測定可能なりが核酸分解活性を有するoncタンパク質を含む、選択的細胞傷害性試薬であって、該oncタンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するか、あるいは配列番号1に記載のアミノ酸配列において1もしくは数個のアミノ酸の置換、付加もしくは欠失を有し、かつ、ガン細胞に対する細胞毒性を有する、試薬。

【請求項2】

前記oncタンパク質が、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の試薬。

【請求項3】

前記oncタンパク質が組換え手段によって産生される、請求項1に記載の試薬。

【請求項4】

前記oncタンパク質が、配列番号2として同定された核酸分子によってコードされる、請求項3に記載の試薬。

【請求項5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項1に記載の試薬。

【請求項6】

前記モノクローナル抗体がヒト化される、請求項5に記載の試薬。

【請求項7】

前記モノクローナル抗体が単鎖抗体である、請求項 6 に記載の試薬。

【請求項 8】

前記抗体が、B 細胞リンパ腫に特異的である、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 9】

前記抗体が、R F B 4 および L L 2 からなる群より選択される、請求項 8 に記載の試薬。

【請求項 10】

前記 o n c タンパク質が、組換え融合によって前記抗体に結合される、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 11】

請求項 10 に記載の融合タンパク質をコードする、核酸配列。

10

【請求項 12】

抗 C D 2 2 抗体に連結した測定可能なりボ核酸分解活性を有する o n c タンパク質を含む選択的細胞傷害性試薬を、薬学的に受容可能なキャリアとともに含む、薬学的組成物であって、該 o n c タンパク質は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するか、あるいは配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸の置換、付加もしくは欠失を有し、かつ、ガン細胞に対する細胞毒性を有する、薬学的組成物。

【請求項 13】

前記 o n c タンパク質が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

20

前記 o n c タンパク質が組換え手段によって産生される、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

前記 o n c タンパク質が、配列番号 2 として同定された核酸分子によってコードされる、請求項 14 に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記 o n c タンパク質が、組換え手段によって前記抗体に結合される、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

30

【請求項 18】

前記モノクローナル抗体がヒト化される、請求項 17 に記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

前記モノクローナル抗体が単鎖抗体である、請求項 18 に記載の薬学的組成物。

【請求項 20】

前記抗体が、B 細胞リンパ腫上に存在する表面マーカーに対する、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

前記抗体が、R F B 4 および L L 2 からなる群より選択される、請求項 20 に記載の薬学的組成物。

40

【請求項 22】

抗 C D 2 2 抗体に連結した測定可能なりボ核酸分解活性を有する o n c タンパク質を含む選択的細胞傷害性試薬の、悪性 B 細胞を殺傷するための医薬の製造における使用であって、該 o n c タンパク質は、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有するか、あるいは配列番号 1 に記載のアミノ酸配列において 1 もしくは数個のアミノ酸の置換、付加もしくは欠失を有し、かつ、ガン細胞に対する細胞毒性を有する、使用。

【請求項 23】

前記 o n c タンパク質が、配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を有する、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】

50

前記 on c タンパク質が組換え手段によって産生される、請求項 2 2 に記載の使用。

【請求項 2 5】

前記 on c タンパク質が、配列番号 2 として同定された核酸分子によってコードされる、請求項 2 4 に記載の使用。

【請求項 2 6】

前記抗体が L L 2 である、請求項 2 2 に記載の使用。

【請求項 2 7】

前記抗体が L L 2 である、請求項 1 3 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

関連出願に対する相互参照

本出願は、1997年5月2日に出願された米国特許仮出願第60/046,895号の継続出願であり、そして優先権を主張する。

合衆国後援の研究または開発

適用されない。

発明の背景

リシン、ジフテリア毒素、および Pseudomonas 毒素のような植物および細菌由来の毒性酵素は、細胞型特異的殺傷試薬を生じるために抗体またはレセプター結合リガンドに結合している (Youle ら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 77:5483(1980); Gilliland ら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 77:4539(1980); Krolick ら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 77:5419(1980))。細胞認識部分が必ずしも抗体ではないという事実に関係なく、これらに関する毒素は、一般的に免疫毒素として公知である。これらのハイブリッドタンパク質は、抗体または分子のリガンド部分が認識するレセプターまたは細胞表面マーカーを発現する細胞を殺傷する。

適切な条件下で、特定のレセプターまたは細胞表面マーカーに依存して、毒素はサイトゾルに入り、タンパク質合成機構を不活化し、そして標的細胞の殺傷を引き起こす。免疫毒素は、細胞培養物中および動物モデルで増殖するガン細胞に非常に細胞傷害性であることが示されており、その播種性のため、伝統的な外科手術技術によって処置可能でない血液およびリンパ媒介性悪性腫瘍、ならびに腹膜内腔のような制限された区画における固体腫瘍を処置するためのこれらの試薬の可能性を証明する (Griffin ら, IMMUNOTOXINS, p 433, Boston/Dordrecht/Lancaster, Kluwer Academic Publishers(1988); Vitetta ら, Science 238:1098(1987); Fitzgerald ら, J. Nat'l Cancer Inst. 81:1455(1989)によって総説される)。伝統的

化学療法は、いくつかのガン状態の処置に有効であるが、化学療法化合物の全身毒性による望ましくない副作用を示す。したがって、ガン治療のための理想的な候補は、患者のガン細胞に選択的に細胞傷害性であるが非ガン細胞に対して無害のままである免疫毒素である。しかし、この型の抗腫瘍治療の利用は、免疫毒素を含む外来タンパク質に対する患者の免疫応答の発現によって妨害されている。マウスモノクローナル抗体 (Sawler ら, J. Immunol. 135:1530(1985); Schroff ら, Cancer Res. 45:879(1985)) および抗毒素抗体に対する免疫応答は、免疫毒素で処置した動物およびヒトの両方で検出されている (Rybak ら, Immunol. and Allergy Clinics of North America 11(2):359(1991); Harkonen ら, Cancer Res. 47:1377(1987); Hertler, A. IMMUNOTOXINS p.475, Kluwer Academic Publishers, Boston/Dordrecht/Lancaster(1988))。ヒト化技術の進歩は、免疫毒素の抗体部分に関連するいくつかの免疫原性を緩和した (Bird ら, Science 242:423(1988); Huston ら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:5879(1988); Ward ら, Nature 341:544(1989); および Jones ら, Nature 314:522(1986))。しかし、患者の免疫抑制以外の、毒性部分の免疫原性に対抗する解決法は見いだされていない (Khazaeli ら, Proceedings of AACR 29:418(1988))。したがって、免疫毒素の毒性部分の免疫原性を減少させるが所定の表面マーカーを有する細胞を選択的に殺傷する能力を保持する方法および組成物に対する必要性が継続して存在している。

B細胞リンパ腫は、非ホジキンリンパ腫の一般的規定内に属し、そしてリンパ系内の播種性腫瘍または固体腫瘍であり得る。悪性B細胞における表面マーカーであるCD22に対して惹起されている放射標識されたヒト化マウス抗体 (LymphoCide^T) は、B細胞リンパ腫につ

10

20

30

40

50

いての処置として現在臨床試験中である(Immunomedics, Inc., Press Release, <http://www.immunomedic.com/theral.html>). Amlotら, Blood 82:2624-2633(1993); Sausvilleら, Blood 85:3457-3465(1995); Grossbardら, Blood 81:2263-2271(1993); Grossbardら, Clin. Oncol. 11:726-737(1993)も参照のこと。これまで、いくつかの抗腫瘍応答が注目されているが、正常組織に対する免疫毒素媒介毒性によって、しばしば治療レベルでの投薬が抑制されている。CD22の他に、CD19およびCD40のようないくつかのB細胞特異的抗原は、リシンA鎖のような植物毒素およびPseudomonas外毒素A(PE)のような細菌毒素を用いて作製された免疫毒素によって標的化されている。Uckunら, Blood 79:2201-2214(1992); Ghetieら, Cancer Res. 51:5876-5880(1991); Franciscoら, Cancer Res. 55:3099-3104(1995)。

腫瘍細胞に対するRNase Aの細胞傷害性は、1960年代および1970年代に行われた研究から十分に文献に示されている。初期の研究は、Roth, Cancer Res. 23:657(1963)に総説される。これらの初期の研究の関連は、Rana pipiensの卵母細胞からの抗腫瘍タンパク質が、ウシ膵臓RNase Aに相同であるという発見によって確認されている(Ardeltら, J. Biol. Chem. 256:245(1991))。P-30タンパク質(および本明細書でoncタンパク質といわれる)を、インビトロで(Darzynkiewiczら, Cell Tissue Kinet. 21:169(1988); Mikulskiら, Cell Tissue Kinet. 23:237(1990))および動物モデルで(Mikulskiら, J. Nat'l. Cancer Inst. 82:151(1990))ガン細胞に対する抗増殖/細胞傷害性効果に基づいてRana pipiens初期胚の抽出物から単離した。種々の固体腫瘍を有する患者におけるoncタンパク質の第III相ヒト臨床試験は、現在進行中である。

発明の要旨

本発明は、悪性B細胞および他の悪性細胞を殺傷するために有用である免疫毒素に関し、そしてB細胞上の表面マーカーおよび免疫毒素をコードする核酸構築物に関する。これらの試薬は、選択された腫瘍細胞との特異的結合を可能にする抗体に連結されたりボ核酸分解(ribonucleolytic)活性を有するRana pipiensタンパク質に由来する毒性部分を含む。発明者らは、これらの特定の免疫毒素が、ヒトRNase相対物よりもまたは毒素自体よりも悪性B細胞に対して2000倍以上まで活性である、非常に驚くべき特性を有することを見いだした。さらに、以下により詳細に記載されるように、播種性腫瘍に対してインビボで投与された場合、それらの使用は、劇的に低下した副作用を生じた。これらの非常に効果的であるが、見かけ上非毒性の、B細胞リンパ腫のような遍在性疾患に対する免疫毒素は、このような疾患にかかっている患者に対する新たなかつ刺激的な治療選択を提示する。

本発明の目的は、所定の表面マーカーを有する細胞を選択的に殺傷する細胞傷害性RNase(oncタンパク質)免疫毒素を提供することである。これらの免疫毒素は、最小の免疫原性であり、そして現在公知の免疫毒素よりも少ない全身毒性を生じる。特に、本発明の目的は、腫瘍細胞上の特異的マーカーを認識するヒト化抗体に連結されたりボ核酸分解活性を有するタンパク質フラグメントを含む免疫毒素を直接提供することである。

他の実施態様では、本発明は、本発明の免疫毒素および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物に関する。

さらなる実施態様では、本発明は、細胞を選択的に殺傷する方法に関する。この方法は、モノクローナル抗体が、腫瘍細胞上の表面マーカーに結合し、それによって毒性oncタンパク質に細胞を殺傷させるような条件下で、本発明の選択的免疫毒素と、殺傷されるべき腫瘍細胞とを接触させる工程を包含する。

本発明の種々の他の目的および利点は、本発明の以下の説明から明らかである。

図面の説明

図1は、ONCONASE_Rが、免疫毒素LL2-ONCONASE_RよりもHUT 102 T細胞リンパ腫細胞(LL2によって認識されるCD22マーカーを有さない)に対してより細胞傷害性であることを示す。

図2は、ONCONASE_R単独と比較した場合、パーキットリンパ腫細胞株に対するLL2-ONCONASE_Rのより優れた細胞傷害性を証明する。

図3は、CD22に対する抗体に結合したONCONASE_Rが、抗CD22抗体に結合したEDNよりもタンパク質合成がより阻害的であることを示す。EDNは、本文に記載のようにヒト非毒

10

20

30

40

50

性RNaseである。

図4は、ONCONASE_Rが、ヒト膵臓RNaseと比較して、抗体に結合した場合にタンパク質合成がより阻害的であることを示す。

図5Aおよび5Bは、¹²⁵I-標識したLL2-ONCONASE_Rが、LL2抗体またはLL2-EDN免疫毒素ほど迅速にDaudi細胞のリソソームによって分解されないことを証明する。図5Aは、細胞に保持されるRNase物質の割合を示し、そして図5Bは、分解されそして上清に放出されるRNase物質の割合を示す。

図6は、LL2抗体がLL2-ONCONASE_Rの細胞傷害性効果を減少させることを証明する。LL2が、CD22への結合についてLL2-ONCONASE_Rと競合し、そしてONCONASE_Rのインターナリゼーションを抑制し、そのため細胞傷害性を減少させると考えられる。

図7は、LL2-ONCONASE_RがB細胞リンパ腫からSCIDマウスを防御したことを示す生存グラフである。5 × 10⁶ Daudi細胞を、マウスに腹腔内移植した。24時間後、マウスを500 μgの示された化合物で静脈内処理した。

図8は、LL2-ONCONASE_Rが2 × 10⁶のDaudi細胞の腹腔内移植からSCIDマウスを完全に防御したことを示す生存グラフである。マウスを、500 μgの示された化合物(100 μgを5日間毎日)を用いて移植の24時間後に処理した。

図9は、ONCONASE_R単独およびIT-dgRTA(RFB4-脱グリコシル化リシンA鎖)と比較した場合、LL2-ONCONASE_R免疫毒素の減少した毒性を示す。薬物を、1日当たり2時間毎に4回で5日間投与した。矢印は、各それぞれの処理でのマウスの死亡が見られた日数を示す、すなわち、30mg/kg ONCONASE_Rで処理したマウスは4日目に死亡が見られ、そして50mg/kg IT-dgRTAで処理したマウスは7日目に死亡が見られた。

発明の詳細な説明

本発明は、RNaseタンパク質、特にB細胞に対し指向された免疫毒素における毒性部分としてRana pipensに由来するRNaseの使用に関する。本発明の免疫毒素試薬は、タンパク質および選択された腫瘍細胞表面マーカーに特異的に結合する抗体を含む。以下に詳述した研究では、oncタンパク質は、CD22またはCD74に対する抗体およびヒト非毒性RNaseを含む他の免疫毒素よりもはるかに優れていることが示される。oncタンパク質に基づく免疫毒素は、B細胞リンパ腫および白血病のような悪性B細胞、ならびに神経芽細胞腫のような他の悪性腫瘍に対する強力な薬剤である。

定義

用語「抗体」または「抗体ペプチド」とは、ポリクローナルおよびモノクローナル抗体、標的抗原に結合する免疫グロブリン分子の全体の免疫グロブリンまたは抗体もしくは任意の機能的フラグメントをいい、以下により詳細に定義される。このような機能的実体の例には、完全な抗体分子、Fv、一本鎖Fv、相補性決定領域(CDR)、V_L(軽鎖可変領域)、V_H(重鎖可変領域)、Fab、F(ab)₂'のような抗体フラグメント、およびそれらの任意の組み合わせ、あるいは標的抗原に結合し得る免疫グロブリンペプチドの任意の他の機能的部分が挙げられる。

抗体は、例えば、完全なままの免疫グロブリンとして、または種々のペプチダーゼでの切断によって産生される多数の十分に特徴づけられたフラグメントとして存在する。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域におけるジスルフィド結合下で抗体を切断して、F(ab)₂'を産生し、これはそれ自体がジスルフィド結合によってV_H-C_{H1}に連結された軽鎖であるFabのダイマーである。F(ab)₂'は、ヒンジ領域においてジスルフィド結合を破壊する穏和な条件下で還元され得、それによってF(ab)₂'ダイマーをFab'モノマーに変換する。Fab'モノマーは、本質的にヒンジ領域の一部を有するFabである(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, 第3版, W.E. Paul編, Raven Press, N.Y. (1993)を参照のこと)。種々の抗体フラグメントは、完全なままの抗体の切断によって定義されるが、当業者は、このようなフラグメントが、化学的にまたは組換えDNA方法論のいずれかを利用して、新規に合成され得ることを理解する。したがって、本明細書で使用される場合、用語抗体はまた、抗体全体の改変によって産生されるか、または組換えDNA方法論を使用して新規に合成されるフラグメントのいずれかの抗体フラグメントを含む。

本発明については、抗体は、抗原と相互作用するならば、抗原「と反応性である」かまたは抗原「に結合する」。この相互作用は、2つのリアクタントが一緒になって産物を形成する化学反応に類似する。抗体-抗原相互作用の場合には、相互作用の産物は、抗体-抗原複合体である。本発明の免疫グロブリンに結合する好ましい抗原は、CD22およびCD74細胞表面マーカーである。

用語「結合特異性」、「抗体に特異的に結合する」、または「特異的に免疫反応性である」とは、タンパク質または炭水化物をいう場合、タンパク質および他の生物学的薬剤の異種集団の存在下でタンパク質または炭水化物の存在の決定因子である結合反応をいう。したがって、指示されたイムノアッセイ条件下で、特定された抗体は、特定のタンパク質または炭水化物に結合し、そして試料に存在する他のタンパク質または炭水化物に有意な量で結合しない。このような条件下で抗体への特異的結合は、特定のタンパク質または炭水化物に対するその特異性について選択された抗体を必要とし得る。例えば、CD22抗原に対して惹起された抗体は、CD22タンパク質と特異的に免疫反応性でありそして他のタンパク質と免疫反応性でない抗体を提供するために選択され得る。種々のイムノアッセイ形式は、特定のタンパク質または炭水化物と特異的に免疫反応性の抗体を選択するために使用され得る。例えば、固相ELISAイムノアッセイは、タンパク質または炭水化物と特異的に免疫反応性の抗体を選択するために日常的に使用される。特異的免疫反応性を決定するために使用され得るイムノアッセイ形式および条件の説明については、HarlowおよびLane, ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Publication, New York (1988)を参照のこと。

用語「ヒト化」とは、定常領域が、ヒト免疫グロブリンに対して少なくとも約80%以上の相同性を有する抗体をいう。さらに、マウスのような非ヒト可変領域アミノ酸残基のいくつかは、ヒト起源のアミノ酸残基を含むように改変され得る。

ヒト化抗体は、「新形態を備えた」抗体といわれている。相補性決定領域(CDR)の操作は、ヒト化抗体を達成する1つの方法である。例えば、Jonesら, Nature 321:522(1988)およびRiechmannら, Nature 332:323(1988)を参照のこと、両方とも参考として本明細書に援用される。ヒト化抗体に関する総説文献については、WinterおよびMilstein, Nature 349:293(1991)を参照のこと、これは参考として本明細書に援用される。

用語「単離された」または「実質的に精製された」とは、核酸またはタンパク質に適用される場合、核酸またはタンパク質が、天然の状態で結合される他の細胞成分を本質的に含まないことを示す。好ましくは、均質であるが、乾燥または水溶液のいずれかであり得る。純度および均質性は、代表的には、ポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーのような分析化学技術を使用して決定される。調製物に存在する優勢な種であるタンパク質が、実質的に精製される。

特に、単離されたoncタンパク質遺伝子は、その遺伝子に隣接しそしてoncタンパク質以外のタンパク質をコードするオープンリーディングフレームから分離される。用語「精製された」とは、核酸またはタンパク質が、電気泳動ゲルにおいて本質的に1つのバンドを生じること示す。特に、核酸またはタンパク質が、少なくとも85%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、および最も好ましくは少なくとも99%純粋であることを意味する。

用語「核酸」とは、一本鎖または二本鎖のいずれかの形態のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドポリマーをいい、そして他に限定されない限り、天然に存在するヌクレオチドと類似の方法で機能し得る天然のヌクレオチドの公知のアナログを包含する。本発明の免疫毒素の文脈において用語「連結される」とは、ジスルフィド結合；水素結合；静電結合；組換え融合；およびコンホメーション結合（例えば、抗体-抗原およびビオチン-アビジン結合）を含む共有結合による部分（代表的には抗体および毒素）の連結を包含する。

用語「測定可能なリボ核酸分解活性」または「顕著なリボ核酸分解活性」とは、タンパク質合成が、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンの酸沈殿可能なタンパク質への組込みによって測定される場合に阻害される、ウサギ網状赤血球溶解物アッセイに添加される場合40ng/mL以下の IC_{50} を有する分子をいう。 IC_{50} は、アッセイでタンパク質合成を50%阻害するために必要なタ

10

20

30

40

50

ンパク質の濃度である。溶解物アッセイは、Promega Corporation, Madison, WIから市販されるPromega溶解物アッセイキットで記載のように行われ得る。高分子量RNAおよびtRNAを使用するリボ核酸分解活性は、刊行されたプロトコルに従って過塩素酸可溶性ヌクレオチドの形成によって37 で決定される(Newton, D.L.ら, Biochemistry 35:545-553(1996))。ポリ(A,C)UpGおよびポリUでは、リボ核酸分解活性は、DepriscoらならびにLibonatiおよびFloridi(Deprisco, R.ら, Biochimica Biophysica Acta 788:356-363(1984); Libonati, M.ら, European j. Biochem. 8:81-87(1969))に従ってアッセイされる。活性は、260nmでの吸光度における経時的な増加を測定することによってアッセイされる。インキュベーション混合物(1mLの10mMイミダゾール、0.1M NaCl、pH 6.5またはpH 7)は、25 で基質および適切な量の酵素溶液を含む。インビトロ翻訳アッセイ(St. Clair, D.K.ら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 84:8330-8334(1987))および(3-[4,5-ジメチルチアゾール-2-イル]-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロミド; チアゾリルブルー; MTT)を使用する細胞生存性アッセイ(Mossman, T., J. Immunol. Methods 65:55-63(1983))は、既に記載されたように行われる(Pearson, J.W.ら, J. Nat'l. Cancer Inst. 83:1386-1391(1991))。

用語「をコードする核酸」または「をコードする核酸配列」とは、特定のタンパク質またはペプチドの発現を指示する核酸をいう。核酸配列は、RNAに転写されるDNA鎖配列およびタンパク質に翻訳されるRNA配列の両方を含む。核酸配列は、全長核酸配列ならびに全長配列に由来するより短い配列の両方を含む。特定の核酸配列が、特異的宿主細胞でコドン選択を提供するために導入され得る天然のままの配列の縮重コドンを含むことが理解される。核酸は、個々の一本鎖または二重鎖形態のいずれかとしてセンスおよびアンチセンス鎖の両方を含む。

用語「oncタンパク質」とは、初めはP-30タンパク質と命名されそして最初にDarzynkiewiczら, Cell Tissue Kinet. 21:169(1988)に記載された、配列番号1に記載される配列を有するタンパク質のような、Rana pipiensに由来するRNase Aをいう。このタンパク質の記載は、米国特許第5,559,212号に見いだされ得る。

用語「天然のoncタンパク質」とは、Rana pipiens卵母細胞から精製された、天然の形態のタンパク質をいう。用語「組換えoncタンパク質」とは、組換え手段によって産生されたタンパク質をいう。これらの組換えタンパク質およびその核酸配列の好ましい実施態様は、PCT出願第PCT/US97/02588号に記載される。oncタンパク質はまた、核酸およびアミノ酸配列の両方の改変を含むが、測定可能なりボ核酸分解活性を有することが理解される。

「onc由来の」アミノ酸配列には、oncアミノ酸配列のアミノ酸位置1 (GluにpyroGluを置換する)、2、3、4、5、6、7、8、11、12、13、14、15、16、18、19、20、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、41、42、43、44、45、46、47、50、52、54、56、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、76、80、81、82、84、85、86、87、91、92、93、95、または96の配列(配列番号1)で始まる配列の群から選択される6つのアミノ酸の連続する配列に同一の6つの連続するアミノ酸の少なくとも1つのストリングを含むものが含まれる。

用語「薬学的組成物」とは、種々の調製物の処方物をいう。非経口処方物が公知であり、そして本発明での使用に好ましい。免疫毒素の治療的有効量を含む処方物は、滅菌液体溶液、液体懸濁液、または凍結乾燥された型のいずれかであり、そして必要に応じて安定化剤または賦形剤を含む。凍結乾燥した組成物は、適切な希釈剤、例えば、注射用水、生理食塩水、0.3%グリシンなどで、約0.01mg/kg宿主体重から10mg/kg以上までのレベルで、再構成される。

代表的には、免疫毒素を含む薬学的組成物は、1日のみまたは毎日の静脈内注入によって数日間のいずれかで治療的有効量で投与される。

本発明の免疫毒素は、注射によって、最も好ましくは静脈内に、しかしまた、筋肉内に、皮下に、莖膜内に、腹腔内に、血管腔に、または関節に、例えば、関節内注射によって、全身投与され得る。用量は、用いられる免疫毒素の特性、例えば、医師の技術範囲内で公知である、その活性および生物学的半減期、処方物中の免疫毒素の濃度、投与部位および速度、関連する患者の臨床的耐容性、患者を苦しめるガンの程度などに依存する。

10

20

30

40

50

本発明の免疫毒素は、溶液中で投与され得る。溶液のpHは、pH 5~9.5、好ましくはpH 6.5~7.5の範囲であるべきである。免疫毒素またはその誘導体は、リン酸塩、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタン-HCl、またはクエン酸塩などのような適切な薬学的に受容可能な緩衝液を有する溶液中にあるべきである。緩衝液濃度は、1~100mMの範囲であるべきである。免疫グロブリンの溶液はまた、50~150mMの濃度で、塩化ナトリウムまたは塩化カリウムのような塩を含み得る。アルブミン、グロブリン、デタージェント、ゼラチン、プロタミン、またはプロタミンの塩のような安定化剤の有効量はまた、免疫毒素を含む溶液にまたは溶液が調製される組成物に含まれ得、そして添加され得る。免疫毒素の全身投与は、代表的には、抗体のヒト化形態が使用されるならば、2~3日後とまたは週に1回行われる。あるいは、毎日の投与が有用である。通常、投与は、筋肉内注射または血管内注入のいずれかによる。

10

投与はまた、鼻内または他の経口投与経路によるものであり得る。免疫毒素はまた、血液を含むある組織に配置された、マイクロスフェア、リポソーム、または他のマイクロパーティクル送達システムによって投与され得る。

免疫毒素はまた、肺への同在化送達を達成するためにエアロゾルによって投与され得る。これは、免疫毒素またはその誘導体を含む水性エアロゾル、リポソーム調製物、または固体粒子を調製することによって達成される。非水性(例えば、フルオロカーボン噴射剤)懸濁液が使用され得る。好ましくは、超音波噴霧器が、エアロゾルの調製に使用される。超音波噴霧器は、免疫毒素の分解を生じ得る切断に、抗体またはその誘導体を曝露することを最小にする。

20

通常、水性エアロゾルは、従来の薬学的に受容可能なキャリアおよび安定化剤とともに免疫毒素の水性溶液または懸濁液を処方することによって製造される。キャリアおよび安定化剤は、特定の免疫毒素についての必要条件に依存して変化するが、代表的には、非イオン性界面活性剤(TWEEN-20または-80_R、PLURONIC-F128または-67_R、あるいはポリエチレングリコール)、血清アルブミンのような無害のタンパク質、またはソルビタンエステル、オレイン酸、レシチン、グリシンのようなアミノ酸、緩衝剤、塩、糖、または糖アルコールが含まれる。処方物は滅菌される。エアロゾルは、一般的に、等張溶液から調製される。

用語「組換えDNA」、「組換え核酸」、または「組換え的に産生したDNA」とは、天然のまたは内因性供給源から単離され、そして天然に存在する隣接または内部ヌクレオチドを付加、欠失、または変化させることによって、化学的または酵素的のいずれかで改変されたDNAをいう。隣接するヌクレオチドは、ヌクレオチドの記載された配列またはサブ配列の上流または下流のいずれかにあるヌクレオチドであるが、内部ヌクレオチドは、記載された配列またはサブ配列内に存在するヌクレオチドである。

30

用語「組換え手段」とは、タンパク質が単離され、タンパク質をコードするcDNA配列が同定され、そして発現ベクター中に挿入される技術をいう。次いで、ベクターは、細胞に導入され、そして細胞はタンパク質を発現する。組換え手段はまた、融合タンパク質の発現、タンパク質の構成的発現、またはタンパク質の誘導性発現のための1つのベクターへの、種々の供給源からのコードまたはプロモーターDNAの連結を包含する。

用語「組換えタンパク質」、「組換え的に産生されたタンパク質」、または「組換え的に産生された免疫毒素」とは、タンパク質を発現し得るDNAの内因性コピーを有さない非天然細胞を使用して産生されるペプチドまたはタンパク質をいう。細胞は、適切な核酸配列の導入によって遺伝学的に変化されているので、タンパク質を産生する。組換えタンパク質は、タンパク質を産生する細胞と正常に結合するタンパク質および他の細胞下成分との結合で見いだされない。

40

用語「選択的細胞傷害性試薬」とは、例えば、生物内の、異なる細胞の集団に添加される場合、細胞のいくつかの物理学的特徴に基づいて、すなわち、細胞傷害性試薬が結合し、次いでインターナリゼーションされる表面リガンドまたはマーカーに基づいて、集団中の細胞の1つのタイプを殺傷する化合物をいう。

用語「単鎖抗体」とは、抗体の機能的フラグメントをコードする遺伝情報が、DNAの単一

50

の連続する長さに位置する抗体をいう。単鎖抗体の完全な説明については、Bireら, *Science* 242:423(1988)およびHustonら, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:5879(1988)を参照のこと。

用語「表面マーカー」とは、細胞の表面に存在するタンパク質、炭水化物、または糖タンパク質をいう。細胞の異なるタイプは、異なる細胞表面マーカーを発現し、したがって細胞は、細胞表面マーカーの存在によって同定され得る。例えば、悪性B細胞は、CD22を過剰発現する。したがって、CD22を認識する抗体の結合は、その細胞をB細胞として同定する。以下に記載のCD74は、B細胞上で見られる細胞表面マーカーおよび他の悪性細胞の選択群の例である。

本発明の免疫毒素の種々の使用には、タンパク質の毒性作用によって排除され得る特異的ヒト細胞によって引き起こされる種々の疾患症状が含まれる。本発明の免疫結合体についての1つの好ましい適用は、CD22を発現する悪性B細胞の処置である。B細胞の代表的悪性疾患には、急性リンパ性白血球(ALL)、慢性Bリンパ性白血病(B-CLL)、慢性骨髄性白血病、パーキットリンパ腫、AIDS-関連リンパ腫、および濾胞性リンパ腫、ならびに毛状細胞白血病が挙げられる。CD74に対する本明細書に記載の免疫毒素は、黒色腫、神経芽細胞腫、および骨髄腫細胞の阻害および処置に有用である。

本発明の好ましい細胞傷害性試薬は、ヒト非毒性RNaseのEDNに連結した同じ抗体から構成される比較試薬よりも、B細胞マーカーを有する標的細胞に対して少なくとも100倍、好ましくは少なくとも500倍、および最も好ましくは少なくとも1000倍を上まわる細胞傷害性である。

A. 細胞表面マーカーに対する抗体

抗体とは、アナライト(抗原)を特異的に結合しそして認識する、免疫グロブリン遺伝子またはそのフラグメントによって実質的にコードされるポリペプチドをいう。認識された免疫グロブリン遺伝子には、カッパー、ラムダ、アルファ、ガンマ、デルタ、イプシロン、およびミュー定常領域遺伝子、ならびに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。軽鎖は、カッパーまたはラムダのいずれかとして分類される。重鎖は、ガンマ、ミュー、アルファ、デルタ、またはイプシロンとして分類され、これらは順に、それぞれ、免疫グロブリンクラスIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEを定義する。

例示的な免疫グロブリン(抗体)構造ユニットは、テトラマーを含む。各テトラマーは、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成され、各対は、1つの「軽」鎖(約25kD)および1つの「重」鎖(約50~70kD)を有する。各鎖のN-末端は、主として抗原認識を担う約100~110以上のアミノ酸の可変領域を定義する。用語可変軽鎖(V_L)および可変重鎖(V_H)とは、それぞれこれらの軽鎖および重鎖をいう。

モノクローナル抗体を産生するための種々の方法は、当該技術分野で公知である。例えば、Goding, *MONOCLONAL ANTIBODIES; PRINCIPLES AND PRACTICE*, Academic Press, 第2版(1986); ならびにHarlowおよびLaneを参照のこと。ヒトB細胞に対するまたはこれと反応性であるモノクローナル抗体は、マウスを免疫するための免疫原の組み合わせを使用しそして所望の抗原を発現する細胞に対するハイブリドーマ上清をスクリーニングすることによって、あるいは目的の抗原に対するモノクローナル抗体に特異的であるように設計されたスクリーニングアッセイによって、得られる。本発明の抗体についてスクリーニングするために有用な細胞株は、容易に入手可能または得られる。このような細胞には、パーキットリンパ腫細胞株Daudi、CA-46、およびRajiが挙げられる。

CD22は、Igスーパーファミリーに属する系統制限されたB細胞抗原であり、これは、急性リンパ性白血病(B-ALL)、慢性Bリンパ性細胞(B-CLL)、パーキットリンパ腫のようなBリンパ腫細胞、AIDS-関連リンパ腫、および濾胞性リンパ腫、ならびに毛様細胞白血病を含むがこれらに限定されない多くのタイプの悪性B細胞の表面上で、ならびに正常成熟Bリンパ球上で発現される。CD22は、B細胞発生の初期段階で発現されず、幹細胞または末期段階の血漿細胞の表面上でも見いだされない。Vaickusら, *Crit. Rev. Oncol/Hematol.* 11:267-297(1991)。さらに、脱落した抗原は、正常ヒト血清またはCLLの患者からの血清で検出されない。Liら, *Cell. Immunol.* 118:85-99(1989)。

10

20

30

40

50

CD74は、MHCクラスII関連不変鎖(Ii)としても公知であり、これは、B細胞、マクロファージ、単球、および他のMHCクラスII陽性細胞で見いだされる。上記に列挙した悪性B細胞の他に、CD74はまた、神経芽細胞腫、黒色腫、および骨髄腫細胞で見いだされる。

例えば、B細胞に対するモノクローナル抗体の産生は、以下によって達成される：1)ヒトB細胞での免疫処置、次いでNishimuraら, *Eur. J. Immunol.* 18:747(1988) (参考として本明細書に援用される)に記載されるのと同様の方法で構築されるヒトB細胞抗原でトランスフェクトされた非ヒト細胞株に対する反応性についての、得られるハイブリドーマのスクリーニング；2)ヒトB細胞抗原でトランスフェクトした(好ましくは免疫処置されるべき動物に自己由来の)非ヒト細胞株での免疫処置、次いでヒトB細胞株に対する反応性についての、得られるハイブリドーマのスクリーニング；3)ヒトB細胞抗原を発現するヒトまたは非ヒト細胞株での免疫処置、次いでヒトB細胞株との現存する抗B細胞モノクローナル抗体の反応性をブロックする能力についての、得られるハイブリドーマのスクリーニング；4)ヒトB細胞抗原を発現するヒトまたは非ヒト細胞株での免疫処置、次いで精製された天然のまたは組換えB細胞抗原との反応性についての、得られるハイブリドーマのスクリーニング；および5)ヒトB細胞抗原の組換え誘導体での免疫処置、次いでヒトB細胞株に対する反応性についての、得られるハイブリドーマのスクリーニング。この開示の総説について、当業者は、本発明で使用され得る抗体を惹起する他の方法を理解する。

組換えDNA方法論は、本発明の好ましい抗体を合成するために使用される。例えば、ヒトにおける使用についての免疫毒素の好ましい抗体部分は、ヒト可変領域フレームワークおよびヒト定常領域と組み合わされたマウス相補性決定領域(CDR)のみを含むB細胞抗原に対する「ヒト化」抗体である。

ヒト化技術は、当該技術分野で周知である。例えば、PCT出願公開番号WO 87/02671；米国特許第4,816,567号；EP特許出願0173494；Jonesら, *Nature* 321:522(1986)；およびVerhoeyenら, *Science* 239:1534(1988)を参照のこと。CDRの操作は、ヒト化抗体を達成する方法である。例えば、Jonesら, *Nature* 321:522(1988)およびRiechmannら, *Nature* 332:323(1988)を参照のこと。ヒト化抗体に関する総説文献については、WinterおよびMilstein, *Nature* 349:293(1991)を参照のこと。

ヒト化の他に、本発明の抗体部分は、単鎖抗体である。本発明の1つの局面では、単鎖抗体は、親ハイブリドーマ細胞株からクローニングされる。

モノクローナル抗体のFv領域は、同じ一般的ストラテジーを使用してクローニングされる。代表的には、例えば、ハイブリドーマ細胞から抽出されるポリ(A)⁺RNAは、プライマーとしてランダムヘキサマーを使用して逆転写される。V_HおよびV_Lドメインは、2つのポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別々に増幅される。重鎖配列は、重鎖のアミノ末端タンパク質配列に従って設計される5'末端プライマー、およびコンセンサス免疫グロブリン定常領域配列に従った3'末端プライマーを使用して増幅される(Kabatら, *SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST*, 第5版, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD(1991))。軽鎖Fv領域は、軽鎖のアミノ末端タンパク質配列に従って設計された5'末端プライマーおよびプライマー-c-カップとの組み合わせで使用して増幅される。当業者は、使用され得る他の適切なプライマーを認識する。

粗PCR産物は、当業者に周知であり市販の適切なクローニングベクターにサブクローニングされる。正確なサイズのDNAインサートを含むクローンは、例えば、アガロースゲル電気泳動で同定される。次いで、重鎖または軽鎖コード領域のヌクレオチド配列は、クローニング部位に隣接した配列決定プライマーを使用して二本鎖プラスミドDNAから決定される。市販のキット(例えば、Sequenase_R キット, United States Biochemical Corp., Cleveland, OH)を使用して、DNAを配列決定することを容易にする。

当業者は、Fv領域について提供される配列情報を利用して、これらの配列をコードする核酸が、当業者に周知の多くの方法を使用して得られることを理解する。したがって、Fv領域をコードするDNAは、任意の適切な方法によって調製され、この方法には、例えば、リガーゼ連鎖反応(LCR)(WuおよびWallace, *Genomics* 4:560(1989)、Landegrenら, *Science* 24

10

20

30

40

50

1:1077(1988)、およびBarringerら, Gene 89:117(1990)を参照のこと)、転写増幅(Kwohら, Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 86:1173(1989)を参照のこと)、自己持続配列複製(Guatelliら, Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 87:1874(1990)を参照のこと)のような増幅技術、適切な配列のクローニングおよび制限、またはNarangら, Meth.Enzymol.68:90(1979)のホスホトリエステル方法; Brownら, Meth.Enzymol.68:109(1979)のホスホジエステル方法; Beaucageら, Tetra.Lett.22:1859(1981)のジエチルホスホロアミダイト方法; および米国特許第4,458,066号の固体支持体方法のような方法による直接的化学合成が挙げられる。

単鎖抗体をコードする核酸配列は、当該技術分野で周知の技術によって同定される(Sambrookらを参照のこと)。簡単にいえば、上記のDNA産物は、電気泳動ゲル上で分離される。

ゲルの内容物は、適切なメンブラン(例えば、Hybond-N_R, Amersham)にトランスファーされ、そしてストリンジェント条件下で適切なプローブとハイブリダイズされる。プローブは、所望の配列内に埋め込まれるフラグメントの核酸配列を含むべきである。

DNA配列が化学的に合成される場合、単鎖オリゴヌクレオチドが生じる。これは、相補的配列とのハイブリダイゼーションによって、またはテンプレートとして単鎖を使用するDNAポリメラーゼを用いる重合化によって、二本鎖DNAに変換され得る。単鎖Fv領域の全体を化学的に合成することは可能であるが、後で一緒にライゲートされる多くのより短い配列(約100~150塩基)を合成することが好ましい。

あるいは、サブ配列はクローニングされ得、そして適切なサブ配列は、適切な制限酵素を使用して切断される。次いで、フラグメントは、所望のDNA配列を産生するためにライゲートされ得る。

一旦、Fv可変軽鎖および重鎖DNAが得られると、配列は、当業者に周知の技術を使用して、直接的にまたはペプチドリンカーをコードするDNA配列を介してのいずれかで、一緒にライゲートされ得る。したがって、完全な配列は、単鎖抗体の形態でFvドメインをコードする。

あるいは、B細胞に対する抗体は、例えば、免疫学的試薬の供給業者から市販される(例えば、Ancell Corp., Bayport, MN(RFB4); Becton Dickinson, San Jose, CA; The Binding Site, Inc., San Diego, CA; CalTag Laboratories, South San Francisco, CA; Boehringer Mannheim Biochemicals, Indianapolis, IN; Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ; および Zymed, Foster City, CA)。RFB4は、他の抗体と比較した場合、驚くべき効率を有する本発明の好ましい抗体である。これは特徴づけられており、そしてFitzGeraldらが「Recombinant RFB4 Immunotoxins Exhibit Potent Cytotoxic Activity for CD-22 Bearing Cells And Tumors」と題する1998年3月19日に出願されたPCT特許出願、ならびにMansfieldら, Bioconj.Chem.7:557(1996); Mansfieldら, Biochem.Soc.Trans.25:709(1997); およびMansfieldら, Blood 90:2020(1997)(これらのすべてはその全体が本明細書に援用される)に記載される。

B. 細胞傷害性oncタンパク質

本願は、Rana pipiensからのoncタンパク質についての新しい使用を開示する。Rana pipiens oncタンパク質は、質量分析法で約12,000ダルトンの分子量、および9.5と10.5との間の等電点を有するRana pipiensの卵および/または胚に由来する実質的に純粋なタンパク質である。Alfacell Corporation, Bloomfield, NJから入手可能な、商品名ONCONASE_Rとして本明細書にときどき言及される産物によっても例示される。

本発明については好ましくは、oncタンパク質は、配列番号1に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質である。

本発明で使用されるoncタンパク質は、膵臓RNaseファミリーのモノマーメンバーでありそしてインターナリゼーションするリガンドなして特定のガン細胞に毒性であるので、免疫毒素構築物に使用される他のRNaseと独特に比較される(米国特許第5,559,212号を参照のこと)。しかし、B細胞に対する抗体に結合した場合、oncタンパク質の細胞傷害性が、2,000倍にまで劇的に増加することは、本発明の発見である。ガン細胞に対する細胞傷害性にもかかわらず、患者の毒性および免疫原性は、この特定の免疫毒素の効率および毒素の小さいサイズのため、低いと予測される。

配列番号1が、本明細書で提供される配列の機能的有利点に実質的に影響を及ぼさないよ

10

20

30

40

50

うに変更され得ることは、当業者に理解される。例えば、グリシンおよびアラニンは、代表的には、アスパラギン酸およびグルタミン酸ならびにアスパラギンおよびグルタミンのように変換可能であると考えられる。配列の機能的有利点が維持される任意のこのような改変は、配列番号1に記載の配列によって包含されることが意図される。

本明細書に記載されそして請求される代表的な組換えoncタンパク質は、配列番号2を含むように定義される。本発明の組換えoncタンパク質は、天然のoncタンパク質と比較して類似の測定可能なりボ核酸分解活性を有する。しかし、当業者は、onc配列の多くの異なる変更が、天然のoncタンパク質とほぼ同じ測定可能なりボ核酸分解活性を有するoncタンパク質をコードすることを認識する。

好ましい組換えoncタンパク質、組換えoncタンパク質の改変体、および組換えoncタンパク質を合成するための技術の説明については、PCT出願第PCT/US97/02588号を参照のこと、これは参考として本明細書に援用される。

C. 免疫毒素

毒性部分および抗体は、化学作用によってまたは組換え手段によって結合され得る(Rybakら, *Tumor Targeting* 1:141(1995)を参照のこと)。化学的改変には、例えば、タンパク質化学の分野で周知である方法によって、直接的または連結化合物を介してのいずれかで、互いに部分を連結する目的のための誘導体化が含まれる。現在好ましい化学的結合の実態様では、毒性部分および認識部分を連結する手段は、2つの部分間の分子間ジスルフィド結合の形成に最終的に寄与するヘテロ二官能性カップリング試薬を含む。本発明についてこの能力に有用である他のタイプのカップリング試薬は、例えば、米国特許4,545,985に記載される。あるいは、分子間ジスルフィドは、天然に存在するまたは遺伝子操作によって挿入される各部分でシステイン間で便利に形成され得る。部分を連結する手段はまた、ヘテロ二官能性架橋試薬または特異的低pH切断可能架橋剤または特異的プロテアーゼ切断可能リンカー間のチオエーテル結合、あるいは他の切断可能または切断可能でない化学結合を使用し得る。免疫毒素の部分を連結する手段はまた、標準的ペプチド合成化学または組換え手段によって別々に合成される部分間に形成されるペプチジル結合を含み得る。本発明のタンパク質部分の可能な化学的改変はまた、周知の方法に従って、循環系における滞留時間を延長しそして免疫原性を減少させるためのポリエチレングリコール(PEG)での誘導体化が含まれる(例えば、Lisiら, *Applied Biochem.* 4:19(1982); Beauchampら, *Anal. Biochem.* 131:25(1982); および Goodsonら, *Bio/Technology* 8:343(1990)を参照のこと)。

免疫毒素のタンパク質の可能な遺伝子操作改変は、組換えDNA技術によって誘導される単一遺伝子から発現される単鎖多機能性生合成タンパク質へのそれぞれの関連の機能的ドメインの組み合わせを含む。(例えば、PCT公表出願WO/88/09344を参照のこと)。さらに、組換えDNA技術は、組換えoncタンパク質および抗体を連結するために使用され得る。したがって、免疫毒素は、oncタンパク質の一方の末端で始まりそして抗体で終わる融合されたタンパク質を含み得る。

組換え融合タンパク質を産生する方法は、当業者に周知である。したがって、例えば、Chaudharyら, *Nature* 339:394(1989); Batraら, *J. Biol. Chem.* 265:15198(1990); Batraら, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 86:8545(1989); Chaudharyら, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 87:1066(1990) (すべては参考として援用される)は、種々の単鎖抗体-毒素融合タンパク質の調製を記載する。

一般的に、免疫毒素融合タンパク質を産生する工程は、Fv軽鎖および重鎖ならびに使用されるoncタンパク質をコードするDNAを別々に調製する工程を包含する。2つの配列は、特定の所望の融合タンパク質をコードする構築物を形成するためにプラスミドまたは他のベクター中で組み合わせられる。より単純なアプローチは、所望のoncタンパク質を既にコードする構築物中に、特定のFv領域をコードするDNAを挿入する工程を包含する。したがって、例えば、抗B細胞単鎖抗体 / oncタンパク質免疫毒素をコードするDNAは、所望のoncタンパク質またはその逆をコードするDNAを既に含む構築物中に、抗体V_HおよびV_L鎖(Fv領域)をコードするDNAに挿入する工程によって、最も容易に調製される。Fv領域をコードするDNA配列は、当業者に周知の技術を使用して構築物に挿入される。

10

20

30

40

50

哺乳動物細胞は、抗体 - サイトカイン (Hoogenboomら, Biochem. Biophys. Acta 1096:345(1991); Hoogenboomら, Mol. Immunol. 28:1027(1991)) および抗体 - 酵素 (Casadeiら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 87:2047(1990); Williamsら, Gene 43:319(1986)) のようなハイブリッド分子を発現しそして分泌するために使用されている。一部は、外来タンパク質の免疫原性は、組換えタンパク質に存在する間違っただグリコシル化パターンによる。したがって、真核生物細胞株は、発現されたタンパク質がグリコシル化されるので、原核生物細胞よりも好ましい。ヒト由来細胞株は、これらの細胞が末端グリコシドとしてシアル酸を組み込む点で特に好ましい。ハムスターCHOおよびBHK、ならびにHEK-293ヒト線維芽細胞株のような細胞株は、組換えヒトタンパク質を発現させるために使用されている。

本発明の免疫毒素のタンパク質部分の他の遺伝子操作改変は、タンパク質のサイズを減少させるため、または溶解性に影響を及ぼす配列変化 (例えば、システインからセリン) もしくはグリコシル化部位のような、産生もしくは利用性を容易にする他のパラメータを改変させるための、機能的に不必要なドメインの欠失を含む。当業者は、タンパク質の多くの追加の周知の化学的および遺伝子改変が、本発明の細胞傷害性試薬のように、非経口投与が意図される任意のタンパク質に有利に適用され得ることを理解する。

本発明の好ましい免疫毒素は、毒性部分として配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質、および目的の細胞上の特異的細胞表面マーカーを結合するヒト化抗体 (より好ましくはB細胞に対する) を含む融合タンパク質である。oncタンパク質と抗体との間の融合タンパク質のこの独特の遺伝子結合の構築は、化学的に結合した抗体 / oncタンパク質結合体の異種性を排除する。これは、免疫毒素の増加した効力および減少した免疫原性に寄与し得ると考えられる。

本発明は、本明細書に記載の新規タンパク質をコードする核酸構築物を含む。核酸構築物は、適切なベクターに組み込まれる場合、宿主中で複製し得るものである。構築物は、プロモーターおよびエンハンサーのような構築物の発現に影響を及ぼし得る他の配列に連結され得る。

本発明の免疫毒素は、腫瘍細胞の選択的殺傷に利用され得る。この方法は、選択的に殺傷されるべき細胞のタイプで特異的または優先的に見られる細胞表面マーカーに結合する抗体の適切な選択に基づく。例えば、本発明の免疫毒素は、多くが当該技術分野で公知である腫瘍細胞特異的表面マーカーに結合する抗体を含むものを包含する。ヒト適用について好ましい実施態様では、抗体は、悪性を示すB細胞を優先的に結合するヒト化単鎖タンパク質またはその改変形態である。

D. 薬学的組成物

本発明はまた、薬学的に受容可能なキャリア中に本発明の免疫毒素を含む薬学的組成物に関する。治療的適用では、組成物は、疾患およびその合併症を治癒または少なくとも部分的に阻止するために十分な量で、疾患に苦しむ患者に投与される。これを達成するために適切な量は、治療的有効量として定義される。この使用に有効な量は、疾患の重篤度および患者の健康の一般状態に依存する。

好都合には、薬学的組成物は、非経口投与に適切である。本発明の免疫毒素は、他の免疫毒素について当該技術分野で公知の方法に従って、例えば、体の種々の部分で腫瘍を処置するための、異なる目的に適切な種々の手段によって投与され得る。(例えば、Rybakら, Human Cancer Immunology, IMMUNOLOGY AND ALLERGY CLINICS OF AMERICA, W.B. Saunders, 1990、およびそれに引用される参考文献を参照のこと)。したがって、本発明はまた、本発明の免疫毒素および薬学的に受容可能なキャリアを含む薬学的組成物、特に、投与の上記の手段に適切であるこのような組成物に関する。

組成物の単回または複数回投与は、患者によって必要とされおよび耐容されるような投与量および頻度に依存して投与され得る。いずれにしても、組成物は、患者を効果的に処置するために本発明のタンパク質の十分量を提供すべきである。

好ましくは、投与のための組成物は、普通、薬学的に受容可能なキャリア、好ましくは水性キャリアに溶解された単鎖抗体およびoncタンパク質を含む融合タンパク質の溶液を含む。種々の水性キャリア、例えば、緩衝化生理食塩水などが使用され得る。これらの溶液

10

20

30

40

50

は、滅菌されており、そして一般的に望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技術によって滅菌され得る。組成物は、pH調節および緩衝化剤、毒性調節剤などのようなほぼ生理学的条件に必要とされるような薬学的に受容可能な補助物質、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含み得る。これらの処方物中の融合タンパク質の濃度は、広く変化し得、そして選択された投与の特定の態様および患者の必要性に従って、主として液体容量、粘度、体重などに基づいて選択される。

したがって、静脈内投与について代表的な薬学的組成物は、約0.01~100mg/患者/日である。0.1~約1000mg/患者/日までの投与量は、特に、薬物が、腫瘍または腫瘍がある器官へのような、遮断された部位におよび血流中以外に投与される場合、使用され得る。非経口投与可能な組成物を調製する実際の方法は、当業者に公知であるかまたは明らかであり、そしてREMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCE,第15版,Mack Publishing Co.,Easton,PA,(1980)のような刊行物により詳細に記載される。

さらに、本発明は、抗体の結合を可能にする条件下で殺傷されるべき細胞の表面上の標的に特異的な抗体を有する本発明の選択的免疫毒素を使用する、細胞を選択的に殺傷する方法に関する。細胞上の表面マーカーへの抗体の結合は、試薬のoncタンパク質に細胞を選択的に殺傷させる。本発明のこの方法は、例えば、照射によって骨髄除去を受けている患者への移植前の骨髄において、望ましくないタイプの細胞を選択的に殺傷することによる、インビトロでの細胞分離に使用され得る。

実施例

以下の限定されない実施例では、本発明は、毒性部分がONCONASE_Rであり、そして抗体が腫瘍細胞、特にB細胞を認識する免疫毒素によって例示される。

実施例1：Rana pipiensからの天然のoncタンパク質および組換えoncタンパク質の産生

A．天然のoncタンパク質の単離および精製

Rana pipiensからの卵母細胞の単離、卵のインビトロ受精、ならびにカエル胚からの天然のoncタンパク質の単離および精製を記載する技術は、米国特許第5,559,212号および第5,728,805号に非常に詳述され、これらは両方とも参考として本明細書に援用される。

B．組換えoncタンパク質の産生およびアッセイ

組換えoncタンパク質の産生を、PCT出願PCT/US97/02588に記載のように行った。高分子量RNAおよびtRNAを使用するリボ核酸分解活性を、刊行されたプロトコル、Newtonら,J.Neurosci.14:538(1994)に従って、過塩素酸可溶性ヌクレオチドの形成によって37にて決定した(Newtonら,Biochem.35:545(1996)を参照のこと)。ポリ(A,C)、UpG、およびポリUで、リボヌクレアーゼ活性を、Libonatiら,Biochim.et Biophys.Acta 788:356(1984)、ならびにLibonatiおよびFloridi,Eur.J.Biochem.8:81(1969)に従って分光光度法でアッセイした。簡単にいえば、活性を、260nmでの吸光度の増加を測定することによってアッセイした。インキュベーション混合物(1mLの10mMイミダゾール、0.1M NaCl、pH 6.5またはpH 7)は、25にて基質および適切な量の酵素を含んでいた。MossmanのMTT方法を使用して、インビトロ翻訳アッセイ(St.Clairら,Proc.Nat'l.Acad.Sci.USA 84:8330(1987))、および細胞生存率アッセイ(Pearsonら,J.Nat'l Cancer Inst.83:1386(1991))を、既述のように行った。

実施例2：oncタンパク質の化学分析および組成

上記の天然のoncタンパク質は、化学的に十分特徴づけられている。天然のoncタンパク質と同じくらい十分に機能的であるために、組換えoncタンパク質が、以下に記載のような化学的性質および構造を有するべきであると考えられる。

天然のoncタンパク質を、(タンパク質の均質性をアッセイするために使用される標準試験によって確立されるように)均質まで精製した。電気泳動によって、天然のoncタンパク質の分子量を、約14,500ダルトンであると決定した。天然のoncタンパク質の分子量を示す、列挙されたアミノ酸配列(以下を参照のこと)に基づく分子量の算出は、11,860ダルトンであるべきである。しかし、金属イオンが、それらを除去するためのすべての努力にもかかわらずタンパク質に結合され得、そして異なる同位体が含まれ得るので、質量分

10

20

30

40

50

析法によって決定される天然のoncタンパク質の分子量は12,430ダルトンであった。この矛盾を考慮して、質量分析法によって決定される場合の製薬の分子量は、約12,000ダルトンであると考えた。天然のoncタンパク質の等電点(pI)を、等電点電気泳動によって決定した場合、約9.5と10.5との間であることを見いだした。天然のoncタンパク質のアミノ末端基をブロックし、そして本質的に炭水化物を含まないことを見いだした(アントロンおよびオルシノール方法によって決定した場合)。

表1は、天然のoncタンパク質のアミノ酸組成を示す。

表1：天然のoncタンパク質のアミノ酸分析

アミノ酸残基	%モル (24時間酸加水分解)
アスパラギン酸/アスパラギン	13.99
トレオニン	9.30 (注1)
セリン	7.78
グルタミン酸/グルタミン	6.10
プロリン	4.36
グリシン	3.09
アラニン	3.09
システイン/2	6.92 (注1)
バリン	8.20
メチオニン	0.85 (注1)
イソロイシン	4.86 (注2)
ロイシン	5.22
チロシン	2.96
フェニルアラニン	6.05
ヒスチジン	2.88
リジン	11.62
アルギニン	2.70
トリプトファン	決定されず (注3)
概算合計	99.97%

注1：トレオニン、システイン/2、およびメチオニンは、加水分解中に部分的に破壊され、そしてこの値はこのような部分破壊のため正確ではない。

注2：この値は、不完全な加水分解のため正確ではない。

注3：トリプトファンは、破壊されるので、タンパク質の酸加水分解で検出され得ず、そして結果として決定されずと示される。しかし、紫外スペクトルの分析は、1分子当たり1つのトリプトファン残基の存在を示した。

表2：アミノ酸組成（アミノ酸配列から算出した場合）

アミノ酸	残基の概数（天然のoncタンパク質の1分子当たり）
アスパラギン酸	6
アスパラギン	8
トレオニン	10
セリン	8
グルタミン酸	3
ピログルタミン酸	1
グルタミン	2
プロリン	4
グリシン	3
アラニン	3
システイン/2	8
バリン	8
メチオニン	1
イソロイシン	6
ロイシン	5
チロシン	3
フェニルアラニン	6
ヒスチジン	3
リジン	12
アルギニン	3
トリプトファン	1
概算合計	104

天然のoncタンパク質を配列決定した。天然のタンパク質のN-末端はピログルタミン酸（ γ -Glu）である。これは、直接配列決定に必要な遊離アミノ基を欠き、したがってタンパク質のN-末端を「ブロックする」グルタミン酸の環化誘導体である。分子のアミノ末端を、既に引用されたPCT/US97/02588に記載のように分子の組換え産生を容易にするように変更した。細胞障害性RNaseの好ましいアミノ酸配列を、配列番号1に示す。

実施例3：抗CD22-ONCONASE_R 免疫毒素

A．材料および方法

ONCONASE_R（以前はP-30と命名された）を、凍結乾燥したタンパク質としてAlfacel I Corp.から得て、そしてリン酸緩衝化生理食塩水(PBS)に溶解した。少なくとも1 mg/mLのストック溶液を、アッセイについて希釈物を調製するまで、-20℃で凍結させたままにした。すべての他の試薬を、既述の供給源から購入した(Rybakら, J.Biol.Chem.266:21202 (1991); Newtonら, J.Biol.Chem.267:19572(1992); Mikulskiら, Cell Tissue Kinet.23:237(

10

20

30

40

50

1990)、これは参考として本明細書に援用される)。

LL2は、ヒトB細胞上のCD22を認識しこれに特異的に結合するマウスモノクローナル抗体である。LL2抗体を、Immunomedics, Inc. (Morris Plains, NJ)から得た。RFB4もまた、CD22に結合するマウスモノクローナル抗体である。この抗体は、AnceII Corp.を含む多くのソースから入手可能である。

3つのパーキットリンパ腫細胞株(Daudi (ATCC CCL 213)、CA 46(ATCC CRL 1648)、およびRaji(ATCC CCL86))を、10%ウシ胎仔血清(FCS)、2 mMグルタミン、1 mMビルビン酸ナトリウム、および10 μg/mLゲンタマイシンを含むRPMI 1640培地中で増殖した。ヒト皮膚T細胞リンパ腫細胞株であるHUT 102(ATCC TIB 162)も、補充したRPMI培地中で増殖した。すべての細胞を、5% CO₂ 湿潤雰囲気中で37 °Cにてインキュベートした。

10

B. LL2-ONCONASE_R 免疫毒素の調製

ジスルフィド連結した結合体を、以下の改変とともに、Newtonら, J. Biol. Chem. 267:19572 (1992)に記載のように調製した。抗体(12.5nmol)を、100mMホウ酸ナトリウム、pH 8.5中の250nmol 2-イミノチオランおよび2.5mM 5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)とともに、最終容量

≤ 0.5mL

で室温にて1時間インキュベートした。反応混合物を、緩衝液A (0.1M NaClを含む0.1M NaPO₄, pH 7.5)で平衡化したPD-10_R カラム(Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)にアプライした。

SPDP-改変したONCONASE_R (0.9~1.2mol N-スクシンイミジル3(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)/mol ONCONASE_R)を、記載のように調製した(Newtonら, (1992)前出)。SPDP-改変したONCONASE_R (340nm)を、ジチオトレイトール(DTT)とともに2 mMの最終DTT濃度で室温にて1時間還元し、そして緩衝液Aで平衡化したPD-10_R カラムでゲル濾過して、過剰のDTTを除去した。改変したONCONASE_R を、改変した抗体に添加し、そして反応物を室温にて一晩インキュベートした。ONCONASE_R は、抗体よりも少なくとも10倍モル過剰であった。

20

チオエーテル連結した結合体を、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(MBS)を使用して、Rybakら, Drug Delivery 1:3(1993)およびNewtonら, Int'l J. Oncology 8:1095(1996)に従って調製した。簡単にいえば、LL2抗体(2 mg)を、5倍モル過剰のMBS(ストック溶液、DMF中30mM)とともに室温にて10分間インキュベートした。反応内容物を、緩衝液Aで平衡化したPD-10_R カラムにアプライした。ピーク画分(1.5mL)をプールした。SPDP-改変したONCONASE_R を0.1M NaClを含む0.1M酢酸ナトリウム、pH 4.5に対して透析し、次いで25mM DTT(最終濃度)とともに室温にて30分間インキュベーションを行った。反応内容物を、緩衝液Aで平衡化したPD-10_R カラムにアプライし、そしてピーク画分をプールし、そしてMBS抗体に添加した。反応物を、室温にて一晩インキュベートした。ONCONASE_R は、抗体よりも10倍モル以上過剰で存在した。結合体を、TSK-3000_R HPLCカラム(Toso-Haas)でのゲル濾過によって未反応のONCONASE_R と分離した。

30

調製物中に存在するタンパク質の量を、UV分光法によって、次いで277nmで以下の吸光係数とBeerの法則： $[A = (\text{濃度})]$ によって決定した：ONCONASE_R、(1%) = 7.3；および免疫毒素、(1%) = 10。

40

抗体に結合したONCONASE_R のモルを、ONCONASE_R および抗体の標準とともに還元した免疫毒素のゲル電気泳動によって決定した。ゲルを、Image(NIH公共のドメインソフトウェア)を使用して分析した。

成分タンパク質を証明する還元条件下でSDSポリアクリルアミドゲル電気泳動によってONCONASE_R 免疫毒素の分析を、還元後に再生した。非還元条件下で、抗体結合体は、複数の高分子量形態からなった。チオール-ジスルフィド交換反応における架橋基の反応性は、結合体の異種性を説明し得る。免疫毒素は、1~2モルのONCONASE_R /molの抗体を含んだ。精製した免疫毒素は、ゲル電気泳動によって、おそらく10倍以上のモル過剰のONCONASE_R が本質的にすべての免疫毒素を得、そして遊離抗体を含まないので、顕著

50

な量の遊離抗体を含まないようであった。

C. RFB4-ONCONASE_R 免疫毒素の調製

RFB4-ONCONASE_R 免疫毒素を、上記のように調製する。RFB4はCD22を認識するので、RFB4を含む免疫毒素はまた、悪性B細胞に対して細胞傷害性である。したがって、以下に記載の実験は、さらにRFB4-ONCONASE_R でも同様に行われ得る。

実施例4：インビトロ細胞生存率研究

タンパク質合成を、Rybakら, J. Biol. Chem. 266:21202(1991)に記載のように測定した。細胞を3 μ Ciの³H]ウリジンでパルスした以外は、同じプロトコルを使用して、RNA合成を測定した。細胞数を、血球計数盤での直接計数によって決定した。細胞のアリコートをし、等容量の0.5%トリパンブルー排除染料とともに5分間インキュベートし、そして生存細胞をスコアした。MTT比色アッセイ(Mossman, T., J. Immunol. Methods 65:55(1983))を、記載のように行った(Mikulskiら, Cell Tissue Kinet. 23:237(1990))。

ONCONASE_R -免疫毒素によるパーキットリンパ腫細胞におけるタンパク質合成阻害についてのIC₅₀を、表4に示す。

表4：ONCONASE®-免疫毒素によるタンパク質合成阻害

細胞株	IC ₅₀	
	ONCONASE®	LL2-ONCONASE®
Dauji	>200nM	100pM
CA 46	>200nM	800pM
Raji	>200nM	800pM
HUT 102	30nM	>100nM

24時間後にB細胞においてタンパク質合成を50%阻害するために必要とされる免疫毒素の濃度は、結合していないONCONASE_R についてナノモル範囲と比較してピコモル範囲である。CD22を発現しないHUT 102細胞は、LL2-ONCONASE_R 免疫毒素に感受性ではなかったが、B細胞株よりも結合していないONCONASE_R に対してより感受性であった。図1を参照のこと。

図2に示され得るように、ONCONASE_R 単独では、LL2抗体に結合したONCONASE_R と比較して、24時間後にB細胞リンパ腫細胞に対して細胞傷害性ではなかった。したがって、インターナライゼーションし得る抗体に結合したONCONASE_R は、結合していないONCONASE_R よりも効力があった。

ONCONASE_R 単独よりも有効であることに加えて、図3および4は、ONCONASE_R 免疫毒素が、毒性部分が、ヒト非毒性RNase、好酸球由来神経毒(EDN)(図5)、またはヒト膵臓RNase(図6)のいずれかである免疫毒素よりも、非常に効果的であったことを証明する。

図5では、LL2またはLL1抗体を、上記のようにEDNに結合し、そしてDaujiまたはCA 46パーキットリンパ腫細胞でアッセイした。[]LL1およびLL2免疫毒素は、免疫毒素が抗体およびRNase部分に分解されるリソソームに送達されると考えられる。RNaseは、リソソームを離れて、そしてリボソーム活性を妨害するサイトゾルに入る。図5に示すデータから、ONCONASE_R が、リソソームによる分解によって不活性化されないの、ONCONASE_R が、EDNよりも約2,000倍活性であると仮定される。したがって、サイトゾルにはいるタンパク質は、インタクトのままの細胞毒素である。

図6では、LL2-ONCONASE_R を、LL2-膵臓RNaseと比較した。また、約1 nMの濃度で、LL2-ONCONASE_R は、タンパク質合成を完全にブロックした。同じ濃度で、約75%のタンパク質合成のみを、LL2-膵臓RNaseの添加によってブロックした。

ONCONASE_R が、タンパク質合成および細胞傷害性の増加した阻害を生じるリソソームによって分解されないという仮説を試験するために、¹²⁵I-LL2およびLL2免疫毒

10

20

30

40

50

素を、Daudi細胞に添加した。図7に示され得るように、指示した時間間隔後、LL2-ONCONASE_R で処理した細胞は、その溶解物中により多くの¹²⁵I-標識したタンパク質を含み、これは、免疫毒素を、LL2-EDNおよびLL2単独よりも遅い速度で分解したことを示した。したがって、ONCONASE_R はリソソーム中で分解されないようである。

CD22が、ハイブリッドタンパク質の抗体部分の結合によってONCONASE_R 免疫毒素の毒性を媒介するという仮説を試験するために、免疫毒素を、過剰のLL2抗体の存在下でアッセイした(図6)。ONCONASE_R 免疫毒素の存在下で24時間後にDaudi細胞で観察される細胞傷害性は、等モル量のLL2によって逆転した。これらのデータは、CD22が、パーキットリンパ腫細胞に対してONCONASE_R 細胞傷害性を媒介し得ることを示す。

実施例5：LL2-ONCONASE_R 免疫毒素のインビボ効率

インビボでのLL2-ONCONASE_R の効果をテストするために、Daudi細胞を、SCIDマウスに移植した。1日後、マウスを、ONCONASE_R およびLL2-ONCONASE_R、LL2-Pseudomonas外毒素およびLL2-ドキソルピシン免疫毒素で処置した。

表5で見出され得るように、LL2-ONCONASE_R は、マウスにおいて細胞傷害性副作用(死亡)を引き起こさなかった。比較として、マウスを、同様にPseudomonas外毒素のドメインIIの変異体に結合したLL2で処置した。見出され得るように、この免疫毒素は致死性であった。したがって、免疫毒素の毒性部分としてのONCONASE_R は、処置した動物に毒性ではなく、したがって治療剤としてより良好に耐受されるようである。

表5：LL2-ONCONASE免疫毒素のインビボ細胞傷害性

用量スケジュール	マウスにおける毒性	
	合計用量 (μg)	死亡/総数
LL2-PE38KDEL*		
80 μg腹腔内×1	80	2/2
35 μg腹腔内QD×4	140	2/2
LL2-ONCONASE		
100 μg腹腔内×1	100	0/3
100 μg腹腔内QOD×5	500	0/3
100 μg腹腔内QD×5	500	0/3
500 μg腹腔内×1	500	0/3

*Kreitmanら, Cancer Res. 53:819 (1993)

QD=毎日

QOD=隔日

表6は、Daudi移植したSCIDマウスにおけるLL2-ONCONASE_R およびLL2-ドキソルピシンの効果を示す。マウスに、 5×10^6 Daudi細胞を静脈内で移植した。24時間後、処置を、毎日5回の等容量で始めた。ドキソルピシン免疫毒素を静脈内注射し、そしてONCONASE_R 免疫毒素を腹腔内に注射した。見出され得るように、重量で、LL2-ONCONASE_R の約半分の量が、全身的化学療法薬のドキソルピシンと比較して、マウスの生存を著しく増強した。

表6：播種性Daudiリンパ腫でのSCIDマウスの処置

免疫毒素	合計用量	抗体単独に対する増強した生存のマウスの%
LL2-ドキシソルピシン	9000 μ g	0
LL2-ONCONASE®	500 μ g	40%

5 × 10⁶ Daudi B リンパ腫細胞を静脈内に移植したSCIDマウスでは、腹腔内に注射されたLL2-ONCONASE_R は、リン酸緩衝化生理食塩水(PBS)またはモノクローナル抗体LL2単独で処置したマウスと比較して、マウスの生存を延長することを証明した。図7は、PBSで処置したすべての動物が、重篤なB細胞リンパ腫を発症し、そして35日目までに屠殺したことを示す。LL2で処置した動物の全てを、リンパ腫のため37日目までに屠殺した。他方では、免疫毒素で処置した動物の全ては、37日にわたって生存した。免疫毒素で処置した最後の動物を、46日目に屠殺した。

図8は、2 × 10⁶ Daudi細胞を腹腔内に移植し、次いで500 μ gのLL2-ONCONASE_R を腹腔内に100 μ g/投与/日で処置したSCIDマウスが、100日以上生存したことを示す。PBS、ならびに結合していないLL2およびONCONASE_R で処置した動物の同齡集団は、時間枠内に疾患のいくつかの徴候を示した。PBSコントロール群についての生存の平均時間は71日であり、LL2 + ONCONASE_R については、生存の平均時間は80日であり、そしてLL2-ONCONASE_R 処置したマウスは、112日より長く生存した。

最後に、図9は、LL2-ONCONASE_R が、ONCONASE_R 単独またはRFB4-脱グリコシル化リシンA鎖よりも毒性が少ないことを示す。30mg/kg ONCONASE_R の致死用量と比較して、300mg/kg LL2-ONCONASE_R で処置したマウスは、生存しただけでなく、実験の経過中に体重が増加した。RFB4は、Pseudomonas外毒素フラグメントに結合した場合、免疫毒素が1日あたりに1回のみ与えられるマウスモデルにおいて1 mg/kgのLD₅₀を有した(Mansfieldら, Bioconj. Chem. 7:557(1996))。

これらのインビボ結果は、LL2-ONCONASE_R が、ONCONASE_R 単独、LL2単独、ならびにLL2-Pseudomonas外毒素およびLL2-ドキシソルピシンの免疫毒素と比較して、優れたB細胞毒素であることを示す。毒性研究は、LL2-ONCONASE_R に十分に耐受であり、もしあるとしても副作用はほとんどないことを示す。

本明細書中、上記の特許および特許出願を含むすべての刊行物は、参考として本明細書に援用される。

上記の発明は、明確さおよび理解の目的のためにいくらか詳細に説明されている。形態および詳細の種々の組み合わせもまた、本発明の範囲から逸脱せずに行われ得ることは明らかである。

配列番号 1

10

20

30

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
<Glu-Asp-Trp-Leu-Thr-Phe-Gln-Lys-Lys-His-										
11										20
Ile-Thr-Asn-Thr-Arg-Asp-Val-Asp-Cys-Asp-										
21										30
Asn-Ile-Met-Ser-Thr-Asn-Leu-Phe-His-Cys-										10
31										40
Lys-Asp-Lys-Asn-Thr-Phe-Ile-Tyr-Ser-Arg-										
41										50
Pro-Glu-Pro-Val-Lys-Ala-Ile-Cys-Lys-Gly-										
51										60
Ile-Ile-Ala-Ser-Lys-Asn-Val-Leu-Thr-Thr-										20
61										70
Ser-Glu-Phe-Tyr-Leu-Ser-Asp-Cys-Asn-Val-										
71										80
Thr-Ser-Arg-Pro-Cys-Lys-Tyr-Lys-Leu-Lys-										
81										90
Lys-Ser-Thr-Asn-Lys-Phe-Cys-Val-Thr-Cys-										30
91										100
Glu-Asn-Gln-Ala-Pro-Val-His-Phe-Val-Gly-										
101			104							
Val-Gly-Ser-Cys										40

配列番号 2

GATGTTGATT GTGATAATAT CATGTCAACA AACTTGTTCC ACTGCAAGGA 50
 CAAGAACACT TTTATCTATT CACGTCCTGA GCCAGTGAAG GCCATCTGTA 100
 AAGGAATTAT AGCCTCCAAA AATGTGTTAA CTACCTCTGA GTTTTATCTC 150
 TCTGATTGCA ATGTAACAAG CAGGCCTTGC AAGTATAAAT TAAAGAAATC 200
 AACTAATAAA TTTTGTGTAA CTTGTGAAAA TCAGGCACCA GTTCATTTT 249

配列番号 3

50

1 10
 Asp-Val-Asp-Cys-Asp-Asn-Ile-Met-Ser-Thr-

11 20
 Asn-Leu-Phe-His-Cys-Lys-Asp-Lys-Asn-Thr-

21 30
 Phe-Ile-Tyr-Ser-Arg-Pro-Glu-Pro-Val-Lys-

31 40
 Ala-Ile-Cys-Lys-Gly-Ile-Ile-Ala-Ser-Lys-

41 50
 Asn-Val-Leu-Thr-Thr-Ser-Glu-Phe-Tyr-Leu-

51 60
 Ser-Asp-Cys-Asn-Val-Thr-Ser-Arg-Pro-Cys-

61 70
 Lys-Tyr-Lys-Leu-Lys-Lys-Ser-Thr-Asn-Lys-

71 80
 Phe-Cys-Val-Thr-Cys-Glu-Asn-Gln-Ala-Pro-

81 83
 Val-His-Phe

10

20

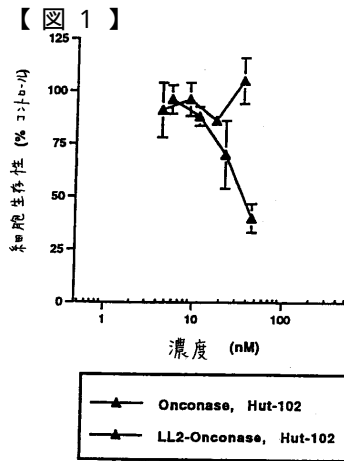


Fig. 1

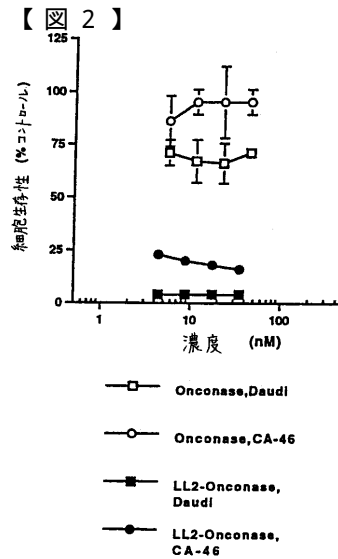


Fig. 2

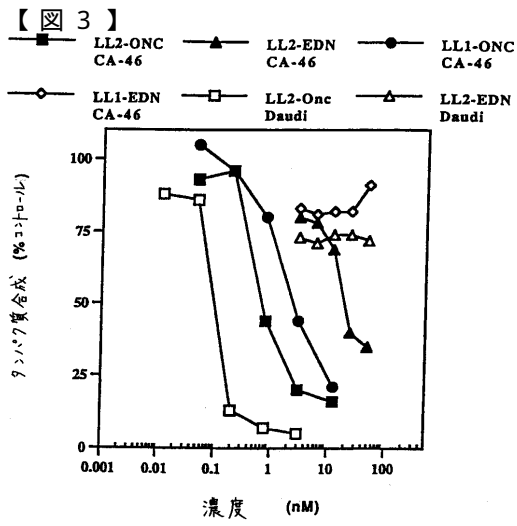


Fig. 3

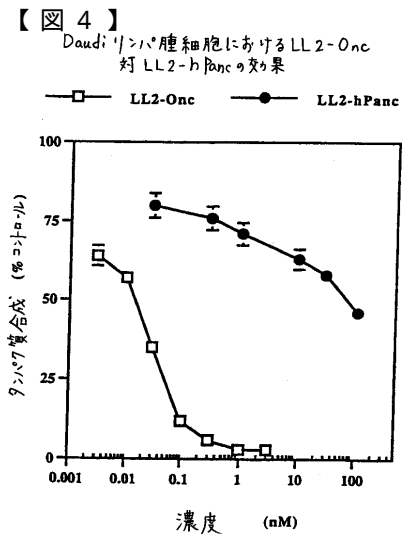


Fig. 4

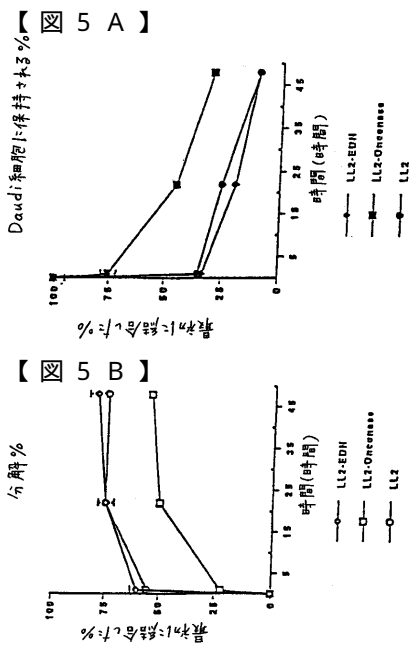


FIG. 5A

Fig. 5B

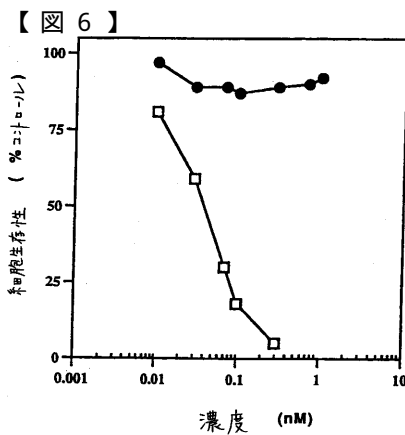


Fig. 6

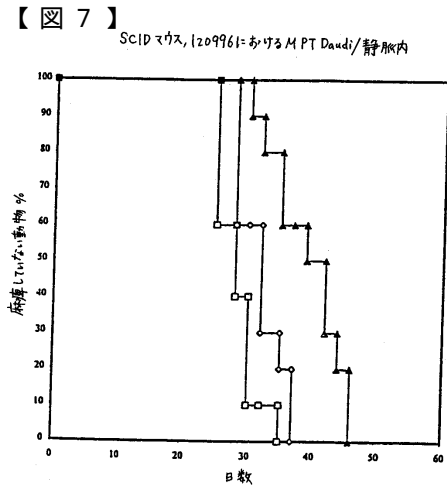


Fig. 7

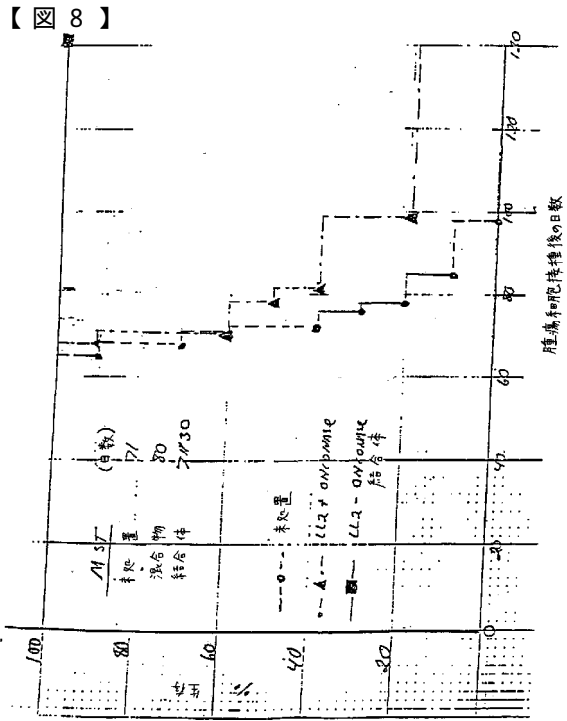
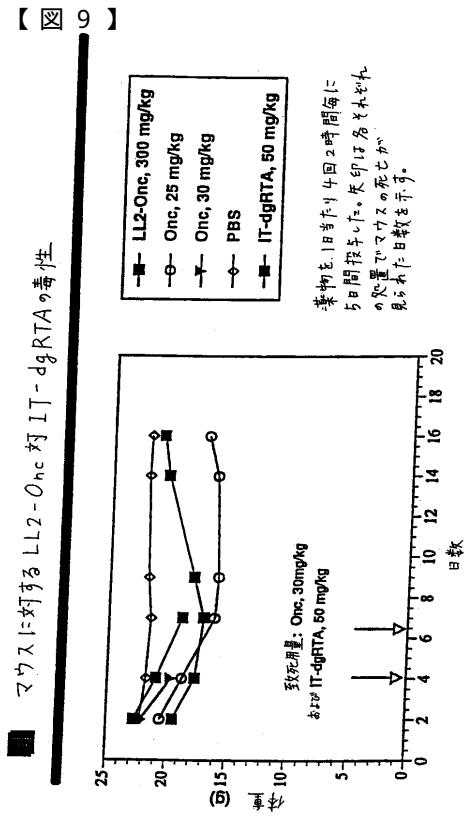


Fig. 8



RFB4-PE35KDEL, 1 µl/日, 4日間 : LD50 1 mg/kg
 E. Mansfield, Bioconjugate Chem. 1996, 657

Fig. 9

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	
C 0 7 K 19/00 (2006.01)		C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 9/22 (2006.01)		C 1 2 N 9/22	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)		C 1 2 N 15/00	Z N A A

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100062409

弁理士 安村 高明

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(72)発明者 ライバック, スザンナ エム.

アメリカ合衆国 メリーランド 20855, フレデリック, ラウンド ヒル ロード 741
1 ビー

(72)発明者 ニュートン, ダイアン エル.

アメリカ合衆国 メリーランド 20855, ロックビル, ニュー ベッドフォード ドライブ
15904

(72)発明者 ゴールデンバーグ, デイビッド エム.

アメリカ合衆国 ニュージャージー 07945, メンドハム, プレザント バレー ロード 3
30

審査官 光本 美奈子

(56)参考文献 Drug Delivery, 1993年, 1, 3-10

J Biol Chem, 1991年, 266(1), 245-251

Blood 15 97(2) p.528-535 (2001)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C07K 19/00

C12N 15/00 - 15/90