

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-42002

(P2010-42002A)

(43) 公開日 平成22年2月25日(2010.2.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 B O 3 0
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 3
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 B O 6 5
審査請求 有 請求項の数 102 O L (全 112 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-193670 (P2009-193670)	(71) 出願人	507316398
(22) 出願日	平成21年8月24日 (2009.8.24)		ゲンマブ エー/エス
(62) 分割の表示	特願2005-501469 (P2005-501469)		デンマーク コペンハーゲン ケー プレ
	の分割		ドゲード 34
原出願日	平成15年10月17日 (2003.10.17)	(74) 代理人	100102978
(31) 優先権主張番号	60/419,163		弁理士 清水 初志
(32) 優先日	平成14年10月17日 (2002.10.17)	(74) 代理人	100119507
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 刑部 俊
(31) 優先権主張番号	60/460,028	(74) 代理人	100128048
(32) 優先日	平成15年4月2日 (2003.4.2)		弁理士 新見 浩一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100129506
			弁理士 小林 智彦
(特許庁注：以下のものは登録商標)		(74) 代理人	100130845
1. ペンティアム			弁理士 渡邊 伸一
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD20に対するヒトモノクローナル抗体

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 ヒトBリンパ球表面抗原CD20に結合して阻害するヒトモノクローナル抗体と、該抗体の利用法を提供する。

【解決手段】 V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、複数のアイソタイプのヒト抗体を産生することができる、トランスフェクターマヤ非ヒトトランスジェニック動物において産生させた、ヒト抗CD20モノクローナル抗体。また、該抗体を産生するトランスジェニック動物及びハイブリドーマ、さらに該抗体を含む医薬組成物、並びに該抗体を用いる治療法及び診断法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトCD20に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 2】

IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、分泌性IgA、IgD、及びIgE抗体から成る群より選択される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体がIgG1抗体である、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 4】

前記抗体がIgG3抗体である、請求項 2 に記載の抗体。

10

【請求項 5】

前記抗体がIgG4抗体である、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 6】

前記抗体がIgA1又はIgA2抗体である、請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 7】

前記抗体がヒトCD20から、約 10^{-5} 秒 $^{-1}$ 以下の解離速度定数(kd)で解離する、上記請求項のいずれかに記載の抗体。

【請求項 8】

前記抗体がヒトCD20に、約5nM以下の親和性定数(K_D)で解離する、上記請求項のいずれかに記載の抗体。

20

【請求項 9】

前記抗体が、以下：

(i) 補体の存在下でCD20発現細胞の補体依存的細胞傷害性(CDC)を誘導することができる；

(i i) 補体の存在下で、CD20及び高レベルのCD55及び/又はCD59を発現する細胞の補体依存的細胞傷害性(CDC)を誘導することができる；

(i i i) CD20発現細胞のアポトーシスを誘導することができる；

(i v) エフェクタ細胞の存在下で、CD20発現細胞の抗体依存的細胞傷害性(ADCC)を誘導することができる；

(v) CD20を発現する細胞の同型接着を誘導することができる；

30

(v i) CD20に結合すると、脂質ラフトに転位することができる；

(v i i) CD20を発現する腫瘍細胞を有する対象の生存期間を延長することができる；

(v i i i) CD20を発現する細胞を枯渇させることができる；及び

(i x) 低レベルのCD20を発現する細胞(CD20^{low}細胞)を枯渇させることができるのうちから選択される特徴の一つ以上を有する、上記請求項のいずれかに記載の抗体。

【請求項 10】

以下：

(i) 少なくとも20%、そして好ましくは少なくとも30%、10 µg/mlの抗体濃度で37 °Cで3時間以内に、33 vol/vol %の血漿中B-CLL細胞のCDC媒介性溶解を誘導することができる；

40

(i i) 少なくとも20%、そして好ましくは少なくとも30%、10 µg/mlの抗体濃度で37 °Cで3時間以内に、33 vol/vol %の全血中B-CLL細胞のCDC媒介性溶解を誘導することができる；

(i i i) 20 µgの用量で、30%を超えるDaudi細胞を注射されたSCIDマウスの50%生存率を延長することができる；及び

(i v) 連続4日間1日当たり6.25mg/kgの投薬量でカニクイザルにおいて、低レベルのCD20を発現する末梢B細胞(CD20^{low}B細胞)を検出不能なレベルまで、50日間を越えて枯渇させることができる、

から成る群より選択される特徴の一つ以上、有する、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 11】

50

少なくとも20%、そして好ましくは少なくとも30%、10 µg/mlのCD20抗体濃度で37で3時間以内に、33 vol/vol %の血漿存在下でB-CLL細胞のCDC媒介性溶解を誘導することができる、請求項10に記載の抗体。

【請求項12】

それぞれ配列番号1及び配列番号3に記載された通りのヌクレオチド配列及びその保存的配列改変、をそれらの可変領域に含むヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸にコードされた、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

【請求項13】

それぞれ配列番号5及び配列番号7に記載された通りのヌクレオチド配列及びその保存的配列改変、をそれらの可変領域に含むヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸にコードされた、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

10

【請求項14】

それぞれ配列番号9及び配列番号11に記載された通りのヌクレオチド配列及びその保存的配列改変、をそれらの可変領域に含むヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸にコードされた、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

【請求項15】

それぞれ配列番号2及び配列番号4に記載された通りのアミノ酸配列及びその保存的配列改変を含むヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有する、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

【請求項16】

それぞれ配列番号2及び配列番号4に記載された通りのアミノ酸配列に少なくとも90%相同、好ましくは少なくとも95%相同、そしてより好ましくは少なくとも98%相同、又は少なくとも99%相同なヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有する、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

20

【請求項17】

それぞれ配列番号6及び配列番号8に記載された通りのアミノ酸配列及びその保存的配列改変を含むヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有する、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

【請求項18】

それぞれ配列番号6及び配列番号8に記載された通りのアミノ酸配列に少なくとも90%相同、好ましくは少なくとも95%相同、そしてより好ましくは少なくとも98%相同、又は少なくとも99%相同なヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有する、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

30

【請求項19】

それぞれ配列番号10及び配列番号12に記載された通りのアミノ酸配列及びその保存的配列改変を含むヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有する、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

【請求項20】

それぞれ配列番号10及び配列番号12に記載された通りのアミノ酸配列に少なくとも90%相同、好ましくは少なくとも95%相同、そしてより好ましくは少なくとも98%相同、又は少なくとも99%相同なヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有する、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

40

【請求項21】

(i) 配列番号2、4、6、8、10、又は12；及び
(ii) 上記(i)に記載されたとおりのアミノ酸配列のいずれか一つに少なくとも90%相同、好ましくは少なくとも95%相同、そしてより好ましくは少なくとも98%相同、又は少なくとも99%相同な配列、
から成る群より選択される少なくとも1つのヒト可変領域を含む、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

【請求項22】

50

請求項 1 2 乃至 2 1 のいずれか 1 つの抗体に規定されたヒトCD20上のエピトープに結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 2 3】

- (i) 位置 1 7 2 のアミノ酸残基プロリンを含まない又は必要としない；
- (i i) 位置 1 7 0 のアミノ酸残基アラニン又は位置 1 7 2 のプロリンを含まない又は必要としない；
- (i i i) 位置 1 6 3 のアミノ酸残基アスパラギン及び位置 1 6 6 のアスパラギンを含む又は必要とする；
- (i v) 位置 1 7 2 のアミノ酸残基プロリンを含まない又は必要としないが、位置 1 6 3 のアミノ酸残基アスパラギン及び位置 1 6 6 のアスパラギンを含む又は必要とする；
- (v) 位置 1 7 0 のアミノ酸残基アラニン又は位置 1 7 2 のプロリンを含まない又は必要としないが、位置 1 6 3 のアミノ酸残基アスパラギン及び位置 1 6 6 のアスパラギンを含む又は必要とする、

CD20上のエピトープに結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 2 4】

CD20に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体であって、以下の特徴：

- (i) 変異型 P172S

CD20 (位置 1 7 2 のプロリンがセリンに変異した) に、少なくともヒトCD20に対するのと同じ親和性で結合する；

- (i i) 変異型AxP (位置 1 7 0 のアラニンがセリンに変異し、位置 1 7 2 のプロリンがセリンに変異した) に、少なくともヒトCD20に対するのと同じ親和性で結合する；

(i i i) 10 µg/ml の抗体濃度のときに、変異型N166D (位置 1 6 6 のアスパラギンがアスパラギン酸に変異した) に対して、ヒトCD20に比較して 5 0 % 以上少ない結合を示す；又は

(i v) 10 µg/ml の抗体濃度のときに、変異型N163D (位置 1 6 3 のアスパラギンがアスパラギン酸に変異した) に対して、ヒトCD20に比較して 5 0 % 以上少ない結合を示す；のうちの一つ以上を有する、抗体。

【請求項 2 5】

ヒトCD20の小型第一細胞外ループ中のエピトープに結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 2 6】

CD20上の不連続なエピトープに結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 2 7】

CD20上の不連続なエピトープに結合する単離されたヒトモノクローナル抗体であって、前記エピトープが、第一小型細胞外ループの部分と、第二細胞外ループの部分とを含む、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 2 8】

CD20上の不連続なエピトープに結合する単離されたヒトモノクローナル抗体であって、前記エピトープが、小型第一細胞外ループの残基AGIYAPと、第二細胞外ループの残基MESLNFI RAHTPYIとを含む、単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 2 9】

請求項 1 1 乃至 2 8 のいずれか 1 つに記載された抗体の結合特徴を有する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3 0】

- (i) 配列番号 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、又は 1 8；

(i i) (i) に記載された配列の保存的配列改変；及び

(i i i) ヒトCD20への結合能を保持した、(i) 又は (i i) に規定された配列のいずれか 1 つのフラグメント

から成る群より選択される少なくとも 1 つのCDR配列を含む、ヒトCD20に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

配列番号 1 5 を含む、請求項 3 0 に記載の抗体。

【請求項 3 2】

(i) 配列番号 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、又は 1 8；

(i i) (i) に記載された配列の保存的配列改変；及び

(i i i) ヒト CD20 への結合能を保持した、(i) 又は (i i) に規定された配列のいずれか 1 つのフラグメント

から成る群より選択される少なくとも 4 つの CDR 配列を含む、請求項 3 0 に記載された単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3 3】

配列番号 1 3、1 4、1 5、1 6、1 7、及び 1 8 を含む、請求項 3 0 に記載の抗体。

【請求項 3 4】

(i) 配列番号 1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、又は 2 4；

(i i) (i) に記載された配列の保存的配列改変；及び

(i i i) ヒト CD20 への結合能を保持した、(i) 又は (i i) に規定された配列のいずれか 1 つのフラグメント

から成る群より選択される少なくとも 1 つの CDR 配列を含む、ヒト CD20 に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3 5】

(i) 配列番号 1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、又は 2 4；

(i i) (i) に記載された配列の保存的配列改変；及び

(i i i) ヒト CD20 への結合能を保持した、(i) 又は (i i) に規定された配列のいずれか 1 つのフラグメント

から成る群より選択される少なくとも 4 つの CDR 配列を含む、請求項 3 4 に記載された単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3 6】

配列番号 1 9、2 0、2 1、2 2、2 3、及び 2 4 を含む、請求項 3 4 に記載された抗体。

【請求項 3 7】

(i) 配列番号 2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、又は 3 0；

(i i) (i) に記載された配列の保存的配列改変；及び

(i i i) ヒト CD20 への結合能を保持した、(i) 又は (i i) に規定された配列のいずれか 1 つのフラグメント

から成る群より選択される少なくとも 1 つの CDR 配列を含む、ヒト CD20 に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項 3 8】

配列番号 2 7 を含む、請求項 3 7 に記載の抗体。

【請求項 3 9】

(i) 配列番号 2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、又は 3 0；

(i i) (i) に記載された配列の保存的配列改変；及び

(i i i) ヒト CD20 への結合能を保持した、(i) 又は (i i) に規定された配列のいずれか 1 つのフラグメント

から成る群より選択される少なくとも 4 つの CDR 配列を含む、請求項 3 7 に記載された抗体。

【請求項 4 0】

配列番号 2 5、2 6、2 7、2 8、2 9、及び 3 0 を含む、請求項 3 9 に記載の抗体。

【請求項 4 1】

(i) 配列番号 1 3、1 9、又は 2 5、あるいは、配列番号 1 3、1 9 又は 2 5 の配列の 1 つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

(i i) 配列番号 1 4、2 0、又は 2 6、あるいは、配列番号 1 4、2 0、又は 2 6 の配

10

20

30

40

50

列の1乃至4つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

(i i i) 配列番号15、又は27、あるいは、配列番号15又は27の配列の1乃至4つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

(i v) 配列番号16、あるいは、配列番号16の配列の1乃至2つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

(v) 配列番号17、あるいは、配列番号17の配列の1乃至2つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；及び

(v i) 配列番号18又は30、あるいは、配列番号18又は30の配列の1乃至2つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

から成る群より選択される少なくとも1つのCDRを含む、上記請求項1乃至11のいずれかに記載の抗体。

【請求項42】

(i) 配列番号13、19、又は25、あるいは、配列番号13、19又は25の配列の1つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

(i i) 配列番号14、20、又は26、あるいは、配列番号14、20、又は26の配列の1乃至4つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

(i i i) 配列番号15、又は27、あるいは、配列番号15又は27の配列の1乃至4つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

(i v) 配列番号16、あるいは、配列番号16の配列の1乃至2つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

(v) 配列番号17、あるいは、配列番号17の配列の1乃至2つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；及び

(v i) 配列番号18又は30、あるいは、配列番号18又は30の配列の1乃至2つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列；

から成る群より選択される少なくとも4つのCDRを含む、請求項41に記載の抗体。

【請求項43】

配列番号15、又は27、及び、配列番号15又は27の配列の1乃至4つのアミノ酸置換、欠失又は追加を有する配列

から成る群より選択される1つのCDRを含む、請求項41に記載の抗体。

【請求項44】

インタクトIgG1抗体、インタクトIgG2抗体、インタクトIgG3抗体、インタクトIgG4抗体、インタクトIgM抗体、インタクトIgA1抗体、インタクトIgA2抗体、インタクト分泌性IgA抗体、インタクトIgD抗体、及びインタクトIgE抗体から成る群より選択されるインタクト抗体である、上記請求項のいずれか1つに記載された抗体であって、真核細胞では糖付加されている、抗体。

【請求項45】

抗体フラグメント又は一本鎖抗体である、上記請求項のいずれか1つに記載の抗体。

【請求項46】

(i) 免疫グロブリン・ヒンジ領域ポリペプチドに融合された、請求項24に定義された通りの重鎖可変領域又は軽鎖可変領域の形の、結合ドメインポリペプチド、(i i) 前記ヒンジ領域に融合された免疫グロブリン重鎖CH2定常領域、及び(i i i) CH2定常領域に融合された免疫グロブリン重鎖CH3定常領域を含む、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である、上記請求項のいずれか一つに記載された抗体。

【請求項47】

V-(D)-J遺伝子セグメント再編成の結果、機能的ヒト重鎖導入遺伝子及び機能的ヒト軽鎖導入遺伝子が形成された、非ヒトトランスジェニック動物から得られたB細胞を、不死化細胞に融合させて含有するハイブリドーマにより産生される、上記請求項のいずれか1つに記載された抗体。

【請求項48】

V-(D)-J遺伝子セグメント再編成の結果、機能的ヒト重鎖導入遺伝子及び機能的ヒト軽鎖

10

20

30

40

50

導入遺伝子が形成された、非ヒトトランスジェニック動物から得られたB細胞を、不死化細胞に融合させて含むハイブリドームであって、上記請求項のいずれか1つに記載されたモノクローナル抗体を検出可能な量、産生する、ハイブリドーム。

【請求項49】

それぞれ配列番号1、5、又は9及び配列番号3、7、又は11に記載された通りのヌクレオチド配列、及び、その保存的配列改変、をそれらの可変領域に含むヒトIgG重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸にコードされたヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーム。

【請求項50】

それぞれ配列番号2、6、又は10及び配列番号4、8、又は12に記載された通りのアミノ酸配列、及び、その保存的配列改変、を含むIgG重鎖及びカッパ軽鎖可変領域を有するヒトモノクローナルを産生するハイブリドーム。

10

【請求項51】

ヒト重鎖及びヒト軽鎖をコードする核酸を含むトランスフェクターマにより産生される、請求項1乃至45のいずれか1つに記載された抗体。

【請求項52】

ヒト重鎖及びヒト軽鎖をコードする核酸を含むトランスフェクターマであって、請求項1乃至45のいずれか1つに記載された抗体を検出可能な量、産生する、トランスフェクターマ。

【請求項53】

それぞれ配列番号1、5、又は9及び配列番号3、7、又は11に記載された通りのヌクレオチド配列、及び、その保存的配列改変、をそれらの可変領域に含むヒトIgG重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸にコードされたヒトモノクローナル抗体を産生するトランスフェクターマ。

20

【請求項54】

それぞれ配列番号2、6、又は10及び配列番号4、8、又は12に記載された通りのアミノ酸配列、及び、その保存的配列改変、を含むIgG重鎖及びカッパ軽鎖可変領域を有するヒトモノクローナルを産生するトランスフェクターマ。

【請求項55】

それぞれ配列番号2、6、又は10及び配列番号4、8、又は12に記載された通りのアミノ酸配列、及び、その保存的配列改変、を含む重鎖及び軽鎖可変領域を有するヒトモノクローナルを産生する真核性又は原核性宿主細胞。

30

【請求項56】

それぞれ配列番号2、6、又は10及び配列番号4、8、又は12に記載された通りのアミノ酸配列、及び、その保存的配列改変、を含む重鎖及び軽鎖可変領域を有するヒトモノクローナルを産生する非ヒトトランスジェニック動物又は植物。

【請求項57】

非ヒトトランスジェニック動物のB細胞に抗体を産生させるように、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する前記動物を、ヒトCD20又はヒトCD20発現細胞で免疫処理するステップと、

前記B細胞を骨髄腫細胞と融合させて、ヒトCD20に対して特異的なヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーム細胞を形成するステップと、

前記ハイブリドーム、又はこのようなハイブリドームを由来とするトランスフェクターマからの培養上清から、CD20に特異的なヒトモノクローナル抗体を単離するステップと、を含む、ヒトCD20に結合するヒトモノクローナル抗体を作製する方法。

40

【請求項58】

前記免疫処理が、ヒトCD20をトランスフェクトしてある細胞で行われる、請求項57に記載の方法。

【請求項59】

非ヒトトランスジェニック動物のB細胞に抗体を産生させるように、ヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する前記動物を、ヒトCD20をトランスフェクト

50

してある細胞で免疫処理するステップと、
前記動物のB細胞を単離するステップと、
前記B細胞を骨髓腫細胞に融合させて、ヒトCD20に特異的なヒトモノクローナル抗体を分泌する不死のハイブリドーマ細胞を形成するステップと、
前記ハイブリドーマ、又はこのようなハイブリドーマを由来とするトランスフェクトーマからの培養上清から、CD20に特異的なヒトモノクローナル抗体を単離するステップと、
により得られる、ヒトCD20に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体。

【請求項60】

ヒトV_H3-13/DP-44 生殖細胞系配列（配列番号54）を由来とする重鎖可変領域アミノ酸配列と、ヒトL6/JK4-CK（配列番号55）生殖細胞系配列を由来とする軽鎖可変領域アミノ酸配列と、を含む、単離されたヒト抗体であって、ヒトCD20に結合する、単離されたヒト抗体。

10

【請求項61】

ヒトV_H3-09/JH6b 生殖細胞系配列（配列番号56）を由来とする重鎖可変領域アミノ酸配列と、ヒトV_L-L6/JK5（配列番号57）生殖細胞系配列を由来とする軽鎖可変領域アミノ酸配列と、を含む、単離されたヒト抗体であって、ヒトCD20に結合する、単離されたヒト抗体。

【請求項62】

請求項1乃至45のいずれか1つに記載のヒト抗体と、薬学的に許容可能な担体とを含む組成物。

20

【請求項63】

補完的な機能活性を有する、請求項1乃至45のいずれか1つに記載の2つ以上のヒト抗体の組合せを含む組成物。

【請求項64】

請求項15に記載の第一の抗体と、請求項19に記載の第二の抗体とを含む、請求項61に記載の組成物。

【請求項65】

治療薬をさらに含む請求項62乃至64のいずれかに記載の組成物。

【請求項66】

放射性同位体を付着させるためのキレート・リンカをさらに含む、請求項1乃至45のいずれか1つに記載の抗体。

30

【請求項67】

細胞傷害性作用薬、放射性同位体、又は薬物に連結させた、請求項1乃至45のいずれか1つに記載の抗体を含む免疫複合体。

【請求項68】

請求項1乃至45のいずれか1つに記載の抗体と、ヒトエフェクタ細胞への結合特異性部分とを含む二重特異的分子。

【請求項69】

請求項1乃至45のいずれか1つに記載の抗体と、ヒトFc受容体への結合特異性部分、又は、CD3などのT細胞受容体への結合特異性部分と、を含む二重特異的分子。

40

【請求項70】

細胞の成長が阻害されるように、請求項1乃至45のいずれか1つに記載の抗体の有効量に前記細胞を接触させるステップを含む、CD20発現細胞の成長を阻害する方法。

【請求項71】

CD20発現細胞の致死が起きるように、請求項1乃至45のいずれか1つに記載の抗体に前記細胞を接触させるステップを含む、CD20発現細胞を致死させる方法。

【請求項72】

前記細胞がBリンパ球又は腫瘍細胞である、請求項70又は71のいずれか1つに記載の方法。

【請求項73】

50

請求項 1 乃至 4 5 又は 6 0 乃至 6 9 のいずれか 1 つに記載のヒト抗体、組成物、免疫複合体、又は二重特異的分子、請求項 9 4 乃至 9 7 のいずれか 1 つに記載の発現ベクタ、を、CD20 発現細胞が関与する疾患又は異常を治療又は予防するために有効量、対象に投与するステップを含む、前記疾患を治療又は予防する方法。

【請求項 7 4】

前記疾患が B 細胞リンパ腫である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

前記疾患が B 細胞非ホジキンリンパ腫である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 6】

前記疾患が、前駆 B 細胞リンパ芽球性白血病 / リンパ腫及び成熟 B 細胞新生物、例えば B 細胞慢性リンパ球性白血病 (CLL) / 小リンパ球性リンパ腫 (SLL)、B 細胞プロリンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、外套細胞リンパ腫 (MCL)、濾胞性リンパ腫 (FL)、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯 B 細胞リンパ腫 (MALT 型、結節性及び脾性)、ヘアリーセル白血病、びまん性大 B 細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髄腫、移植後リンパ増殖異常、ワルデンストレーム大グロブリン血症、及び異形成性大細胞リンパ腫 (ALCL)、から成る群より選択される、請求項 7 3 に記載の方法。

10

【請求項 7 7】

前記疾患が濾胞性リンパ腫 (FL) である、請求項 7 6 に記載の方法。

【請求項 7 8】

前記疾患が、B 細胞慢性リンパ球性白血病 (CLL) / 小リンパ球性リンパ腫 (SLL) である、請求項 7 6 に記載の方法。

20

【請求項 7 9】

前記疾患が、リンパ腫様肉芽腫症、原発性浸出リンパ腫、血管内大 B 細胞リンパ腫、縦隔大 B 細胞リンパ腫、重鎖疾患 (λ 、 μ 及び δ 疾患を含む)、免疫抑制剤による治療で誘導されるリンパ腫、例えばシクロスポリン誘導性リンパ腫、及びメトトレキサート誘導性リンパ腫、である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 0】

請求項 1 乃至 4 5 又は 6 0 乃至 6 7 のいずれか 1 つに記載の抗体、組成物、免疫複合体、又は二重特異的分子、請求項 9 4 乃至 9 7 のいずれか 1 つに記載の発現ベクタ、を、CD20 発現免疫細胞が関与する免疫疾患を治療又は予防するために有効量、対象に投与するステップを含む、前記免疫疾患を治療又は予防する方法。

30

【請求項 8 1】

治療法が、自己抗原に対する抗体を産生する B 細胞の致死を含む、請求項 8 0 に記載の方法。

【請求項 8 2】

前記疾患又は異常が、乾癬、乾癬性関節炎、皮膚炎、全身性強皮症及び硬化症、炎症性腸疾患 (IBD)、クローン病、潰瘍性大腸炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、腎炎、湿疹、喘息、アテローム性硬化症、白血球接着不全、多発性硬化症、レイノー症候群、シェーグレン症候群、若年発症性糖尿病、ライター病、ベーチェット病、免疫複合体腎炎、IgA ニューロパチー、IgM 多発性神経炎、免疫媒介血小板減少症、例えば急性特発性血小板減少性紫斑病及び慢性特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、重症筋無力症、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎 (RA)、アトピー性皮膚炎、天疱瘡、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、ウェグナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性感染性単核細胞症、HIV、及び疱疹ウイルス関連疾患、から成る群より選択される、請求項 7 3 に記載の方法。

40

【請求項 8 3】

前記自己免疫疾患がリウマチ性関節炎 (RA) である、請求項 8 2 に記載の方法。

【請求項 8 4】

前記疾患が、潰瘍性大腸炎、クローン病、若年発症性糖尿病、多発性硬化症、免疫媒介性血小板減少症、例えば急性特発性血小板減少紫斑病及び慢性特発性血小板減少紫斑病、溶

50

血性貧血、筋無力症、全身性硬化症、及び尋常性天疱瘡から選択される炎症性、免疫及び/又は自己免疫異常である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 5】

前記疾患が、炎症性腸疾患 (IBD)、潰瘍性結腸炎、クローン病、及び多発性硬化症から選択される炎症性、免疫及び/又は自己免疫異常である、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 8 6】

別の治療薬を対象に別々に投与するステップをさらに含む、請求項 7 0 乃至 8 5 のいずれか 1 つに記載の方法。

【請求項 8 7】

前記治療薬が細胞傷害性作用薬又は放射毒性作用薬である、請求項 8 6 に記載の方法。

10

【請求項 8 8】

前記治療薬が免疫抑制剤である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 8 9】

前記治療薬が、例えばサイトカイン又はケモカインなど、免疫調節性作用薬である、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 0】

前記治療薬が、ドキソルピシン、シスプラチン、プレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、及びシクロホスファミドから成る群より選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

【請求項 9 1】

前記治療薬が、抗CD25抗体、抗CD19抗体、抗CD21抗体、抗CD22抗体、抗CD37抗体、抗CD38抗体、抗IL6R抗体、抗IL8抗体、抗IL15抗体、抗IL15R抗体、抗CD4抗体、抗CD11a抗体、抗アルファ-4/ベータ-1 インテグリン (VLA4) 抗体、CTLA4-Ig及び抗C3b(i)抗体から成る群より選択される、請求項 8 6 に記載の方法。

20

【請求項 9 2】

試料中のCD20抗原又はCD20発現細胞の存在を検出するための *in vitro*法であって、前記試料を、請求項 1 乃至 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体に、前記抗体とCD20との間の複合体形成が可能な条件下で接触させるステップと、複合体の形成を検出するステップとを含む、方法。

30

【請求項 9 3】

試料中のCD20抗原又はCD20発現細胞の存在を検出するための、請求項 1 乃至 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体を含む、キット。

【請求項 9 4】

対象においてCD20抗原又はCD20発現細胞の存在を検出するための *in vivo*法であって、請求項 1 乃至 4 5 のいずれか 1 つに記載の抗体を、前記抗体とCD20との間の複合体形成が可能な条件下で投与するステップと、形成された複合体を検出するステップとを含む、方法。

40

【請求項 9 5】

ヒトCD20に結合するヒト抗体の軽鎖、重鎖、又は軽鎖及び重鎖の両方の可変領域をコードするヌクレオチド配列を含む発現ベクタ。

【請求項 9 6】

ヒトCD20に結合するヒト抗体の軽鎖、重鎖、又は軽鎖及び重鎖の両方の定常をコードするヌクレオチド配列をさらに含む、請求項 9 5 に記載の発現ベクタ。

【請求項 9 7】

配列番号 1、5、及び 9 に記載された通りのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチドを含む重鎖可変領域と、配列番号 3、7、及び 11 に記載された通りのヌクレオチド配列から成る群より選択されるヌクレオチド配列を含む軽鎖可変領域とをコードするヌクレオチド配列、及び、それらの保存的改変を含む発現ベクタ。

50

【請求項 98】

配列番号 2、6、及び 10 に記載された通りのアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 4、8、及び 12 に記載された通りのアミノ酸配列から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とをコードするヌクレオチド配列、及び、それらの保存的配列改変を含む発現ベクタ。

【請求項 99】

請求項 95 乃至 98 のいずれか 1 つに記載の発現ベクタと、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

【請求項 100】

請求項 1 乃至 45 のいずれか 1 つの抗体に結合する抗イディオタイプ抗体。

10

【請求項 101】

2F2、11B8 又は 7D8 に結合する抗イディオタイプ抗体。

【請求項 102】

試料中において、CD20 に対するヒトモノクローナル抗体のレベルを検出するための、請求項 100 又は 101 に記載の抗イディオタイプ抗体の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、両者とも標題「CD20 に対するヒトモノクローナル抗体」であり、また両者とも全文をこの言及をもってここに援用することとする 2002 年 10 月 17 日出願の米国仮出願第 60/419163 号、及び 2003 年 4 月 2 日出願の米国仮出願第 60/460028 号に基づく優先権を主張するものである。

20

【背景技術】

【0002】

発明の背景

CD20 分子（またヒト B リンパ球限定分化抗原又は Bp35 とも言及される）は、分子量が約 35kD の疎水性の膜貫通タンパク質であり、プレ B 及び成熟 B リンパ球上に位置する (Valentine et al. (1989) J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287 (非特許文献 1); and Einfield et al. (1988) EMBO J. 7(3):711-717 (非特許文献 2))。CD20 は末梢血又はリンパ器官由来の B 細胞のうち 90% を越える細胞の表面に見られ、初期のプレ B 細胞発生中に発現し、プラズマ細胞分化まで留まる。CD20 は正常 B 細胞及び悪性 B 細胞の両方の上に存在する。具体的には、CD20 は、B 細胞非ホジキンリンパ腫 (NHL) の 90% を越えるものの上で発現する (Anderson et al. (1984) Blood 63(6):1424-1433 (非特許文献 3)) が、造血幹細胞、プロ B 細胞、正常プラズマ細胞、又は他の正常な組織上には見られない (Tedder et al. (1985) J. Immunol. 135(2):973-979 (非特許文献 4))。

30

【0003】

CD20 タンパク質の 85 個のアミノ酸から成るカルボキシ末端領域は、細胞質内に位置するこの領域の長さは、それぞれ 3 個、3 個、28 個、15 個、及び 16 個のアミノ酸という相対的に短い細胞質内領域を有する、IgM、IgD、及び IgG 重鎖又は組織適合抗原クラス II 又は鎖などの他の B 細胞特異的 surface 構造のそれとは対照的である (Komaromy et al. (1983) NA R 11:6775-6785 (非特許文献 5))。最後の 61 個のカルボキシ末端アミノ酸のうち、21 個は酸性残基であり、僅かに 2 個が塩基性であることは、この領域が正味で強い負の電荷を持つことを示唆している。GenBank 登録番号は NP_690605 である。

40

【0004】

CD20 は B 細胞の活性化及び分化プロセスの初期段階の調節に関与しており (Tedder et al. (1986) Eur. J. Immunol. 16:881-887 (非特許文献 6))、カルシウムイオン・チャンネルとして働いているのではないかと考えられている (Tedder et al. (1990) J. Cell. Biochem. 14D:195 (非特許文献 7))。

【0005】

50

B細胞の増殖及び/又は分化を促進する上でのCD20の実際の動きは不明であるが、それは癌及び自己免疫異常に關与するB細胞を制御又は致死させる抗体媒介治療法にとって重要なターゲットである。具体的には、NHLなどの腫瘍細胞上でCD20が発現していることから、CD20陽性新形成性細胞に対して治療薬を特異的にターゲティングするために、抗体媒介治療法の重要なターゲットとなっている。しかしながら、今日までに得られた結果では、CD20が免疫治療法にとって有用なターゲットであることが明らかに立証されていながら、これらの結果はまた、現在利用できるマウス及びキメラ抗体は理想的な治療薬とはならないことも示している。

【0006】

従って、CD20を発現する細胞が關与する一定の範囲の疾患を防止及び/又は治療する上で有効な、CD20に対する優れた治療用抗体が必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Valentine et al. (1989) J. Biol. Chem. 264(19):11282-11287

【非特許文献2】Einfield et al. (1988) EMBO J. 7(3):711-717

【非特許文献3】Anderson et al. (1984) Blood 63(6):1424-1433

【非特許文献4】Tedder et al. (1985) J. Immunol. 135(2):973-979

【非特許文献5】Komaromy et al. (1983) NAR 11:6775-6785

【非特許文献6】Tedder et al. (1986) Eur. J. Immunol. 16:881-887

【非特許文献7】Tedder et al. (1990) J. Cell. Biochem. 14D:195

【発明の概要】

【0008】

本発明は、腫瘍関連疾患や自己免疫疾患を含む免疫疾患を含め、CD20発現細胞に關係する疾患を治療及び/又は防止するための優れた抗体治療薬を提供する。本発明に包含される抗体は、完全にヒトであるため患者における免疫原性が潜在的に低いという点で優れている。

【0009】

ここで例示するように、本発明のヒト抗体は、CD20を発現するB細胞の致死を多様な機序により媒介する。ある実施態様では、本発明のヒト抗体は、例えば慢性Bリンパ球白血病(B-CLL)細胞などの細胞の、例えば少なくとも約20%のCDC媒介溶解、好ましくは約30%のCDC媒介溶解、そしてより好ましくは40-50%の媒介溶解など、補体依存性細胞傷害性(CDC)を誘導するものである。別の実施態様では、本発明のヒト抗体は、CD20を発現する細胞のアポトーシスを誘導するものである。別の実施態様では、本発明のヒト抗体は、CD20を発現する細胞の同型接着を誘導するものである。さらに、本発明のヒト抗体は、CD20を発現する細胞の抗体依存性細胞傷害(ADCC)をヒトエフェクタ細胞(例えば単球、単核細胞、NK細胞及びPMN)の存在下で誘導するであろう。さらに、本発明のヒト抗体は、CD20を発現する細胞の貪食をマクロファージの存在下で誘導するであろう。本発明のヒトモノクローナル抗体は、これらの機序のうちの1つ以上で作用するものでもよい。本発明のヒト抗体により致死させることのできる細胞の例には、限定はしないが、CD20を発現するB細胞、例えば腫瘍原性B細胞及び免疫疾患に關与するB細胞など、がある。具体的な実施態様では、本ヒト抗体を、例えばB細胞非ホジキンリンパ腫など、リンパ腫の治療においてBリンパ球の致死を媒介させるために用いる。

【0010】

本発明のヒト抗体には、IgG1(例えばIgG1、)、IgG3(例えばIgG3、)及びIgG4(例えばIgG4、)抗体がある。しかしながら、IgG2、IgM、IgA1、IgA2、分泌IgA、IgD、及びIgEを含め、他の抗体アイソタイプも本発明に包含される。本抗体や、全抗体や、例えばFab、F(ab')₂、Fv、一本鎖Fvフラグメントなどを含むその抗原結合フラグメント又は二重抗体であってもよい。さらに、該抗原結合フラグメントには、(i)免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに融合した結合ドメインポリペプチド(例えば重鎖可変領域又は軽

10

20

30

40

50

鎖可変領域)、(i i) ヒンジ領域に融合した免疫グロブリン重鎖CH2定常領域、及び(i i i) 前記CH2定常領域に融合した免疫グロブリン重鎖CH3定常領域、を含む結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質も含まれる。このような結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、さらにUS 2003/0118592 及びUS 2003/0133939に開示されている。

【0011】

本発明の具体的なヒト抗体には、それぞれ配列番号1、5、又は9及び配列番号3、7、又は11に記載された通りのヌクレオチド配列又はそれらの保存的配列改変を、それらの可変領域に含むヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖核酸にコードされた11B8、2F2、及び7D8と言及されるものがある。別の実施態様では、本ヒト抗体は、それぞれ配列番号2、6、又は10及び配列番号4、8、又は12に記載された通りのアミノ酸配列又はそれらの保存的配列改変を含むヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有することを特徴とする。

10

【0012】

さらに別の実施態様では、本ヒト抗体は、それぞれ配列番号2及び配列番号4、それぞれ配列番号6 及び配列番号8；又は配列番号10 及び配列番号12に記載された通りのアミノ酸配列に対して、少なくとも90%相同、好ましくは少なくとも95%相同、そしてより好ましくは少なくとも98%、又は少なくとも99%相同な、ヒト重鎖及びヒトカッパ軽鎖可変領域を有することを特徴とする。

【0013】

本発明の他の具体的なヒト抗体には、ヒト重鎖及び軽鎖CDR1領域、ヒト重鎖及び軽鎖CDR2領域、及びヒト重鎖及び軽鎖CDR3領域を有するCDRドメインを含み、但しこの場合、

20

(a) 前記CDR1、CDR2、及びCDR3ヒト重鎖領域が、図53、55、又は57に示すアミノ酸配列CDR1、CDR2、及びCDR3(配列番号13-15、19-21、及び25-27)並びにそれらの保存的配列改変から成る群より選択されるアミノ酸配列を含み、

(b) 前記CDR1、CDR2、及びCDR3ヒト軽鎖領域が、図53、55、又は57に示すアミノ酸配列CDR1、CDR2、及びCDR3(配列番号16-18、22-24、及び28-30)並びにその保存的配列改変から成る群より選択されるアミノ酸配列を含む、
ようなものがある。

【0014】

さらに本発明には、約1-10nM以下の解離平衡定数(K_D)でCD20から解離する抗体も含まれる。このような抗体には、さらに、関連細胞表面抗原と交差反応せず、従ってそれらの機能を阻害しないようなものも含まれる。

30

【0015】

別の実施態様では、本発明のヒト抗CD20抗体は、以下の性質：

a) ヒトCD20に対する特異性；

b) ここで実施例5(図9)に開示した結合実験で判定したときに約10 nM以下、好ましくは約5 nM以下、そしてより好ましくは約1-3 nM以下の、CD20に対する結合親和性(K_D)；

c) ここで実施例5(図9)に開示した解離速度実験で判定したときに約 10^{-4} sec⁻¹以下、好ましくは約 10^{-5} sec⁻¹以下、そしてより好ましくは約 10^{-6} sec⁻¹以下、のCD20からの解離速度定数(k_d)；

40

d) CD55/59 陰性又はCD55/59陽性細胞に対して高レベルのCDCを媒介する能力；

e) CD20への結合時に脂質ラフトに転位する能力；

f) CD20を発現する細胞の成長を阻害する能力；

g) CD20を発現する細胞のアポトーシスを誘導する能力；

h) CD20を発現する細胞の同型接着を誘導する能力；

i) CD20を発現する細胞のADCCをエフェクタ細胞の存在下で誘導する能力；

j) CD20を発現する腫瘍細胞を有する対象の生存を延長する能力；

k) CD20を発現する細胞を枯渇させる能力；及び/又は

l) 低レベルのCD20を発現する細胞(CD20^{low}細胞)を枯渇させる能力

のうちの一つ以上を特徴とすることができる。

50

【0016】

本発明のヒト抗CD20抗体を、他の結合特異性部分で誘導体化したり、他の結合特異性部分に連結したり、あるいは他の結合特異性部分と同時発現させることができる。具体的な実施態様では、本発明は、CD20に対する少なくとも1つの第一結合特異性部分（例えばヒト抗CD20抗体又はそのミメティック）と、例えばFc受容体（例えばFc RIなどのヒトFc 受容体又はヒトFc 受容体）又はCD3などのT細胞受容体に対する結合特異性部分など、ヒトエフェクタ細胞に対する第二の結合特異性部分とを含む二重特異的又は多重特異的分子を提供するものである。

【0017】

従って、本発明は、ヒトCD20と、Fc受容体又はCD3などのT細胞受容体の両方に結合する二重特異的及び多重特異的分子を包含する。Fc受容体の例は、例えばヒトIgG受容体、例えばFc-ガンマ受容体（Fc R）、例えばFc RI（CD64）、Fc RII（CD32）、及びFc RIII（CD16）である。例えばヒトIgA受容体（例えばFc RI）などの他のFc受容体も標的とすることができる。当該のFc受容体は、好ましくは単球、マクロファージ又は活性化単核細胞などのエフェクタ細胞の表面上に位置するとよい。ある好適な実施態様では、該二重特異的及び多重特異的分子は、Fc 受容体に、当該受容体の免疫グロブリンFc Fc（例えばIgG 又はIgA）結合部位とは異なる部位で結合する。従って、当該の二重特異的及び多重特異的分子の結合は、生理レベルの免疫グロブリンの遮断を受けない。

10

【0018】

さらに別の局面は、本発明のヒトCD20抗体を、別のペプチド又はタンパク質（例えばFab'フラグメント）などの別の機能分子で誘導体化させたり、別の分子に連結したり、又は同時発現させる。例えば、本発明の抗体を、（例えば化学的結合、遺伝子融合、非共有結合又は他の方法などにより）例えば（二重特異的もしくは多重特異的抗体を作製するなどのために）別の抗体、細胞毒、細胞リガンド又は（イムノトキシンなどの免疫結合体を作製するなどのために）抗原などの一つ以上の他の分子実体に、機能的に連結することができる。本発明の抗体を、例えば放射性同位体、低分子抗癌剤、抗炎症薬、又は免疫抑制剤などの他の治療的部分に連結することができる。従って、本発明は、すべてCD20発現細胞に結合し、また他の分子をこのような細胞に狙わせるために用いることのできる多種の抗体結合体、二重特異的及び多重特異的分子、並びに融合タンパク質、を包含するものである。

20

【0019】

さらに別の局面では、本発明は、薬学的に許容可能な担体を、本発明のヒトモノクローナル抗体の1つ又は組合せと一緒に調合して含む、例えば医薬用及び診断用組成物などの組成物/キットを提供するものである。ある具体的な実施態様では、本組成物は、異なるエピトープに結合する抗体や、CDCを誘導すること、そしてアポトーシスを誘導することなど、異なる機能上の特徴を持つ抗体の組合せを含む。

30

【0020】

本発明のヒト抗体、免疫結合体、二重特異的及び多重特異的分子並びに組成物は、細胞の成長を阻害する、及び/又は、細胞を致死させるように、有効量の本抗体、免疫結合体、二重特異的/多重特異的分子又は組成物に細胞を接触させることにより、CD20発現細胞の成長を阻害するための、及び/又は、CD20発現細胞を致死させるための多種の方法で用いることができる。ある実施態様では、本方法は、例えばCDC、アポトーシス、ADCC、貪食により、又はこれらの機序のうちの一つ以上の組合せにより、エフェクタ細胞の存在下でCD20発現細胞を致死させるステップを含む。好ましくは当該の細胞を、CD20を発現しないが、構造上関連する細胞表面抗原を発現するなどと思われる細胞を致死させる又はその活性を阻害することなく（即ち、関連はするが機能的には異なる細胞表面抗原に対する交差反応性なしで）、致死させる又は阻害するとよい。本発明のヒト抗体を用いて阻害できる又は致死させることのできるCD20発現細胞には、例えば腫瘍原性B細胞がある。

40

【0021】

従って、本発明のヒト抗体は、CD20発現細胞が関与する多種の疾患に罹患した患者に本抗体を投与することにより、このような疾患を治療及び/又は防止するために用いることが

50

できる。治療（例えば寛解）又は防止の可能な疾患の例には、限定はしないが、腫瘍化疾患、及び、自己免疫疾患などの免疫疾患がある。治療及び／又は防止の可能な腫瘍化疾患の例には、前駆B細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫を含め、NHLなどのB細胞リンパ腫及び成熟B細胞新生物、例えばB細胞慢性リンパ球性白血病（CLL）／小リンパ球性リンパ腫（SLL）、B細胞プロリンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、外套細胞リンパ腫（MCL）、低級、中級及び高級FLを含む濾胞性リンパ腫（FL）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫（MALT型、結節性及び脾性）、ヘアリーセル白血病、びまん性大B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髓腫、移植後リンパ増殖異常、ワルデンストレーム大グロブリン血症、及び異形成性大細胞リンパ腫（ALCL）、がある。CD20発現B細胞が関与し、治療及び／又は防止の可能な免疫異常の例には、乾癬、乾癬性関節炎、皮膚炎、全身性強皮症及び硬化症、炎症性腸疾患（IBD）、クローン病、潰瘍性大腸炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、腎炎、湿疹、喘息、アテローム性硬化症、白血球接着不全、多発性硬化症、レイノー症候群、シェーグレン症候群、若年発症性糖尿病、ライター病、ベーチェット病、免疫複合体腎炎、IgAニューロパチー、IgM多発性神経炎、免疫媒介血小板減少症、例えば急性特発性血小板減少性紫斑病及び慢性特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、重症筋無力症、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎（RA）、アトピー性皮膚炎、天疱瘡、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、ウェグナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性感染性単核細胞症、HIV、及び疱疹ウィルス関連疾患、がある。更なる例は、重症急性呼吸窮迫症候群及び舞蹈病網膜炎である。また更なる例は、エプスタイン・バーウィルス（EBV）等のウィルスにB細胞が関連して起きる疾患及び異常である。

10

20

【0022】

本発明のある具体的な実施態様では、本抗体を投与される対象を、Fc受容体又はFc受容体などのFc受容体の発現又は活性を高める又は阻害するなど、調節するような化学療法薬、放射線、又は、サイトカインなどの作用物質で、付加的に治療する。治療中に投与する典型的なサイトカインには、顆粒球コロニ刺激因子（G-CSF）、顆粒球マクロファージコロニ刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン-（IFN-g）、及び腫瘍壊死因子（TNF）、がある。典型的な治療薬には、とりわけ、抗新生物性薬剤、例えばドキソルビシン、シスプラチン、プレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、及びシクロホスファミド、がある。

30

【0023】

さらに別の局面では、本発明は、例えばCD20関連疾患を好ましくは初期段階で診断するなど、ある試料又は個体におけるCD20の存在をin vitro又はin vivoで検出する方法を提供するものである。これはさらに、当該疾患や治療の効果を観察したり、また投与すべき抗体の用量を決定又は調節するためにも有用であろう。前記in vivo法は、PET（ポジトロン放射形断層撮影法）又はSPECT（単一光子放射形コンピュータ断層撮影法）などの撮像技術を用いて行うことができる。ある実施態様では、これは、検査しようとする試料を、選択的にはコントロール試料と並行して、本発明のヒトモノクローナル抗体に、この抗体とCD20との間の複合体が形成可能な条件下で接触させることにより、なされる。その後、複合体形成を（例えばFACS分析又はウェスタン・ブロット法などを用いて）検出する。コントロール試料を検査試料と並行して用いる場合、両方の試料で複合体が検出され、これら試料間で複合体形成に何らかの有意な差があれば、それは検査試料中のCD20の存在の指標である。

40

【0024】

さらに別の局面では、本発明は、CD20に結合するヒトモノクローナル抗体を発現する、トランスジェニック・マウスなどの非ヒトトランスジェニック動物を提供するものである。ある具体的な実施態様では、前記の非ヒトトランスジェニック動物は、本発明の抗体の全部又は一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック・マウスである。前記非ヒトトランスジェニック動物は、CD20抗原の精製済み又は濃縮製剤、及び／又は、CD20発現細胞で免疫することができる。好ましく

50

は、トランスジェニック・マウスなどの本非ヒトトランスジェニック動物が、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、CD20に対して複数のアイソタイプ(例えばIgG、IgA及び/又はIgM)のヒトモノクローナル抗体を産生できるとよい。アイソタイプ・スイッチングは、例えば古典的又は非古典的なアイソタイプ・スイッチングなどで起こるものでよい。

【0025】

従って、さらに別の局面では、本発明は、トランスジェニック・マウスなど、ヒト抗CD20抗体を発現する上述の通りの非ヒトトランスジェニック動物を由来とする単離されたB細胞を提供するものである。次に、この単離されたB細胞を、不死化細胞への融合により不死化して、ヒト抗CD20抗体の供給源(例えばハイブリドーマ)とすることができる。この

10

【0026】

ここで例示するように、本発明のヒト抗体は、本抗体を発現するハイブリドーマから直接得ることができ、あるいは、宿主細胞(例えばCHO細胞、NS/O細胞又はリンパ球性細胞)内でクローニング及び組換えにより発現させることができる。宿主細胞の更なる例は、E. coliなどの微生物や、酵母などのカビである。代替的には、これらを組換えにより、非ヒトトランスジェニック動物又は植物で産生させることもできる。従って、別の局面では、本発明は、ヒトCD20に結合するヒトモノクローナル抗体を作成する方法を提供するものである。ある実施態様では、本方法は、(例えば抗CD20抗体の全部又は一部をコードするヒト重鎖導入遺伝子及びヒト軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するなどの)トランスジェニック・マウスなどの非ヒトトランスジェニック動物を、前述したように、ヒトCD20抗原の精製済みもしくは濃縮製剤、及び/又は、ヒトCD20発現細胞で免疫するステップを含む。次に、この動物のB細胞(例えば脾B細胞)を得、骨髓腫細胞と融合させて、CD20に対するヒトモノクローナル抗体を分泌する不死のハイブリドーマ細胞を形成する。

20

【0027】

さらに別の局面では、本発明は、ヒト抗CD20抗体(例えばその可変領域など)をコードする核酸分子や、本発明の該核酸を含有する組換え発現ベクタ、及び、このようなベクタをトランスフェクトした宿主細胞、を提供するものである。これらの宿主細胞を培養することにより本抗体を作製する方法も、本発明の包含するところである。本発明により提供される具体的な核酸は、それぞれヒト抗CD20抗体2F2、7D8、及び11B8の重鎖及び軽鎖をコードする配列番号：1、5、又は9及び配列番号：3、7、又は11に示されたヌクレオチド配列を含むものである。

30

【0028】

本発明の他の特徴及び利点は、以下の詳細な説明及び請求項から明白となるであろう。

【0029】

発明の詳細な説明

本発明は、CD20発現細胞が関与する多種の異常を治療及び診断するための優れた抗体ベースの治療法を提供するものである。本発明の治療法は、CD20上に存在するエピトープに特異的に結合する単離されたヒトモノクローナル抗体を利用する。本発明に包含される単離されたヒトモノクローナル抗体には、IgA、IgG1-4、IgE、IgM、及びIgD抗体がある。

40

【0030】

ある実施態様では、本ヒト抗体はIgG1抗体、より具体的にはIgG1、又はIgG1、アイソタイプである。別の実施態様では、本ヒト抗体はIgG3抗体、より具体的にはIgG3、又はIgG3、アイソタイプである。さらに別の実施態様では、本ヒト抗体はIgG4抗体、より具体的にはIgG4、又はIgG4、アイソタイプである。さらに別の実施態様では、本ヒト抗体はIgA1又はIgA2抗体である。

【0031】

さらに別の実施態様では、本ヒト抗体はIgM抗体である。

【0032】

50

ある実施態様では、本ヒト抗体は、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、CD20に対して複数のアイソタイプの抗ヒトモノクローナル抗体を産生することのできる、トランスジェニック・マウスなどの非ヒトトランスジェニック動物で産生される。従って、本発明の局面は、抗体、その抗体フラグメント及び医薬組成物だけでなく、モノクローナル抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物、B細胞、ホスト細胞トランスフェクターマ、及びハイブリドーマを包含するものである。このようなトランスジェニック動物は、さらに、US 2003/0017534に開示されたものなどのポリクローナル抗体を産生するためのトランスジェニック・ウサギであってもよい。従って、さらに本発明は、CD20に特異的に結合するヒトポリクローナル抗体も包含する。ある実施態様では、本発明は、(i)位置172にアミノ酸残基プロリンを含まない又は要さない；(ii)位置170のアミノ酸残基アラニン又は位置172のプロリンを含まない又は要さない；(iii)位置163のアミノ酸残基アスパラギン及び位置166のアスパラギンを含まない又は要さない；(iv)位置172のアミノ酸残基プロリンを含まない又は要さないが、位置163のアミノ酸残基アスパラギン及び位置166のアスパラギンを含む又は要する；あるいは(v)位置170のアミノ酸残基アラニン又は位置172のプロリンを含まない又は要さないが、位置163のアミノ酸残基アスパラギン及び位置166のアスパラギンを含む又は要する、ようなCD20上のエピトープに結合するポリクローナル抗体に関する。

10

【0033】

別の実施態様では、本発明は、以下の特徴：(i)変異型P172S CD20(位置172のプロリンがセリンに変異している)に、ヒトCD20に対するのと少なくとも同じ親和性で結合する；(ii)変異型AxP(位置170のアラニンがセリンに変異し、位置172のプロリンがセリンに変異している)に、ヒトCD20に対するのと少なくとも同じ親和性で結合する；(iii)抗体濃度が10µg/mlのときに、ヒトCD20に対し、変異型N166D(位置166のアスパラギンがアスパラギン酸に変異している)に対して50%以上の少ない結合を示す；及び/又は(iv)抗体濃度が10µg/mlのときに、ヒトCD20に比較して、変異型N163D(位置163のアスパラギンがアスパラギン酸に変異している)に対して50%以上の少ない結合を示す：のうちの1つ以上を有するヒトポリクローナル抗体に関する。

20

【0034】

さらに別の実施態様では、本発明は、ヒトCD20の小さな第一細胞外ループ中のエピトープに結合するヒトポリクローナル抗体に関する。さらに別の実施態様では、本発明は、CD20上の不連続なエピトープに結合するヒトポリクローナル抗体も包含する。更なる実施態様では、本発明は、第一の小さな細胞外ループの部分と、第二の細胞外ループの部分とを有する、CD20上の不連続なエピトープに結合するヒトポリクローナル抗体に関する。更なる実施態様では、本発明は、小さな第一の細胞外ループの残基AGIYAPと第二の細胞外ループの残基MESLNFIRAHTPYIとを有するCD20上の不連続なエピトープに結合するヒトポリクローナル抗体に関する。

30

【0035】

本発明の抗体を用いてCD20発現細胞を検出する方法は本発明に包含される。本発明の抗体を用いて、例えば増殖及び/又は分化活性などのCD20誘導性活性を遮断又は阻害する方法もさらに提供され、また腫瘍原性疾患(例えばB細胞リンパ腫)及び自己免疫疾患(例えばRA、クローン病及びウェグナー肉芽腫症)などのCD20関連異常の治療にも有用である。

40

【0036】

本発明をより容易に理解できるように、いくつかの用語をまず定義する。更なる定義は、詳細な説明全般に記載されている。

【0037】

用語「CD20」及び「CD20抗原」はここでは交換可能に用いられており、細胞によって天然で発現する、又はCD20をトランスフェクトした細胞で発現するヒトCD20のあらゆるバリエーション、アイソフォーム及び種相同体を包含するものである。本発明の抗体のCD20抗原への結合により、CD20発現細胞(例えば腫瘍細胞)の致死が、CD20を失活させることにより、媒介される。CD20発現細胞の致死は、以下の機序：

50

CD20発現細胞の補体媒介性細胞傷害性 (CDC) ;
 CD20発現細胞のアポトーシス ;
 CD20発現細胞のエフェクタ細胞貪食 ; 又は
 CD20発現細胞のエフェクタ細胞抗体依存性細胞傷害性 (ADCC)
 のうちの1つ以上で起きるであろう。

【0038】

当業で認識されるCD20の同義語には、Bリンパ球抗原CD20、Bリンパ球表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5、及びLF5、がある。

【0039】

ここで用いられる場合の用語「成長を阻害する」(細胞に言及するなど)とは、例えば細胞培養の成長の、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、又は100%の阻害など、抗CD20抗体に接触させたときに、抗CD20抗体に接触していない同じ細胞の成長と比較して、細胞成長のいずれかの測定可能な減少を包含するものと意図されている。このような細胞成長の減少は、エフェクタ細胞貪食、ADCC、CDC、及び/又はアポトーシスなど、多種ある機序のいずれによっても起き得る。

10

【0040】

用語「ラフト」とは、細胞の細胞膜の外側の小葉区域に位置するスフィンゴ脂質及びコレステロールを豊富に含む膜微小ドメインを言う。タンパク質がこのようなドメインに結合する能力により、そのタンパク質は機能を果たすことができる。例えば、CD20分子、本発明の抗体に結合後に脂質ラフトに転位すると、高密度のCD20抗原-抗体複合体が細胞膜に生じる。このような高密度のCD20抗原-抗体複合体により、CDC中の補体形の効率的な活性化が可能となる。

20

【0041】

ここで用いられる場合の用語「抗体」とは、全抗体及びそのいずれかの抗原の結合フラグメント(即ち「抗原結合部分」)又は一本鎖を包含するものである。「抗体」とは、ジスルフィド結合により相互に接続された少なくとも2つの重(H)鎖及び2つの軽(L)鎖とを含む糖タンパク質を言う。各重鎖は、重鎖可変領域(ここでは V_H と省略する)及び重鎖定常領域とから成る。各軽鎖は、軽鎖可変領域(ここでは V_L と省略する)及び軽鎖定常領域とから成る。前記 V_H 及び V_L 領域はさらに、より保存されたフレームワーク領域(FR)と呼ばれる領域に散在する相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変領域に小さく分割することができる。各 V_H 及び V_L は、3つのCDR及び4つのFRが、以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端まで並んだものから成る。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫系の多種の細胞(例えばエフェクタ細胞)や伝統的補体系の第一コンポーネント(C1q)を含む宿主組織又は因子への免疫グロブリンの結合を媒介しているようである。

30

【0042】

抗体の「抗原結合部分」(又は単に「抗体部分」)という用語は、ここで用いる場合、抗体のうちで、抗原(例えばCD20)に対する特異的結合能を維持した1つ以上のフラグメントを言う。抗体の抗原結合機能は完全長抗体のうちの数フラグメントに行わせることができることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に包含される結合フラグメントの例には、(i) V_L 、 V_H 、 C_L 及び C_{H1} ドメインから成る一価のフラグメントであるFabフラグメント; (ii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された2つのFabフラグメントから成る二価のフラグメントであるF(ab')₂フラグメント; (iii) V_H 及び C_{H1} ドメインから成るFdフラグメント; (iv)抗体の一本のアームの V_L 及び V_H ドメインから成るFvフラグメント; (v) V_H ドメインから成るdAbフラグメント(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546); 及び(vi)単離された相補性決定領域(CDR)、及び(vii)選択的に合成のリンカで接合してもよい2つ以上の単離されたCDRの組合せ、がある。さらに、Fvフラグメントの2つのドメイン V_L 及び V_H は別々の遺伝子にコードされているが、これらは、 V_L 及び V_H 領域が対を成して一価の分子を形成するような一個のタンパク質鎖に

40

50

作製できるようにする合成リンカーにより、組換え法を用いて接合することができる（一本鎖Fv (scFv) として知られる；例えば Bird et al. (1988) Science 242:423-426; and Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照されたい）。このような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に包含されるものと、意図されている。これらの抗体フラグメントは、当業者に公知の従来技術を用いて得られ、それらのフラグメントを、インタクト抗体と同じ態様で実用性についてスクリーニングされている。更なる例は、(i) 免疫グロブリンヒンジ領域ポリペプチドに融合した結合ドメインポリペプチド、(ii) ヒンジ領域に融合した免疫グロブリン重鎖CH2定常領域、及び(iii) CH2定常領域に融合した免疫グロブリン重鎖CH3定常領域、を含め結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質である。結合ドメインポリペプチドは重鎖可変領域でも、又は軽鎖可変領域でもよい。前記結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質は、さらに、US 2003/0118592 及びUS 2003/0133939に開示されている。これらの抗体フラグメントを、当業者に公知の従来技術を用いて得、それらのフラグメントを、インタクト抗体と同じ態様で実用性の点でふるいにかける。

10

20

30

40

50

【0043】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合できるタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸又は糖側鎖などの化学的に活性な表面分子群から成り、通常は特異的な三次元構造上の特徴や、特異的な電荷上の特徴を有する。コンホメーション的及び非コンホメーション的エピトープは、変性溶媒の存在下では前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないことで区別される。

【0044】

用語「不連続なエピトープ」とは、ここで用いられる場合、あるタンパク質の一次配列中の少なくとも2つの別々の領域から形成される、このタンパク質抗原上のコンホメーション的エピトープを意味する。

【0045】

用語「二重特異的分子」は、2つの異なる結合特異性部分を有する、例えばタンパク質、ペプチド、又はタンパク質もしくはペプチド複合体など、あらゆる作用物質を包含することを意図している。例えば当該分子は、(a) 細胞表面抗原及び(b) エフェクタ細胞の表面上のFc受容体、に結合又は相互作用してもよい。用語「多重特異的分子」又は「ヘテロ特異的分子」は、3つ以上の異なる結合特異性部分を有する、例えばタンパク質、ペプチド、又はタンパク質もしくはペプチド複合体など、あらゆる作用物質を包含することを意図している。例えば当該分子は、(a) 細胞表面抗原、(b) エフェクタ細胞の表面上のFc受容体、及び(c) 少なくとも一つの他の成分、に結合又は相互作用してもよい。従って本発明は、限定はしないが、CD20などの細胞表面抗原を狙った、そしてエフェクタ細胞上のFc受容体などの他の標的を狙った二重特異的、三重特異的、四重特異的、及び他の多重特異的分子を包含する。

【0046】

用語「二重特異抗体」はジアボディも含む。ジアボディは V_H 及び V_L ドメインが一個のポリペプチド鎖上に発現しているが、この同じ鎖上の2つのドメインの間で対を成すには短すぎるリンカを用いることで、これらドメインを別の鎖の相補ドメインと対を成させて、2つの抗原結合部位を生じるようにした二価の二重特異的抗体である

(例えばHolliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123)。

【0047】

用語「ヒト抗体誘導体」とは、例えば抗体と別の作用物質又抗体との結合体など、当該抗体のいずれかの改変形を言う。

【0048】

ここで用いられる、あるヒト抗体がある特定の生殖細胞系配列を「由来とする」とは、この抗体がヒト免疫グロブリン配列を用いたある形から、例えばヒト免疫グロブリン遺伝子を持つトランスジェニック・マウスを免疫したり、あるいは、ヒト免疫グロブリン遺伝子

ライブラリをスクリーニングするなどにより、得られた場合であり、但しこの場合、当該の所定のヒト抗体は、生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子にコードされたアミノ酸配列に対し、アミノ酸配列において少なくとも90%、より好ましくは少なくとも95%、さらにより好ましくは少なくとも96%、97%、98%、又は99%、同一である。典型的には、ある特定のヒト生殖細胞系配列を由来とするヒト抗体は、この生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子にコードされたアミノ酸配列に対して10個以下のアミノ酸の違い、より好ましくは5個以下、又はさらにより好ましくは4個以下、3個以下、2個以下、又は1個以下のアミノ酸の違いを示すであろう。

【0049】

ここで用いられる場合の用語「ヘテロ抗体」とは、そのうちの少なくとも2つが異なる特異性部分を有するような、一緒に連結された2つ以上の抗体、その誘導体又は抗原血業領域を言う。これらの異なる特異性部分には、エフェクタ細胞上のFc受容体に対する結合特異性部分と、腫瘍細胞などの標的細胞上の抗原又はエピトープに対する結合特異性部分とが含まれる。

10

【0050】

用語「ヒト抗体」は、ここで用いられる場合、ヒト生殖細胞免疫グロブリン配列を由来とする可変及び定常領域を有する抗体を包含するものと、意図されている。本発明のヒト抗体には、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列にコードされていないアミノ酸残基が含まれていてもよい（例えばin vitroでのランダムもしくは部位特異的変異誘発法、又は、in vivoでの体細胞変異法による）。しかしながら、用語「ヒト抗体」は、ここで用いられる場合、マウスなどの別の哺乳動物種を由来とするCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植されているような抗体を包含するものとは意図されていない。

20

【0051】

ここで用いる用語「モノクローナル抗体」又は「モノクローナル抗体組成物」とは、単一の分子組成から成る抗体分子の製剤を言う。モノクローナル抗体組成物は単一の結合特異性及び親和性を特定のエピトープに対して示す。従って、用語「ヒトモノクローナル抗体」とは、単一の結合特異性を示すと共に、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を由来とする可変領域及び定常領域を有するような抗体を言う。ある実施態様では、本ヒトモノクローナル抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する、トランスジェニック・マウスなどの非ヒトトランスジェニックもしくはトランスクロモゾマル動物から得たB細胞を、不死化細胞に融合させて含むハイブリドーマにより産生される。

30

【0052】

用語「組換えヒト抗体」は、ここで用いられる場合、組換え手段により調製された、発現した、創出された又は単離されたあらゆる抗体を包含し、例えば(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子についてトランスジェニック又はトランスクロモゾマルの動物（例えばマウス）又はそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体（下の項Iにさらに解説する）、(b)例えばトランスフェクターマなど、当該抗体を発現するように形質転換された宿主細胞から単離された抗体、(c)組換えの、コンビナトリアル・ヒト抗体ライブラリから単離された抗体、及び(d)ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングが関与するいずれかの他の手段により調製された、発現した、創出された又は単離された抗体、である。このような組換えヒト抗体は、ヒト生殖細胞系免疫グロブリン配列を由来とする可変及び定常領域を有する。しかしながら、いくつかの実施態様では、このような組換えヒト抗体に、in vitro 変異誘発を行って（又はヒトIg配列にういてトランスジェニックな動物を用いる場合は in vivo 体細胞変異誘発を行って）、組換え抗体のV_H 及びV_L 領域のアミノ酸配列が、ヒト生殖細胞系V_H 及びV_L 配列を由来とする及び関連しながらも、in vivoヒト抗体生殖細胞系レポーター内には天然では存在しないであろう配列にすることができる。

40

【0053】

用語「トランスフェクターマ」は、ここで用いる場合、例えばCHO細胞、NS/O細胞、HEK293細胞、植物細胞、又は酵母細胞を含む真菌など、本抗体を発現する組換え真核性宿主

50

細胞を包含する。

【0054】

ここで用いる場合の「異種抗体」は、このような抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物との関連から定義される。この用語は、非ヒトトランスジェニック動物を構成しない生物に見られるものに相当するアミノ酸配列又はコーディング核酸配列を有する抗体であって、一般的には非ヒトトランスジェニック動物のそれ以外の種を由来とする抗体を言う。

【0055】

ここで用いられる「ヘテロハイブリッド抗体」とは、異なる生物由来の軽鎖及び重鎖を有する抗体を言う。例えば、ヒト重鎖をマウス軽鎖に結合させて有する抗体がヘテロハイブリッド抗体である。ヘテロハイブリッド抗体の例には、上に解説したキメラ抗体及びヒト化抗体がある。

10

【0056】

ここで用いる「単離された抗体」とは、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を言うものと、意図されている（例えばCD20に特異的に結合する単離された抗体は、CD20以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかしながら、ヒトCD20のエピトープ、アイソフォーム又はバリエーションに特異的に結合する単離された抗体であれば、例えば他の種由来など（例えばCD20の種相同体）、他の関連する抗原に対して交差反応性を有するであろう。さらに、単離された抗体は、他の細胞物質及び/又は化学物質を実質的に含まないであろう。本発明のある実施態様では、異なる特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組合せを、良く定義された組成で組み合わせる。

20

【0057】

ここで用いる「特異的結合」とは、所定の抗原への抗体の結合を言う。典型的には、本抗体は約 $1 \times 10^7 M^{-1}$ の以下の K_D に相当する親和性で結合し、所定の抗原に対しては、前記所定の抗原又は関係の近い抗原以外の非特異的な抗原（例えばBSA、カゼイン）に対するその結合親和性よりも少なくとも2倍高い K_D に相当する親和性で結合する。文言「抗原を認識する抗体」及び「抗原に特異的な抗体」はここでは用語「抗原に特異的に結合する抗体」と交換可能に用いられている。

【0058】

ここで用いられる用語「 k_d 」 (sec^{-1})とは、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離速度定数を言うものと、意図されている。前記数値は、 k_{off} 値とも言及される。

30

【0059】

ここで用いられる用語「 k_a 」 ($M^{-1} \times sec^{-1}$)とは、特定の抗体 - 抗原相互作用の結合速度定数を言うものと、意図されている。

【0060】

ここで用いる用語「 K_D 」 (M)とは、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離平衡定数を言うものと、意図されている。

【0061】

ここで用いる用語「 K_A 」 (M^{-1})とは、特定の抗体 - 抗原相互作用の結合平衡定数を言うものと、意図されており、 k_a を k_d で除算することにより得られる。

40

【0062】

ここで用いられる「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子にコードされた抗体クラス（例えばIgM又はIgG1）を言う。

【0063】

ここで用いる「アイソタイプ・スイッチング」とは、抗体のクラス、又はアイソタイプ、があるIgクラスから他のIgクラスのうちの一つに変化する現象を言う。

【0064】

ここで用いる「スイッチングのないアイソタイプ」とは、アイソタイプ・スイッチングが起きないときに産生される重鎖のアイソタイプ・クラスを言い、スイッチングのないアイソタイプをコードするCH遺伝子は、典型的には、機能上の再編成の起きるVDJ遺伝子のす

50

即ち、当該ヌクレオチド配列にコードされた、又は、当該アミノ酸配列を含有する、抗体の結合特性に有意に影響しない又は変化させないようなヌクレオチド及びアミノ酸配列改変を包含する。このような保存的配列改変には、ヌクレオチド及びアミノ酸の置換、付加及び欠失、がある。また、例えば部位指定変位誘発法及びPCR媒介変異誘発法など、当業で公知の標準的な技術によっても、配列番号1 - 30に改変を導入することができる。保存的アミノ酸置換には、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されるものが含まれる。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが当業で定義されている。これらのファミリーには、塩基性の側鎖を持つアミノ酸（例えばリジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性の側鎖を持つアミノ酸（例えばアスパラギン酸、グルタミン酸）、無電荷の極性側鎖を持つアミノ酸（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性の側鎖を持つアミノ酸（例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分枝側鎖を持つアミノ酸（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖を持つアミノ酸（例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）、がある。このように、ヒト抗CD20抗体の中で予測される重要でないアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基に置換することが好ましい。

10

【0073】

さらに本発明は、前記のアミノ酸残基のうちの1つ以上が、前記アミノ酸配列を含有する抗体の結合特徴に大きく影響する又は変えることなく、アシル化又は糖付加などにより誘導体化されているような、配列番号1 - 30に記載した通りのアミノ酸配列の「誘導体」や、その保存的配列改変も包含する。

20

【0074】

さらに本発明は、本抗体の機能的又は薬物動態上の特性を変えるために、Fc領域中に変更が行ってある抗体も包含する。このような変更の結果、C1qの結合やCDCの減少又は増加、あるいは、Fc Rの結合及びADCCの減少又は増加がもたらされるであろう。置換を、例えば、重鎖定常領域の位置234、235、236、237、297、318、320及び322のアミノ酸残基の1つ以上で行うことで、未改変の抗体に比較して抗原への結合能を維持したままエフェクタ機能を変えることができる。US 5,624,821 及びUS 5,648,260を参照されたい。

【0075】

本抗体のin vivo半減期を、当該のIg定常ドメイン又はIg様定常ドメインのサルベージ受容体エピトープを改変することで、当該分子がインタクトCH2ドメイン又はインタクトIg Fc領域を含まないようにしても、向上させることもできる。US 6,121,022 及びUS 6,194,551を参照されたい。in vivo 半減期はさらに、例えば位置252のスレオニンをロイシンに置換したり、位置254のスレオニンをセリンに置換したり、あるいは位置256のスレオニンをフェニルアラニンに置換するなど、Fc領域で変異を起こさせることで、増加させることができる。US 6,277,375を参照されたい。

30

【0076】

さらに、本抗体のエフェクタ機能を変えるために、本抗体の糖付加パターンを改変することができる。例えば、Fc領域の位置297のAsnに通常付着させられるフコース単位を加えないトランスフェクターマで本抗体を発現させることができ、それによりFc RIIIに対するFc領域の親和性が高まり、ひいては、NK細胞の存在下での本抗体のADCCが増加するであろうShield et al. (2002) JBC, 277:26733を参照されたい。さらに、糖付加の改変はCDCを改変するためにも行うことができる。

40

【0077】

代替的には、別の実施態様では、飽和変異誘発法などにより、抗CD20抗体コーディング配列の全部又は一部にわたって変異をランダムに導入することができ、その結果得られる改変された抗CD20抗体を結合活性についてふるいわけすることができる。

【0078】

従って、ここで開示された（重鎖及び軽鎖可変領域）ヌクレオチド配列にコードされた、及び/又は、ここに開示された（即ち、配列番号1 - 30）（重鎖及び軽鎖可変領域）ア

50

ミノ酸配列を含有する、抗体には、保存的に改変された同様な配列にコードされているか、又は、含有する、実質的に同様な抗体が含まれる。このような実質的に同様な抗体を配列番号1 - 30としてここに開示された部分的（即ち重鎖及び軽鎖可変領域）配列に基づいてどのように作製できるかに関する更なる議論を、以下に提供する。

【0079】

核酸の場合、用語「実質的な相同性」は、最適にアライメントして比較した場合の2つの核酸又はそのうちの指示した配列が、適当なヌクレオチド挿入又は欠失がありながらも、ヌクレオチドの少なくとも約80%、通常はヌクレオチドの少なくとも約90%乃至95%、そしてより好ましくは少なくとも約98%乃至99.5%、同一であることを指すものである。代替的には、数セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下で当該鎖の相補配列にハイブリダイズするとき、実質的な相同性が存在することとする。

10

【0080】

ヌクレオチド及びアミノ酸配列の場合、用語「相同性」は、適当な挿入又は欠失に対して最適にアライメント及び比較したときに、2つの核酸又はアミノ酸配列同士の間の一性の程度を指す。代替的には、数DNAセグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下で当該鎖の相補配列にハイブリダイズするとき、実質的な相同性が存在することとする。

【0081】

二つの配列間のパーセント同一性は、これら二つの配列を最適にアライメントするのに導入せねばならないギャップの数、及び各ギャップの長さを考慮に入れたときの、これら配列に共通の同一位置の数の関数である（即ち、%相同性 = 同一位置の数 / 位置の総数 × 100）。二つの配列間の配列の比較及びパーセント同一性の決定は、以下の非限定的な例に解説するように、数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。

20

【0082】

二つのヌクレオチド間のパーセント同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ (<http://www.gcg.com>で入手できる) のGAPプログラムを用い、NWSgapdna.CMP 行列を用いて、ギャップ・ウェイトを40、50、60、70、又は80にし、そしてレンジス・ウェイトを1、2、3、4、5、又は6にして決定することができる。二つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間のパーセント同一性はまた、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれた E. マイヤース及びW. ミラーのアルゴリズム (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)) を用い、PAM120 ウェイト残基表を用いて、ギャップ・レンジス・ペナルティを12、そしてギャップ・ペナルティを4にして、決定することもできる。さらに、二つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェア・パッケージ (<http://www.gcg.com>で入手できる) のGAPプログラムに組み込まれたニードルマン及びワンシュ (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) のアルゴリズムを用い、Blossum 62 行列又はPAM250行列のいずれかを用いて、ギャップ・ウェイトを16、14、12、10、8、6、又は4にし、レンジス・ウェイトを1、2、3、4、5、又は6にして、決定することができる。

30

【0083】

さらに本発明の核酸及びタンパク質の配列を「クエリー配列」として利用して、公開データベースの検索を行って、例えば関連する配列を同定することなどができる。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLAST 及びXBLASTプログラム（バージョン2.0）を利用すれば行える。BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラムを用い、スコア= 100、ワード長= 12にして行くと、本発明の核酸分子に相同なヌクレオチド配列を得ることができる。BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラムを用い、スコア= 50、ワード長= 3にして行くと、本発明のタンパク質分子に相同なアミノ酸配列を得ることができる。比較を目的としてギャップのあるアライメントを行うには、Gapped BLAST をAltschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402が解説する通りに利用できる。BLAST及びギャップドBLASTプログラムを利用する場合、各プログラムの（例えばXBLAST 及びNBLAST）のデフォルト・パラメータを利用できる。<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> を参照されたい。

40

【0084】

50

当該核酸は全細胞中であっても、細胞ライセート中であっても、又は部分的に精製されたもしくは実質的に純粋な形で存在してもよい。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラム・クロマトグラフィ、アガロースゲル電気泳動法、及び当業で公知の他の技術を含む標準的な技術により、例えば他の細胞内核酸又はタンパク質など、他の細胞成分又は他の混入物質を取り除いて精製されている場合に、「分離されている」又は「実質的に純粋である」ことになる。F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照されたい。

【0085】

cDNA、ゲノム又は混合物由来である本発明の核酸組成物は、しばしば天然配列（改変された制限部位等を除き）のままであり、遺伝子配列を提供する標準的技術に従って変異させてもよい。コーディング配列の場合、これらの変異は、必要に応じアミノ酸配列を左右するものでもよい。具体的には、ここで解説した天然V、D、J、定常、スイッチ及び他のこのような配列に実質的に相同又は由来とするDNA配列が考えられる（「由来する」が、ある配列が別の配列と同一か、もしくは別の配列から改変されていることを指す場合）。

【0086】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に置かれたときに「作動的に連結された」ことになる。例えば、あるプロモータ又はエンハンサが、あるコーディング配列の転写を左右するのであれば、その配列に作動的に連結されていることになる。転写制御配列に関する場合、作動的に連結されたとは、連結しようとするDNA配列が連続していることを意味し、また2つのタンパク質コーディング領域を接合するために必要な場合には、連続し、かつ読み取り枠内にあることを意味する。スイッチ配列の場合には、作動的に連結された、とは、当該配列がスイッチ組換えを起こし得ることを指す。

【0087】

ここで用いる用語「ベクタ」とは、連結された先の別の核酸を輸送できる核酸分子を言うものと、意図されている。ベクタの一種が、付加的なDNAセグメントを連結できる環状の二本鎖DNAループを言う「プラスミド」である。ベクタのもう一つの種類がウィルスベクタであり、この場合、付加的なDNAセグメントは、ウィルスゲノム内に連結させることができる。いくつかのベクタは導入された先の宿主細胞内で自律的複製が可能である（例えば細菌由来の複製開始点を有する細菌ベクタや、エピソームほ乳類ベクタなど）。他のベクタ（例えば非エピソームほ乳類ベクタなど）は、宿主細胞に導入されるや、宿主細胞のゲノムに組み込まれるため、宿主ゲノムと一緒に複製される。さらに、いくつかのベクタは、作動的に連結された先の遺伝子の発現を命令することができる。このようなベクタをここでは「組換え発現ベクタ」（又は単に「発現ベクタ」と呼ぶ。一般的に、組換えDNA技術で実用性のある発現ベクタは、しばしばプラスミドの形である。本明細書では、プラスミドが最も普通に用いられている形のベクタであるため、「プラスミド」及び「ベクタ」を交換可能に用いている場合がある。しかしながら、本発明には、例えばウィルスベクタ（例えば複製欠陥レトロウィルス、アデノウィルス及びアデノ随伴ウィルス）など、同等の機能を果たす他の形のこのような発現ベクタも包含されることが、意図されている。

【0088】

ここで用いる用語「組換え宿主細胞（又は単に「宿主細胞」）」とは、組換え発現ベクタが導入された細胞を言うものと、意図されている。このような用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の後代も言うものと意図されていることは、理解されねばならない。突然変異又は環境による影響が原因で、特定の改変が継代に起きる場合があるため、このような後代は実際には親細胞と同一でないかも知れないが、それでも尚、ここで用いる用語「宿主細胞」の範囲内に含まれる。組換え宿主細胞には、例えば、CHO細胞、NS/O細胞及びリンパ球がある。

【0089】

ここで用いられる場合の用語「対象」には、あらゆるヒト又は非ヒトの動物が含まれる。

用語「非ヒト動物」には、例えばヒト以外の霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、は虫類等、ほ乳類及び非ほ乳類などのあらゆる脊椎動物が含まれる。

【0090】

用語「トランスジェニックの非ヒト動物」とは、一つ以上のヒト重鎖及び／又は軽鎖導入遺伝子又はトランスクロモソームを（その動物の天然のゲノムDNAに組み込ませて又は組み込ませずに）含むゲノムを有すると共に、完全ヒト抗体を発現することのできる非ヒト動物を言う。例えば、トランスジェニック・マウスは、当該マウスがCD20抗原及び／又はCD20発現細胞で免疫されたときにヒト抗CD20抗体を産生するように、ヒト軽鎖導入遺伝子と、ヒト重鎖導入遺伝子又はヒト重鎖トランスクロモソームとを有することができる。該ヒト重鎖導入遺伝子はマウスの染色体DNAに、例えばHCo7又はHCo12マウスなどのHuMAbマウスなどのトランスジェニックの場合と同様に組み込むことができ、あるいは、当該のヒト重鎖導入遺伝子を、WO 02/43478に解説された通りのトランスクロモソーマル（例えばKM）・マウスの場合と同様に染色体外に維持することもできる。このようなトランスジェニック及びトランスクロモソーマル・マウスは、V-D-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、CD20に対して複数のアイソタイプ（例えばIgG、IgA及び／又はIgE）のヒトモノクローナル抗体を産生することができる。

10

【0091】

本発明の多様な局面を以下の小項でさらに詳述する。

【0092】

20

I. CD20に対するヒト抗体の作製

本発明のモノクローナル抗体は、従来モノクローナル抗体法、例えばKohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術など、を含む多様な技術により作製できる。体細胞ハイブリダイゼーション法が基本的には好適であるが、モノクローナル抗体を作製する他の技術、例えばBリンパ球のウィルス又は腫瘍形成性形質転換や、ヒト抗体遺伝子のライブラリを用いたファージ・ディスプレイ技術など、も利用できる。

【0093】

ヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製するための好適な動物系はマウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ作製は大変よく確立された手法である。融合用の免疫化脾細胞の免疫プロトコル及び単離のための技術は当業で公知である。融合相手（例えばマウス骨髄腫細胞）及び融合法も公知である。

30

【0094】

ある好適な実施態様では、CD20を狙ったヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を持つトランスジェニックもしくはトランスクロモソーマル・マウスを用いて作製できる。これらのトランスジェニック及びトランスクロモソーマル・マウスには、ここでそれぞれHuMAbマウス及びKMマウスと呼ばれるマウスが含まれ、まとめてここでは「トランスジェニック・マウス」とよばれる。

【0095】

HuMAbマウスは、再編成していないヒト重鎖（ μ 及び δ ）及び軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子最小遺伝子座を、内因性の μ 及び δ 鎖遺伝子座を不活性化する標的設定された変異と一緒に含有する（Lonberg, N. et al. (1994) *Nature* 368 (6474): 856-859）。従って、当該マウスは低いマウスIgM又は δ 鎖発現を示し、免疫処理に応答して、導入されたヒト重鎖及び軽鎖導入遺伝子がクラス・スイッチング及び体細胞変異を起こして高親和ヒトIgGモノクローナル抗体を産生する（上記のLonberg, N. et al. (1994); Lonberg, N. (1994) *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101にレビュー; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13: 65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. (1995) *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764: 536-546)。HuMAbマウスの調製はTaylor, L. et al. (1992) *Nucleic Acids Research* 20:6287-6295; Chen, J. et al (1993) *International Immunology* 5: 647-656; Tuaille et al. (199

40

50

4) J. Immunol.152:2912-2920; Lonberg et al., (1994) Nature 368(6474): 856-859; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. Vol.13:65-93; Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci 764:536-546; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に詳述されている。さらに、すべてLonberg 及びKayのUS Nos. 5,545,806 ; 5,569,825 ; 5,625,126 ; 5,633,425 ; 5,789,650 ; 5,877,397 ; 5,661,016 ; 5,814,318 ; 5,874,299 ; 及び5,770,429や、 Surani らのUS 5,545,807 ; WO 98/24884、WO 94/25585、WO 93/1227、WO 92/22645、WO 92/03918 及びWO 01/09187も参照されたい。

【 0 0 9 6 】

KMマウスは、ヒト重鎖トランスクロモソーム及びヒトカップ軽鎖導入遺伝子を含む。さらにKMマウスにおいては、内因性のマウス重鎖及び軽鎖遺伝子は、このマウスを免疫すると、マウス免疫グロブリンではなくヒト免疫グロブリンが産生するように、破壊されている。KMマウスの作製やそれらを用いてヒト免疫グロブリンを産生させる方法は、WO 02/43478に詳述されている。

【 0 0 9 7 】

免疫処理

CD20に対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製するためには、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックもしくはトランスクロモソーマル・マウス（例えばHCo12、HCo7又はKMマウス）を、上記のLonberg, N. et al. (1994) 上記のFishwild, D. et al. (1996) 及び WO 98/24884に解説されたようにCD20抗原の濃縮製剤及び/又はCD20発現細胞で免疫することができる。代替的には、マウスをヒトCD20をコードするDNAでめんえきすることができる。好ましくは、当該マウスは1回目の輸注時に6乃至16週齢であるとよい。例えば、CD20抗原の濃縮製剤（5乃至50 μ g）を用いて、HuMAbマウスを腹腔内により免疫することができる。CD20抗原の精製もしくは濃縮製剤を用いた免疫処置でも抗体が生じない場合、細胞株など、CD20発現細胞でマウスを免疫して、免疫応答を促進することもできる。

【 0 0 9 8 】

多様な抗原を用いて蓄積した経験では、HuMAbトランスジェニックマウスは、まずCD20発現細胞を完全フロイント・アジュバントに入れて腹腔内（IP）又は皮下（SC）免疫し、その後PBSにCD20発現細胞を入れて1週置きに（最高で合計10回）IP免疫処置したときに最も良く応答することが示された。免疫応答は、眼窩後方の採血で得た血漿試料で、免疫プロトコルの経過にわたって観察することができる。血漿はFACS分析（以下に解説するように）でスクリーニングすることができ、十分な抗体価の抗CD20ヒト免疫グロブリンを持つマウスを融合に用いることができる。マウスは、と殺及び脾臓の摘出から3日前にCD20発現細胞を静注して追加免疫することができる。各抗原について2乃至3回の輸注を行う必要があるだろうと予測される。

【 0 0 9 9 】

CD20に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

CD20に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するには、免疫後のマウスから脾細胞及びリンパ節細胞を単離し、マウス骨髄腫細胞株などの適した不死化細胞株に融合させることができる。こうして出来たハイブリドーマを次に、抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングすることができる。例えば免疫されたマウス由来の脾臓リンパ球の単個細胞懸濁液を、50%PEGで、P3X63-Ag8.653非分泌性マウス骨髄腫細胞（ATCC, CRL 1580）の数の6分の1に融合させることができる。細胞を平底の微量定量プレートに約 2×10^5 になるようにプレートし、20%ウシクローン血清、18%「653」調整培地、5%オリゲン（IGEN社）、4 mM L-グルタミン、1 mM L-グルタミン、1 mM ビルビン酸ナトリウム、5mM HEPPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50 単位/ml ペニシリン、50 mg/ml ストレプトマイシン、50 mg/ml ゲンタマイシン及び1 \times HAT（シグマ社；HATは輸注から24時間後に加える）を含む選択培地で2週間インキュベートする。ほぼ2週間後、HA

10

20

30

40

50

TをHTに取り替えた培地で細胞を培養する。次に個々のウェルをELISAによりヒトカップパ軽鎖含有抗体について、そしてFACS分析によりCD20発現細胞を用いてCD20特異性についてスクリーニングすることができる。広汎なハイブリドーマ成長が起きたら培地を通常10乃至14日後に観察する。抗体を分泌しているハイブリドーマを再度プレートし、再度スクリーニングし、ヒトIgGについてまだ尚陽性であれば、高CD20モノクローナル抗体を限界希釈により少なくとも2回、サブクロニングすることができる。次に安定なサブクローンをin vitroで培養して、少量の抗体を組織培養培地中に生じさせ、特徴付けに向ける。

【0100】

CD20に対するヒトモノクローナル抗体を産生するトランスフェクターマの作製

本発明のヒト抗体は、当業で公知のように、組換えDNA技術及び遺伝子トランスフェクション法の組合せなどを用いて、宿主細胞トランスフェクターマで作製することもできる (Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

10

【0101】

例えばある実施態様では、ヒト抗体遺伝子などの目的の遺伝子を、WO 87/04462、WO 89/01036 及びEP 338 841 に開示されたGS遺伝子発現系又は当業で公知の他の発現系で用いられるものなど、真核性発現プラスミドなどの発現ベクタ内に連結することができる。クローニングされた抗体遺伝子を持つ精製済みのプラスミドは、CHO細胞、NS/O細胞又はHEK293細胞などの真核性宿主細胞や、あるいは代替的には、植物由来細胞、真菌もしくは酵母細胞のような他の真核細胞に導入することができる。これらの遺伝子を導入するために用いられる方法は、エレクトロポレーション、リポフェクチン、リポフェクタミン又は他のものなど、当業で解説された方法であってよいであろう。これらの抗体遺伝子を宿主細胞に導入後、本抗体を発現している細胞を特定し、選抜することができる。これらの細胞は、その後それらの発現レベルを増幅させ、グレードアップして抗体を産生させることのできるトランスフェクターマである。組換え抗体は、これらの培養上清及び/又は細胞から単離及び精製することができる。

20

【0102】

CD20に対するヒトモノクローナル抗体を作製する更なる組換え手段

代替的には、クローニングされた抗体遺伝子を、E. coliなどの微生物など、原核細胞を含む他の発現系で発現させて、一本鎖Fv抗体、藻類や昆虫細胞を作製することができる。さらに、本抗体は、ヒツジ及びウサギからの乳中に、又は、ニワトリの卵中に、又はトランスジェニック植物中になど、非ヒトトランスジェニック動物中に産生させることができる。例えばVerma, R., et al. (1998). Antibody engineering: Comparison of bacterial, yeast, insect

30

and mammalian expression systems. J. Immunol. Meth. 216:165-181; Pollock, et al. (1999). Transgenic milk as a method for the production of recombinant antibodies. J. Immunol. Meth. 231:147-157; 及びFischer, R., et al. (1999). Molecular farming of recombinant antibodies in plants. Biol. Chem. 380:825-839を参照されたい。

【0103】

インタクト抗体を発現させるための部分的抗体配列の使用

抗体は、標的抗原と、主に6番目の重鎖及び軽鎖相補性決定領域(CDR)に位置するアミノ酸残基を通じて相互作用する。このために、CDR内のアミノ酸配列は、CDRの外側のアミノ酸配列よりも個々の抗体間で多様である。CDR配列は大半の抗体-抗原相互作用を担っているため、特定の天然発生型抗体由来のCDR配列を、異なる特性を持つ異なる抗体由来のフレームワーク領域内に移植した形で含有する発現ベクタを構築することにより、特定の天然発生型抗体の特性を模倣した組換え抗体を発現させることが可能である(例えばReichmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones,

40

P. et al. (1986) Nature 321:522-525; 及びQueen, C. et al. (1989) Proc.

Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033を参照されたい)。このようなフレームワーク配列は、生殖細胞系抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベースから得ることができる。これらの生殖細胞系配列は、B細胞成熟中のV(D)J接合により形成される、完全に集

50

合した可変遺伝子を含まないこととなるため、成熟抗体遺伝子配列とは異なるであろう。生殖細胞遺伝子配列はまた、高親和二次レパートリ抗体の配列からも、可変領域全体にわたって個々に均一に異なるであろう。例えば、体細胞変異は、フレームワーク領域1のアミノ末端部分と、フレームワーク領域4のカルボキシ末端部分では、あまり頻繁には起きない。さらに、多くの体細胞変異は、本抗体の結合特性を大きくは変化させない。この理由で、もとの抗体のものと同一結合特性を有するインタクト組換え抗体を作り直すためにも、特定の抗体の全DNA配列を得る必要はない(WO 99/45962を参照されたい)。CDR領域にわたる部分的重鎖及び軽鎖配列があれば、この目的には充分であることが多い。この部分的配列を用いて、どの生殖細胞系可変及びジョイニング遺伝子セグメントが、組換えられた抗体可変遺伝子に寄与したかを決定する。次に、この生殖細胞系配列を用いて、可変領域の消失部分を充填する。重鎖及び軽鎖リーダ配列は、タンパク質の成熟中に切断されるため、最終的な抗体の特性には寄与しない。消失配列を加えるために、クローニングされたcDNA配列を合成オリゴヌクレオチドにライゲーション又はPCR増幅法により組み合わせることができる。代替的には、可変領域全体を、一組の短い、重複のあるオリゴヌクレオチドとして合成し、PCR増幅で組合せて、完全に合成の可変領域クローンを作製することもできる。このプロセスは、消失又は含有又は特性の制限部位や、あるいは、特定のコードンの最適化など、いくつかの長所を有する。

10

20

30

40

50

【0104】

ハイブリドーマからの重鎖及び軽鎖転写産物のヌクレオチド配列を用いて、重複した組の合成オリゴヌクレオチドをデザインして、天然配列と同一のアミノ酸コーディング能を持つ合成V配列を作製する。合成の重鎖及びカッパ鎖配列は天然の配列と3つの方法で異ならせることができる：オリゴヌクレオチド合成及びPCR増幅が容易に行われるように、反復したヌクレオチド配列の部分に中断を入れる；最適な翻訳開始部位をコザックの法則に従って取り入れる(Kozak, 1991, J. Biol. Chem. 266:19867-19870)；及びHindIII部位を、該翻訳開始部位の上流に操作する。

【0105】

重鎖及び軽鎖可変領域の両方について、最適化されたコーディング及び対応する非コーディング鎖配列を、対応する非コーディング・オリゴヌクレオチドのほぼ中間点で30乃至50ヌクレオチドに分断する。このように、各鎖につき、当該のオリゴヌクレオチドを、150乃至400ヌクレオチドのセグメントに渡す重複する二本鎖の組に組み立てることができる。次にこのプールをテンプレートして用いて、150乃至400ヌクレオチドのPCR増幅産物を作製する。典型的には、一個の可変領域オリゴヌクレオチドの組を2つのプールに分割し、これら2つのプールを別々に増幅して2つの重複するPCR産物を作製することになるであろう。次に、これらの重複する産物をPCR増幅により組み合わせ、完全な可変領域を形成する。さらに、このPCR増幅で、(カッパ軽鎖のBbsI部位、又は、ガンマ重鎖のAgeI部位を含む)重鎖又は軽鎖定常領域の重複するフラグメントを含有させて、発現ベクタ・コンストラクト内へ容易にクローニングすることのできるフラグメントを作製するのも好ましいであろう。

【0106】

次に、再構築された重鎖及び軽鎖可変領域を、クローニングされたプロモータ、リーダ配列、翻訳開始、定常領域、3'側非翻訳、ポリアダニレーション、及び転写終了、配列を組み合わせ、発現ベクタ・コンストラクトを形成する。該重鎖及び軽鎖発現コンストラクトは、組み合わせる単一のベクタにすることも、宿主細胞に同時トランスフェクト、順次トランスフェクト、又は別々のトランスフェクトしてから、この宿主細胞を融合させて、両方の鎖を発現する宿主細胞を形成することもできる。

【0107】

ヒトIgGのための発現ベクタの構築に用いるプラスミドを以下に解説する。当該のプラスミドは、PCR増幅後のV重鎖及びVカッパ軽鎖cDNA配列を用いて完全な重鎖及び軽鎖最小遺伝子を再構築できるように構築された。これらのプラスミドを用いると、完全ヒト、又はキメラIgG1、又はIgG4、抗体を発現させることができる。同様なプラスミドは、他

の重鎖アイソタイプの発現のためにも、又は、ラムダ軽鎖を含む抗体の発現のためにも、構築することができる。

【0108】

このように、本発明の別の局面では、発明のヒト抗CD20抗体、例えば11B8、2F2、又は7D8、の構造上の特徴を用いて、例えばCD20に結合するなど、本発明の抗体の少なくとも1つの機能特性を維持した構造上関連するヒト抗CD20抗体を創出する。より具体的には、2F2、7D8、又は11B8の1つ以上のCDR領域を組換えにより公知のヒト・フレームワーク領域及びCDRに組み合わせると、付加的な、組換え操作された本発明のヒト抗CD20抗体を創出することができる。

【0109】

従って、別の実施態様では、本発明は、抗体を調製するステップを含む、抗CD20抗体を調製する方法を提供し、本抗体は、(1)ヒト重鎖フレームワーク重鎖フレームワーク領域及びヒト重鎖CDRであって、但しこの場合前記ヒト重鎖CDRのうちの少なくとも1つが図53、55、又は57(又は配列番号13-15、19-21、又は25-27の相当するアミノ酸残基)に示されたCDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、ヒト重鎖フレームワーク重鎖フレームワーク領域及びヒト重鎖CDRと、(2)ヒト軽鎖フレームワーク領域及びヒト軽鎖CDRであって、但しこの場合、前記ヒト軽鎖CDRのうちの少なくとも1つが、図53、55、又は57(又は配列番号16-18、22-24、又は28-30の相当するアミノ酸残基)に示されたCDRのアミノ酸配列から選択されるアミノ酸配列を含む、ヒト軽鎖フレームワーク領域及びヒト軽鎖CDRと、を含み、;またこの場合、本抗体は、CD20への結合能を保持している。

【0110】

本抗体のCD20への結合能は、実施例に記載したものなど、標準的な結合検定法を用いて判定することができる(例えばFACS分析)。

【0111】

当技術分野において、抗体の重鎖及び軽鎖CDR3ドメインは、抗原に対する抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たすことが良く知られているため、上記に記載した通りに調製された本発明の組換え抗体は、好ましくは、2F2、7D8、又は11B8の重鎖及び軽鎖CDR3を含むとよい。本抗体は、さらに、2F2、7D8、又は11B8のCDR2を含むこともできる。本抗体は、さらに、2F2、7D8、又は11B8のCDR1を含むこともできる。従って、本発明は、さらに、(1)ヒト重鎖フレームワーク領域、ヒト重鎖CDR1領域、ヒト重鎖CDR2領域、及びヒト重鎖CDR3領域であって、但しこの場合、前記ヒト重鎖CDR3領域が、図53、55、又は57(又は配列番号15、21、又は27の相当するアミノ酸残基)に示された通りの2F2、7D8、又は11B8のCDR3である、ヒト重鎖フレームワーク領域、ヒト重鎖CDR1領域、ヒト重鎖CDR2領域、及びヒト重鎖CDR3領域と、(2)ヒト軽鎖フレームワーク領域、ヒト軽鎖CDR1領域、ヒト軽鎖CDR2領域、及びヒト軽鎖CDR3領域であって、但しこの場合、前記ヒト軽鎖CDR3領域が、図53、55、又は57(又は配列番号18、24、又は30に示された通りの相当するアミノ酸残基)に示された通りの2F2、7D8、又は11B8のCDR3である、ヒト軽鎖フレームワーク領域、ヒト軽鎖CDR1領域、ヒト軽鎖CDR2領域、及びヒト軽鎖CDR3領域、とを含み、但しCD20に結合する、抗CD20抗体を提供するものである。本抗体は、さらに、2F2、7D8、又は11B8の重鎖CDR2及び/又は軽鎖CDR2を含んでもよい。本抗体は、さらに2F2、7D8、又は11B8の重鎖CDR1及び/又は軽鎖CDR1を含んでもよい。

【0112】

好ましくは、上に解説された操作された抗体のCDR1、2、及び/又は3は、さらに、ここで開示された2F2、7D8、又は11B8のものと同じアミノ酸配列を含むとよい。しかしながら、当業者であれば、2F2、7D8、又は11B8の精確なCDR配列から何らかの逸脱があっても、CD20への本抗体の結合能が実際には維持されることがあることは理解されよう(例えば保存的置換)。従って、別の実施態様では、当該の操作された抗体は、2F2、7D8、又は11B8のうちの一つ以上のCDRに対して例えば90%、95%、98%又は99.5%同一である一つ以上のCDRから成っていてもよい。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 3 】

単にCD20に結合するだけでは、上に記載したものなどの操作された抗体は、例えば：

- (1) CD20からの低い解離速度；
 - (2) CD20への高親和結合；
 - (3) CD20上の固有のエピトープへの結合、及び/又は、CD20への特異的配向での結合、及び/又は、特異的な形のCD20への結合；
 - (4) CD55/59 陰性もしくはCD55/59陽性細胞上における高レベルのCDCの媒介；
 - (5) CD20への結合時の脂質ラフトへの転位；
 - (6) CD20を発現する細胞の成長の阻害；
 - (7) CD20を発現する細胞のアポトーシスの誘導；
 - (8) CD20を発現する細胞の同型接着の誘導；
 - (9) CD20を発現する腫瘍細胞を有する対象の生存率延長；
 - (10) 適したエフェクタ細胞と混合したときの、CD20標的のADCCの媒介；
 - (11) CD20を発現する細胞を枯渇させる能力；及び/又は
 - (12) 低レベルのCD20を発現する細胞 (CD20^{low}細胞) を枯渇させる能力；
- など、本発明の抗体の他の機能上の特性をそれらが保持しているかで、選抜されてもよい。

10

【 0 1 1 4 】

CD20に対するヒトモノクローナル抗体の結合の特徴付け

ヒト抗CD20抗体を精製するために、選抜されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製用の2リットル入りスピナ・フラスコで成長させることができる。上清を濾過し、濃縮してから、プロテインA - セファロース (IgG1アイソタイプ抗体の場合) (ニュージャージー州ピスカタウェイ、ファルマシア社)、あるいは、IgG3アイソタイプ抗体の場合は抗ヒトIgG被覆セファロース又はプロテインG - セファロースで、アフィニティ・クロマトグラフィすることができる。溶出したIgGをゲル電気泳動法及び高速液体クロマトグラフィでチェックして、純度を確認することができる。緩衝溶液をPBSに交換し、濃度は、OD₂₈₀により、1.43吸光係数を用いて判定することができる。本モノクローナル抗体をアリクオートし、-80℃で保存することができる。

20

【 0 1 1 5 】

選抜されたヒト抗CD20モノクローナル抗体が固有のエピトープに結合するかどうかを判定するには、部位指定もしくは多部位指定変異誘発法を用いることができる。

30

【 0 1 1 6 】

精製された抗体のアイソタイプを判定するには、アイソタイプELISAを行うことができる。微量定量プレートのウェルを10 µg/mlの抗ヒトIgGで、一晚、4℃で被覆することができる。5% BSAで遮断後、このプレートを10 µg/mlのモノクローナル抗体又は精製済みアイソタイプ・コントロールと、周囲温度で2時間、反応させる。次にこのウェルをヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4あるいはヒトIgM特異的アルカリホスファターゼ結合プローブのいずれかと反応させることができる。洗浄後、このプレートをpNPP基質 (1 mg/ml) で展開させ、OD of 405-650のODで分析する。

40

【 0 1 1 7 】

免疫済みマウスの血清中で抗CD20抗体の存在を実証したり、あるいは、CD20を発現する生存細胞へのモノクローナル抗体の結合を実証するには、フローサイトメトリを用いることができる。簡単に説明すると、CD20を発現する細胞株 (標準的な成長条件下で成長させたもの) を、0.1% BSA 及び0.02% アジ化ナトリウムを含有するPBSに入れた多様な濃度のモノクローナル抗体と混合し、4℃で30分間、インキュベートする。洗浄後、細胞を、フルオレセイン標識抗ヒトIgG抗体に、一次抗体染色と同じ条件下で反応させる。試料は、単個生存細胞に当たる光及び側光散乱特性を用いて、FACS装置でフローサイトメトリにより分析することができる。フローサイトメトリに (加えて、又は代わりに)、蛍光顕微鏡法を用いた代替的検定法を用いてもよい。細胞は、上述したのと全く同じ通りに染色することができ、蛍光顕微鏡法で調べることができる。この方法により、個々の細胞の観察が

50

可能となるが、抗原濃度によっては、感度が劣るであろう。

【0118】

抗CD20ヒトIgGは、さらに、ウェスタン・ブロット法でも、CD20抗原との反応性について、検査することができる。簡単に説明すると、CD20発現細胞からの細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウム（SDS）ポリアクリルアミドゲル電気泳動法を行うことができる。電気泳動後、分離した抗原をニトロセルロース・メンブレンに移し、20%マウス血清で遮断し、検査対象のモノクローナル抗体でプローブすることとなる。ヒトIgGの結合は、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを用いて検出することができ、BCIP/NBT 基質錠剤（ミズリー州セントルイス、シグマ・ケミカルズ社）で展開させることができる。

【0119】

CD20に対するヒトモノクローナル抗体の貪食及び細胞致死活性

CD20への特異的結合に加え、ヒトモノクローナル抗CD20抗体を、CD20発現細胞の貪食及び致死の媒介能についても、検査することができる。モノクローナル抗体活性の *in vitro* での検査は、*in vivo*モデルで検査を行う前の最初のスクリーニングとなるであろう。簡単に説明すると、健康なドナーからの多核白血球（PMN）、NK細胞、単球又は他のエフェクタ細胞をフィッコール・ハイパック密度遠心分離法で精製し、混入赤血球を溶解させることができる。洗浄後のPMNを、10% 熱不活化ウシ胎児血清を加えたRPMIに懸濁させ、⁵¹Crで標識したCD20発現細胞に、多様なエフェクタ細胞対腫瘍細胞の比率（エフェクタ細胞：腫瘍細胞）で加えることができる。次に、精製済みのヒト抗CD20 IgGs を多様な濃度で加えることができる。無関係のヒトIgGは陰性コントロールとして用いることができる。検定は、用いるエフェクタ細胞の種類に応じて、37℃ 4乃至20時間、行うことができる。試料は、培養上清中に遊離する⁵¹Crを測定することにより、細胞溶解について検定することができる。抗CD20モノクローナル抗体を組み合わせて検査して、細胞溶解が複数のモノクローナル抗体で促進されるかどうかを調べることもできる。

【0120】

CD20に結合するヒトモノクローナル抗体を *in vivo*モデル（例えばマウス）で検査して、CD20発現腫瘍細胞の成長を制御する上でのそれらの効果について調べることもできる。これらの抗体は、例えば、限定的なものと意図されてはいない以下の基準に基づいて選抜することができる：

1. CD20を発現する生存細胞への結合；
2. CD20からの低い解離速度；
3. CD20への高親和結合；
4. CD20上の固有のエピトープへの結合、及び/又は、CD20への特異的配向での結合、及び/又は、特異的な形のCD20への結合；
5. CD20発現細胞のオプソニン化；
6. ヒトエフェクタ細胞存在下でのCD20発現細胞の成長阻害、貪食及び/又は致死の媒介；
7. CD55/59 陰性もしくはCD55/59陽性細胞上におけるCDCの誘導能
8. 同型接着の誘導能；
9. CD20への結合時の脂質ラフトへの転位；
10. アポトーシスの誘導能；
11. CD20発現細胞上のADCCの媒介；
12. CD20を発現する細胞を枯渇させる能力；及び/又は
13. 低レベルのCD20を発現する細胞（CD20^{low}細胞）を枯渇させる能力。

【0121】

本発明の好適なヒトモノクローナル抗体は、これらの基準の一つ以上に合致するものである。

【0122】

ヒトモノクローナル抗CD20抗体は、それらのCDC媒介能について、多種の公知の技術を用いて検査することができる。例えば健康な対象の血液を遠心分離して補体用の血清を得、

10

20

30

40

50

採集することができる。多種のmAbのCDC活性を判定するために、様々な方法を用いることができる。例えば ^{51}Cr の遊離を測定することができ、あるいは、膜透過性の上昇を、ヨウ化プロピジウム (PI) 排除検定法を用いて評価することもできる。簡単に説明すると、標的細胞を洗浄し、RPMI-1% BSA 中に $1 \times 10^6/\text{ml}$ になるように再懸濁させることができる。多様な濃度のmAbをこの細胞に加えて、室温で10乃至15分間、結合させることができる。次に、血清を最終濃度20% (v/v)まで加え、細胞を37で45分間、インキュベートすることができる。各試料の細胞すべてをFACS試験管に入れたPI溶液に加えられる。その後この混合液をすぐに、FACScalibur フローサイトメータを用いたフローサイトメトリにより評価し、CellQuest プロ・ソフトウェア (カリフォルニア州マウンテン・ビュー、BDバイオサイエンセズ社) を用いて分析することができる。

10

【0123】

アポトーシスを開始させる能力について検査するには、例えばヒトモノクローナル抗CD20抗体をDaudiなどのCD20陽性腫瘍細胞と一緒に、37で約20時間、インキュベートすることができる。この細胞を採集し、アネキシン-V-FITC結合緩衝液 (BDバイオサイエンセズ社) 中で洗浄し、アネキシンV-FITC (BDバイオサイエンセズ社) で15分間、4の暗室で標識することができる。各試料からの全ての細胞をPI溶液 (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のPBS溶液) をFACS試験管内で加え、すぐにフローサイトメトリで (上述のように) 評価することができる。

【0124】

本発明のある特定の実施態様では、本ヒトモノクローナル抗体を、2つ以上の抗CD20モノクローナル抗体を含む医薬組成物などとして、組み合わせる。例えば、異なるが補完的な活性を有するヒト抗CD20モノクローナル抗体を、所望の治療もしくは診断効果を達成するために単一の治療法で組み合わせることができる。ある好適な実施態様では、当該の組成物は、CDCを媒介する抗CD20ヒトモノクローナル抗体を、アポトーシスを誘導する別のヒト抗CD20モノクローナル抗体と組み合わせる。別の実施態様では、当該の組成物は、エフェクタ細胞の存在下で標的細胞の効果の高い致死を媒介する抗CD20ヒトモノクローナル抗体を、CD20発現細胞の成長を阻害する別のヒト抗CD20モノクローナル抗体と組み合わせる。

20

【0125】

II. ヒトモノクローナル抗CD20抗体を産生する非ヒトトランスジェニック動物の作製
 さらに別の局面では、本発明は、CD20に特異的に結合するヒト抗体を発現することのできる、トランスジェニック又はトランスクロモソーマル・マウスなどの非ヒトトランスジェニック及びトランスクロモソーマル動物を提供するものである。ある具体的な実施態様では、本発明は、CD20発現細胞で免疫されたときに、当該のマウスがヒト抗CD20抗体を産生するように、ヒト重鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック又はトランスクロモソーマル・マウスを提供する。該ヒト重鎖導入遺伝子は、ここで詳述し、例示するように、HuMAbマウスなど、トランスジェニックと同様に、マウスの染色体DNAに組み込むことができる。代替的には、該ヒト重鎖導入遺伝子を、WO 02/43478に解説された通りのトランスクロモソーマル (例えばKM) ・マウスの場合のように、染色体外に維持することもできる。このようなトランスジェニック及びトランスクロモソーマル動物は、V-D-J/V-J組換え及びアイソタイプ・スイッチングを起こすことにより、CD20に対して複数のアイソタイプ (例えばIgG、IgA 及び/又は IgE) のヒトモノクローナル抗体を産生することができる。外来の抗原刺激に対し、異種の抗体レパートリーで応答する非ヒトトランスジェニック及びトランスクロモソーマル動物のデザインには、当該のトランスジェニック動物に含まれた異種の免疫グロブリン導入遺伝子が、B細胞発生の経路全般にわたって正確に機能する必要がある。これには、例えば、異種重鎖導入遺伝子のアイソタイプ・スイッチングが含まれる。従って、導入遺伝子は、アイソタイプ・スイッチングが誘導されるように構築され、抗体遺伝子の以下の特徴のうち1つ以上：(1) 高レベル及び細胞種特異的な発現、(2) 機能的な遺伝子再編成、(3) 対立遺伝子排除の活性化及び対立遺伝子排除に対する応答、(4) 十分な一次レパートリーの発現、(5) シグナル伝達、(6)

30

40

50

体細胞超変異、及び(7)免疫応答中の導入遺伝子抗体の優性。

【0126】

前述の基準の全てを満たす必要はない。例えば、トランスジェニック動物の内因性免疫グロブリン遺伝子座を機能的に破壊した実施態様では、この導入遺伝子是对立遺伝子排除を活性化する必要はない。さらに、導入遺伝子が機能的に再編成された重鎖及び/又は軽鎖免疫グロブリン遺伝子を含む実施態様では、機能遺伝子の再編成という二番目の基準は、少なくとも導入遺伝子が既に再編成されている限りにおいて、不要である。分子免疫学の背景については、引用をもってここに援用することとする Fundamental Immunology, 2nd edition (1989), Paul William E., ed. Raven Press, N.Y.を参照されたい。

【0127】

いくつかの実施態様では、本発明のヒトモノクローナル抗体を作製するために用いる非ヒトトランスジェニックもしくはトランスクロモソーマル動物は、再編成された、再編成のない、又は再編成された及び再編成のないものの組合せの異種免疫グロブリン重鎖及び軽鎖導入遺伝子を、このトランスジェニック動物の生殖細胞に含有する。重鎖導入遺伝子のそれぞれは少なくとも一つのC_H遺伝子を含む。加えて、この重鎖導入遺伝子が、このトランスジェニック動物のB細胞中で、複数のC_H遺伝子をコードする異種導入遺伝子のアイソタイプ・スイッチングを支援できる機能的アイソタイプ・スイッチ配列を含有してもよい。このようなスイッチ配列は、導入遺伝子C_H遺伝子の源として働く種由来の生殖細胞免疫グロブリン遺伝子座に天然で存在するものであってもよく、あるいはこのようなスイッチ配列は、導入遺伝子コンストラクトを受け取る側の種(トランスジェニック動物)にあるものを由来としてもよい。例えば、トランスジェニックマウスを作製するために用いるヒト導入遺伝子コンストラクトは、マウス重鎖遺伝子座に天然で存在するものと類似のスイッチ配列が導入されている場合には、より高頻度でアイソタイプ・スイッチング事象を起こすと思われる。これはおそらく、マウススイッチ・リコンビナーゼ酵素系で機能するにはこのようなマウススイッチ配列は最適であるが、ヒトスイッチ配列はそうでないからであろう。スイッチ配列は従来クローニング法で分離及びクローンしてもよく、又は、免疫グロブリンスイッチ領域配列に関して公開された配列情報に基づいてデザインされた重複合成オリゴヌクレオチドからde novo合成してもよい(引用をもってここに援用する Mills et al., Nucl. Acids Res. 15:7305-7316 (1991); Sideras et al., Intl. Immunol. 1:631-642 (1989))。前述のトランスジェニック動物のそれぞれの場合、機能的に再編成された異種重鎖及び軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子が、このトランスジェニック動物のB細胞の大部分で見られる(少なくとも10パーセント)。

【0128】

本発明のトランスジェニック動物を作製するために用いる導入遺伝子は、少なくとも一つの可変遺伝子セグメント、一つの多様性遺伝子セグメント、一つのジョイニング遺伝子セグメント、及び少なくとも一つの定常領域遺伝子セグメント、をコードするDNAを含む重鎖導入遺伝子を含む。免疫グロブリン軽鎖導入遺伝子は、少なくとも一つの可変遺伝子セグメント、一つのジョイニング遺伝子セグメント、及び少なくとも一つの定常領域遺伝子セグメント、をコードするDNAを含む。前記軽鎖及び重鎖遺伝子セグメントをコードする遺伝子セグメントは、当該の非ヒトトランスジェニック動物を構成しない種を由来とする免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子セグメントをコードするDNAを由来とするか、又は、このようなDNAに相当するため、この非ヒトトランスジェニック動物にとって異種である。本発明の一面では、これら個々の遺伝子セグメントが再編成されないように、即ち、機能的免疫グロブリン軽鎖又は重鎖をコードするよう、再編成されないように、導入遺伝子を構築する。このような再編成のない導入遺伝子は、V、D、及びJ遺伝子セグメントの組換え(機能的再編成)を支援し、好ましくは、CD20抗原に暴露したときに、非ヒトトランスジェニック動物内でD領域遺伝子セグメントの全部又は一部が再編成後の免疫グロブリン重鎖へ取り込まれることを支援するとよい。

【0129】

代替的な実施態様では、当該導入遺伝子は再編成のない「最小遺伝子座」を含むものであ

10

20

30

40

50

る。このような導入遺伝子は典型的に、C、D、及びJセグメントの大部分や、V遺伝子セグメントのサブセットを含む。このような導入遺伝子コンストラクトにおいては、多様な調節配列、例えばプロモータ、エンハンサ、クラス・スイッチ領域、RNAプロセッシングの際のスプライス・ドナー及びスプライス・アクセプタ配列、組換えシグナル等、は、当該の異種DNA由来の対応する配列を含む。このような調節配列は、この導入遺伝子に、本発明で用いられる非ヒト動物と同じ種から、又は、関連する種から、導入してよい。例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子セグメントを導入遺伝子内でげっ歯類免疫グロブリンエンハンサ配列に組み合わせて、トランスジェニックマウスでの利用に向けてもよい。代替的には、哺乳動物のゲノムに天然で存在することが公知の機能的DNA配列にとって同種でないような合成調節配列を、導入遺伝子に組み込んでもよい。合成調節配列は、例えばスプライス・アクセプタ部位又はプロモータ/エンハンサ・モチーフの許容可能な配列を明示したものなど、コンセンサスの規則に従ってデザインされる。例えば、最小遺伝子座は、天然で発生する生殖細胞Ig遺伝子座に比較して、必須でないDNA部分（例えば介在配列；イントロン又はその一部分）に、少なくとも一つの間（即ち当該部分の末端ではない）の欠失を有するゲノム免疫グロブリン遺伝子座部分を含む。

【0130】

好適な非ヒトトランスジェニック及びトランスクロモソーマル動物、例えばマウス、は、大きなレポトリ、理想的には容量を調節後のヒトのそれと実質的に同様なレポトリで、免疫グロブリン産生を示すことになるものである。

【0131】

前記レポトリは、理想的には、容量を調節後のヒトが示すものに、通常は少なくとも約10%、好ましくは25乃至50%又はそれ以上、近いとよいであろう。概して、少なくとも約1000種の異なる免疫グロブリン（理想的にはIgG）、好ましくは 10^4 乃至 10^6 又はそれ以上の種類が、主にマウスゲノムに導入された様々なV、J及びD領域の数に応じて、そしてジョイニング領域でのV(-D-)J遺伝子セグメント再編成ランダムヌクレオチド追加で生じる付加的な多様性に応じて、産生されるとよいであろう。典型的には、当該の免疫グロブリンは、所定の抗原に対し、例えば 10^{-8} M、 10^{-9} M 又は 10^{-10} M 又はそれ未満である、など、 10^{-7} M 未満の親和性 (K_D) を示すであろう。

【0132】

マウスなど、上述したようなトランスジェニックもしくはトランスクロモソーマル動物は、CD20発現細胞などで免疫することができる。代替的には、当該のトランスジェニック動物を、ヒトCD20をコードするDNAで免疫することができる。このマウスが産生するB細胞は、導入遺伝子内スイッチ組換え（cisスイッチング）を通じてクラス・スイッチングを起こして、CD20と反応性の免疫グロブリンを発現するであろう。この免疫グロブリンはヒト抗体（ここでは「ヒト配列抗体」とも言及される）でもよく、その重鎖及び軽鎖ポリペプチドは、ヒト導入遺伝子配列にコードされていてもよいが、前記ヒト導入遺伝子配列は、体細胞変異及びV領域組換えジョイント由来の配列や、生殖細胞にコードされた配列を含んでもよい。これらのヒト配列免疫グロブリンは、ヒト V_L 又は V_H 遺伝子セグメント及びヒト J_L 又は J_H セグメントにコードされたポリペプチド配列と実質的に同等であると言うことができ、ただし他の非生殖細胞配列も、体細胞変異及び示差的なV-J 及びV-D-J組換えジョイントの結果として存在してもよい。このようなヒト配列抗体に関しては、各鎖の可変領域は、典型的に、ヒト生殖細胞V、J遺伝子セグメントに、そして重鎖の場合D、遺伝子セグメントに、少なくとも80パーセント、コードされている。しばしば可変領域の少なくとも85パーセントが、導入遺伝子上に存在するヒト生殖細胞配列にコードされている。可変領域配列のうちのしばしば90又は95パーセント又はそれ以上が、導入遺伝子上に存在するヒト生殖細胞配列にコードされている。しかしながら、体細胞変異並びにVJ及びVDJジョイニングでは非生殖細胞配列が導入されるために、当該ヒト配列抗体はしばしば、ヒト導入遺伝子に見られるようなヒトV、D又はJ遺伝子セグメントにはコードされていない何らかの可変領域配列を（そして頻度は劣るが定常領域配列を）、このマウスの生殖細胞中に有するであろう。典型的には、このような非生殖細胞配列（又は個々のヌク

レオチド位置)は、CDR中か、又はCDR近傍、あるいは体細胞変異が集中して起きることが知られている領域に集まるであろう。

【0133】

本発明の別の局面は、ここで解説した通りの非ヒトトランスジェニックもしくはトランスクロモソーマル動物を由来とするB細胞を包含する。このB細胞は、ヒトCD20に対し、高親和(例えば 10^{-7} M未満の解離平衡定数(K_D))結合するヒトモノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを作製するために用いることができる。このように、別の実施態様では、本発明は、放射活性標識モノクローナル抗体を用いたCD20発現細胞のスクッチャード分析や、又は、FACS分析を用いた半分-最大結合濃度の決定によって決定したときに、 10^{-8} 、 10^{-9} M又は 10^{-10} M又はそれ未満など、 10^{-7} M未満の親和性(K_D)を有するヒト抗体を産生するハイブリドーマを提供するものである。

10

【0134】

ここで、本モノクローナル抗体は、

(1)ヒト V_L 遺伝子セグメント及びヒト J_L セグメントにコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する軽鎖可変領域、及び(2)ヒト C_L 遺伝子セグメントにコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する軽鎖定常領域、から成るヒト配列軽鎖と;

(1)ヒト V_H 遺伝子セグメント、選択的にD領域、及びヒト J_H セグメントにコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する重鎖可変領域、及び(2)ヒト C_H 遺伝子セグメントにコードされたポリペプチド配列に実質的に同一なポリペプチド配列を有する定常領域、から成るヒト配列重鎖とを含む。

20

【0135】

CD20に対する高親和ヒトモノクローナル抗体の開発は、組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニックマウスで、ヒト可変領域遺伝子セグメントのレパートリーを拡大する方法により容易になるが、当該方法は、前記組み込まれたヒト免疫グロブリン導入遺伝子には存在しないV領域遺伝子セグメントを含むV遺伝子導入遺伝子を前記ゲノムに導入するステップを含む。しばしば前記V領域導入遺伝子は、ヒトゲノムに天然で存在するような、又は、組換え法で一緒に別にスプライスされるような、ヒト V_H 又は V_L (V_K)遺伝子セグメント・アレイの一部を含む酵母人工染色体であり、この酵母人工染色体の含有するV遺伝子セグメントは順序が狂っていても、又は省略されていてもよい。しばしば少なくとも5つ以上の機能的V遺伝子セグメントがYAC上に含有されている。このバリエーションでは、前記Vレパートリー拡大法で生じるトランスジェニックマウスを作製することが可能であり、このとき当該マウスは、V領域導入遺伝子上に存在するV領域遺伝子セグメントにコードされた可変領域配列と、ヒトIg導入遺伝子にコードされたC領域とを含む免疫グロブリン鎖を発現する。Vレパートリー拡大法により、少なくとも5個の異なるV遺伝子を有するトランスジェニックマウスを作製でき、また少なくとも約24個又はそれ以上のV遺伝子を含有するマウスも作製できる。いくつかのV遺伝子セグメントは非機能的であってもよい(例えば偽遺伝子等)。これらのセグメントを維持してもよいが、あるいは、必要に応じて当業者に可能な組換え法により選択的に欠失させてもよい。

30

40

【0136】

マウス生殖細胞を操作して、J及びC遺伝子セグメントを含有するヒトIg導入遺伝子には実質的に存在しない拡大されたVセグメント・レパートリーを有する機能的YACを含有させたら、拡大されたVセグメント・レパートリーを有する機能的YACを、異なるヒトIg導入遺伝子を有するマウス生殖細胞に交雑するバックグラウンドを含め、他の遺伝的バックグラウンドにこの形質を伝播及び交雑することができる。拡大されたVセグメント・レパートリーを有する複数の機能的YACを、1つのヒトIg導入遺伝子(又は複数のヒトIg導入遺伝子)と一緒に働かせるために生殖細胞に交雑してよい。ここではYAC導入遺伝子と言及するが、ゲノムに組み込んだときのこのような導入遺伝子は、酵母で自律的複製を行うのに必

50

要な配列など、酵母配列を実質的に欠いていてもよい。このような配列は、選択的に、酵母での複製がもはや必要でなくなってから（即ちマウスES細胞又はマウス前接合子への導入前に）遺伝子操作（例えば制限消化及びパルス界ゲル電気泳動法又は他の適した方法など）により取り除いてもよい。ヒト配列免疫グロブリン発現の形質を伝播させる方法には、ヒトIg導入遺伝子を有し、そして選択的には、拡大されたVセグメント・レパートリーを有する機能的YACもさらに有するようなトランスジェニックマウスを育種する方法がある。V_H及びV_L遺伝子セグメントの両方がYAC上に存在してもよい。当該トランスジェニックマウスは、ヒトIg導入遺伝子、及び/又は、他のヒトリンパ球たんぱくをコードする導入遺伝子を含め、他のヒト導入遺伝子を持つバックグラウンドを含む、開業医が希望するいかなるバックグラウンドに交雑してもよい。さらに本発明は、拡大されたV領域レパートリーYAC導入遺伝子を有するトランスジェニックマウスが産生する高親和ヒト配列免疫グロブリンを提供する。前の記載では本発明のトランスジェニック動物の好適な実施態様を解説したが、以下、3つのカテゴリーに分類された他の実施態様も考察されている：

I．再編成のない重鎖及び再編成される軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物；

II．再編成のない重鎖及び再編成のない軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物；

III．再編成される重鎖及び再編成のない軽鎖免疫グロブリン導入遺伝子を含有するトランスジェニック動物；及び

【0137】

これらのカテゴリーのトランスジェニック動物のうち、好適な優先度は以下、II>I>III（この場合の内因性の軽鎖遺伝子（又は少なくともK遺伝子）は、相同組換え（又は他の方法）によりノックアウトされている）、及びI>II>III

（この場合の内因性軽鎖遺伝子はノックアウトされておらず、対立遺伝子排除により劣性とならなければならない）の通りである。

【0138】

III．CD20に結合する二重特異的/多重特異的分子

本発明のさらに別の実施態様では、CD20に対するヒトモノクローナル抗体、又はその抗原結合部分を誘導体化するか、又は、例えば別のペプチド又はタンパク質（例えばFab'フラグメント）などの別の機能分子に連結して、複数の結合部位又は標的エピトープに結合する二重特異的又は多重特異的分子を作製することができる。例えば、本発明の抗体又は抗原結合部分は、例えば別の抗体、抗体フラグメント、ペプチド又は結合ミメティックなど、1つ以上の他の結合分子に（例えば化学結合、遺伝子融合、非共有結合的結合又は他の方法により）機能的に連結することができる。

【0139】

従って、本発明は、CD20に対する少なくとも1つの第一結合特異性部分と、第二標的エピトープに対する第二結合特異性部分とを含む二重特異的及び多重特異的分子を包含するものである。本発明のある具体的な実施態様では、前記第二標的エピトープは、例えばヒトFcRI（CD64）又はヒトFc受容体（CD89）などのFc受容体である。従って、本発明は、FcR、FcR又はFcRを発現するエフェクタ細胞（例えば単球、マクロファージ又は多核白血球（PMN）など）と、CD20を発現する標的細胞の両方に結合できる二重特異的及び多重特異的分子を包含する。これらの二重特異的及び多重特異的分子はCD20発現細胞をエフェクタ細胞に狙わせて、本発明のヒトモノクローナル抗体と同様、Fc受容体が媒介するエフェクタ細胞の活性、例えばCD20発現細胞のファゴサイトーシス、抗体依存的細胞媒介細胞傷害性（ADCC）、サイトカイン放出、又はスーパーオキシド・アニオンの産生などを惹起する。

【0140】

さらに本発明の二重特異的及び多重特異的分子には、抗Fc結合特異性部分及び抗EGFR結合特異性部分に加え、第三結合特異性部分を含めることができる。ある実施態様では、前記第三結合特異性部分は、細胞傷害活性に關与する表面タンパク質に結合して標的細胞への

10

20

30

40

50

免疫応答を増す分子など、抗エンハンスメント因子（EF）部分である。前記の「抗エンハンスメント因子部分」は、抗原又は受容体などの特定の分子に結合して、Fc受容体又は標的細胞抗原の結合決定基の作用を高めるような抗体、機能的抗体フラグメント又はリガンドであってよい。前記「抗エンハンスメント因子部分」は、Fc受容体又は標的細胞抗原に結合することができる。代替的には、前記抗エンハンスメント因子部分は、第一及び第二結合特異性部分が結合する実体とは異なる実体に結合することができる。例えば、前記抗エンハンスメント因子部分は、細胞傷害性T細胞に（例えばCD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1を介して、又は、標的細胞への免疫応答が高まる結果となる他の免疫細胞を介して）結合することができる。

【0141】

ある実施態様では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、又は一本鎖Fvなどを含め、少なくとも一種の抗体又はその抗体フラグメントを結合特異性部分として含む。この抗体はまた、軽鎖もしくは重鎖二量体であっても、あるいは、その内容を引用をもって援用することと明示しておく1990年8月7日発行のLadner et al. の米国特許第4,946,778号に解説されているように、Fv又は一本鎖コンストラクトなど、その何らかの最小フラグメントであってもよい。さらに本抗体は、US 2003/0118592 及びUS 2003/0133939に開示されるような結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質であってもよい。

【0142】

ある実施態様では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、エフェクタ細胞の表面上に存在するFc R又はFc Rに対する結合特異性部分と、CD20などの標的細胞抗原に対する第二結合特異性部分とを含む。

【0143】

ある実施態様では、Fc受容体に対する結合特異性を、その結合がヒト免疫グロブリンG(IgG)の遮断を受けないヒトモノクローナル抗体によって提供する。ここで用いる用語「IgG受容体」とは、1番染色体上にある8つの鎖遺伝子のいずれをも言う。これらの遺伝子は、3つのFc受容体クラス：Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32)、及びFc RIII (CD16)に分類される合計12種の膜貫通又は可溶性の受容体アイソフォームをコードしている。ある好適な実施態様では、前記Fc受容体はヒト高親和Fc RIである。

【0144】

これらの好適なモノクローナル抗体の作製及び特徴付けは、その教示全体を引用をもってここに援用することとするFanger et al. のPCT出願WO 88/00052 及び米国特許第4,954,617号に解説されている。これらの抗体はFc RI、Fc RII 又はFc RIIIのエピトープに、当該受容体のFc結合部位とは異なる部位で結合するため、これらの結合は、生理的レベルのIgGでは実質的に遮断を受けない。本発明で有用な特異的抗Fc RI抗体はMAb 22、MAb 32、MAb 44、MAb 62 及びMAb 197である。MAb 32を産生するハイブリドーマはアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションからATCC受託番号HB9469で入手できる。抗Fc RI MAb 22、MAb 22のF(ab')₂フラグメントは、メダレックス社（ニュージャージー州アナナデル）から入手できる。他の実施態様では、抗Fc受容体抗体は、ヒト化型のモノクローナル抗体22(H22)である。H22抗体の作製及び特徴付けはGraziano, R.F. et al. (1995) J. Immunol 155 (10): 4996-5002 及び PCT/US93/10384に解説されている。H22抗体産生細胞株は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションに1992年11月4日に指定番号HA022CL1で寄託され、受託番号CRL 11177を受けている。

【0145】

さらに別の好適な実施態様では、Fc受容体に対する結合特異性部分を、その結合が好ましくはヒト免疫グロブリンA(IgA)の遮断を受けない、Fc-アルファ受容体(Fc RI (CD89))などのヒトIgA受容体に結合する抗体に提供させる。用語「IgA受容体」には、19番染色体上にある一つの遺伝子(Fc RI)の遺伝子産物が包含されるものと、意図されている。この遺伝子は、55乃至110kDaの選択的にスプライシングされる膜貫通型アイソフォームをいくつかコードしていることが知られている。Fc RI (CD89)は、単球/マクロフ

10

20

30

40

50

ァージ、好酸性及び好中性顆粒球上で構成的に発現するが、非エフェクタ細胞集団上では発現しない。Fc RIはIgA1及びIgA2の両方に対して中間の親和性 ($5 \times 10^7 M^{-1}$) を有するが、この親和性は、G-CSF 又はGM-CSFなどのサイトカインに暴露すると上昇する (Morton, H.C. et al. (1996) *Critical Reviews in Immunology* 16:423-440)。Fc RIに、IgAリガンド結合ドメイン以外で結合する、A3、A59、A62及びA77と同定された4種類のFc RI特異的モノクローナル抗体が解説されている。(Monteiro, R.C. et al., 1992, *J. Immunol.* 148:1764)。

【0146】

Fc RI及びFc RIは、(1)単球、PMN、マクロファージ及び樹状細胞などの免疫エフェクタ細胞上に主に発現する；(2)高レベル(例えば1個の細胞当たり5,000乃至100,000)で発現する；(3)細胞傷害活性(ADCC、ファゴサイトーシス)の媒介物質である；(4)自己抗原を含め、それらが狙う抗原の抗原提示促進を媒介する、点で、本発明での使用に好適なトリガー受容体である。

10

【0147】

別の実施態様では、前記の二重特異的分子は、本発明に基づく2つのヒトモノクローナル抗体から成り、この場合これら2つのヒトモノクローナル抗体は、例えば2F2と11B8の組合せなど、一方が主にCDCを誘導することにより作用し、他方が主にアポトーシスを誘導することにより作用するなど、補完的な機能上の活性を有するものである。

【0148】

他の実施態様では、本発明の二重特異的及び多重特異的分子はさらに、CD20などの標的細胞抗原に、結合するなど認識する結合特異性部分を含む。ある好適な実施態様では、前記結合特異性部分を、本発明のヒトモノクローナル抗体に提供させる。

20

【0149】

ここで用いる「エフェクタ細胞特異抗体」とは、エフェクタ細胞のFc受容体に結合する抗体又は機能的抗体フラグメントを言う。本発明で用いるのに好適な抗体は、エフェクタ細胞のFc受容体に、内因性免疫グロブリンが結合しない部位で結合するものである。

【0150】

ここで用いる用語「エフェクタ細胞」とは、免疫応答の認識及び活性化段階でなく、免疫応答のエフェクタ段階に關与する免疫細胞を言う。免疫細胞の例には、骨髓又はリンパ系由来の細胞、例えばリンパ球(例えば、細胞溶解性T細胞(CTL)を含むB細胞及びT細胞)、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多核白血球、顆粒球、マスト細胞、及び好塩基球、がある。いくつかのエフェクタ細胞は特異的Fc受容体を発現し、特異的免疫機能を果たす。好適な実施態様では、エフェクタ細胞は、ADCCを誘導できる好中球など、抗体依存性細胞媒介細胞傷害性(ADCC)を誘導することができる。例えば、FcRを発現する単球、マクロファージは、標的細胞の特異的致死及び他の免疫系構成成分への抗原提示か、又は、抗原提示細胞への結合に關与している。他の実施態様では、エフェクタ細胞は、標的抗原、標的細胞、又は微生物を貪食することができる。エフェクタ細胞上の特定のFcRの発現は、サイトカインなどの体液性因子により調節することができる。例えば、Fc RIの発現がインターフェロンガンマ(IFN-)により上方調節されることが判明している。この発現亢進により、Fc RI担持細胞の標的に対する細胞傷害活性が増す。エフェクタ細胞は、標的抗原又は標的細胞を貪食又は溶解することができる。

30

40

【0151】

「標的細胞」は、本発明の組成物(例えばヒトモノクローナル抗体、二重特異的もしくは多重特異的分子)の標的とすることができる、対象(例えばヒト又は動物)内の何らかの望ましくない細胞を意味することとする。好適な実施態様では、本標的細胞は、CD20を発現又は過剰発現している細胞である。CD20を発現する細胞には、典型的に、B細胞及びB細胞腫瘍、がある。

【0152】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の二重特異的もしくは多重特異的分子に利

50

用できる他の抗体は、マウス、キメラ及びヒト化モノクローナル抗体である。このようなマウス、キメラ及びヒト化モノクローナル抗体は当業で公知の方法により調製することができる。

【0153】

本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、化学的技術（例えばD. M. Kranz et al. (1981) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:5807を参照されたい）、ポリオーマ[®]技術（ReadingのUS 4,474,893を参照されたい）又は組換えDNA技術を用いて作製することができる。

【0154】

具体的には、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、当業で公知であり、ここに紹介された実施例で解説する方法を用いて、例えば抗FcR及び抗CD20結合特異性部分など、構成部分の結合特異性部分を結合させることにより、調製できる。例えば本二重特異的及び多重特異的分子の各結合特異性部分を別々に作製しておき、後で相互に結合することができる。これら結合特異性部分がタンパク質又はペプチドである場合、多種の結合又は架橋剤を共有結合に用いることができる。架橋剤の例には、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシンイミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、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)、及びスルホスクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート(スルホ-SMCC)（例えばKarpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照されたい）がある。他の方法にはPaulus (Behring Ins. Mitt. (1985) No. 78, 118-132); Brennan et al. (Science (1985) 229:81-83)、及びGlennie et al. (J. Immunol. (1987) 139: 2367-2375)が解説したものがあ

10

20

【0155】

結合特異性部分が抗体（例えば二種のヒト化抗体）である場合、これらは2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して結合させることができる。ある特に好適な実施態様では、前記ヒンジ領域を修飾して、奇数のスルフヒドリル残基、好ましくは1つ、を結合前に含有させる。

【0156】

代替的には、両方の結合特異性部分を同じベクタにコードさせ、同じ宿主細胞内で発現及び集合させることができる。この方法は、当該二重特異的及び多重特異的分子がMAb × MAb、MAb × Fab、Fab × F(ab')₂又はリガンド × Fab融合タンパク質である場合に特に有用である。例えば二重特異的分子など、本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、例えば一本鎖二重特異抗体、1つの一本鎖抗体及び結合決定基を含む一本鎖二重特異的分子、又は2つの結合決定基を含む一本鎖二重特異的分子など、一本鎖分子であってもよい。さらに二重特異的及び多重特異的分子は一本鎖分子であってもよく、あるいは少なくとも2つの一本鎖分子を含んで成るものでもよい。二重及び多重特異的分子を調製する方法は、例えば米国特許第5,260,203号；米国特許第5,455,030号；米国特許第4,881,175号；米国特許第5,132,405号；米国特許第5,091,513号；米国特許第5,476,786号；米国特許第5,013,653号；米国特許第5,258,498号；及び米国特許第5,482,858号に解説されている。

30

40

【0157】

二重特異的及び多重特異的分子の、それらの特異的標的への結合は、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ(RIA)、FACS分析、バイオアッセイ（例えば成長阻害）、又はウェスタン・ブロット検定法などにより、確認することができる。これらの検定法はそれぞれ、大まかに言って、目的のタンパク質 - 抗体複合体の存在を、この複合体に特異的な標識済みの試薬（例えば抗体）により検出するものである。例えばFcR-抗体複合体は、この抗体-FcR複合体を認識して特異的に結合する、例えば酵素に結合させた抗体又は抗体フラグメントなどを用いて、検出することができる。代替的には、当該の複合体を、多種の他の免疫検定法のいずれかを用いて検出することもできる。例えば抗体を放射性標識し、ラジオイムノアッセイ

50

(RIA)で用いることができる

(例えば引用をもってここに援用するWeintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照されたい)。放射性同位元素は、「カウンター又はシンチレーション」・カウンター、あるいはオートラジオグラフィの使用などの手段により、検出できる。

【0158】

IV. 免疫複合体

別の局面では、本発明は、細胞毒、薬物（例えば免疫抑制剤）又は放射性同位元素などの治療部分に結合させたヒト抗CD20モノクローナル抗体又はそのフラグメントを特徴とする。このような結合体をここでは「免疫複合体」と呼ぶ。1つ以上の細胞毒を含有する免疫複合体は「イムノトキシン」と呼ばれる。細胞毒又は細胞毒性作用物質には、細胞にとって有害な（例えば致死させる）あらゆる物質が含まれる。例には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、ミトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒシン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、及びピューロマイシン並びにこれらの類似体又は相同体がある。

10

【0159】

本発明の免疫複合体を形成するために適した治療薬には、限定はしないが、抗代謝産物（例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えばメクロレタミン、チオテパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）及びロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ミトマイシンC、及びcis-ジクロロジアミンプラチナム(II)（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えばダウノルピシン（以前のダウノマイシン）、及びドキシソルピシン）、抗生物質（例えばダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、プレオマイシン、ミトラマイシン、及びアントラマイシン（AMC））、及び抗有糸分裂剤（例えばピンクリスチン及びピンブラスチン）、がある。ある好適な実施態様では、本治療薬は細胞傷害性薬剤又は放射毒性薬剤である。別の実施態様では、本治療薬は免疫抑制剤である。さらに別の実施態様では、本治療薬はGM-CSFである。ある好適な実施態様では、本治療薬はドキシソルピシン、シスプラチン、プレオマイシン、スルフェート、カルムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド又はリシンAである。

20

30

【0160】

さらに本発明の抗体を、例えばヨウ素-131、イットリウム-90又はインジウム-111などの放射性同位体に結合させて、癌などのCD20関連異常を治療するための細胞傷害性放射性医薬を作製することができる。本発明の抗体複合体を用いて所定の生物学的応答を修飾することができるが、当該の薬物成分を、古典的な化学療法薬に限定されるものと、捉えられてはならない。例えば当該の薬物成分は、所望の生物活性を有するタンパク質又はポリペプチドであってもよい。このようなタンパク質には、例えばアブリン、リシンA、シュードモナス・エキソトキシン、又はジフテリア毒素などの酵素活性のある毒素又はその活性フラグメント；腫瘍壊死因子又はインターフェロン- α などのタンパク質；又は、例えばリンホカイン、インターロイキン-1（「IL-1」）、インターロイキン-2（「IL-2」）、インターロイキン-6（「IL-6」）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（「GM-CSF」）、顆粒球コロニー刺激因子（「G-CSF」）、又は他の成長因子などの生物学的応答修飾物質、が含まれよう。

40

【0161】

このような治療的部分を抗体に結合させる技術は公知であり、例えばArnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Lis

50

s, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), 及びThorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)を参照されたい。

10

【 0 1 6 2 】

更なる実施態様では、本発明に基づくヒトモノクローナル抗体を、例えばチウケセタン（原語：tiuxetan）などのリンカ - キレート剤に付着させると、本抗体を放射性同位体に結合することができる。

【 0 1 6 3 】

V . 医薬組成物

別の局面では、本発明は、本発明のヒトモノクローナル抗体を1つ又は組合せで含有する、医薬組成物などの組成物を提供するものである。前記の医薬組成物は、薬学的に許容可能な担体又は希釈剤や、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995に開示されたものなど、従来技術に従ったいずれか他の公知のアジュバント及び医薬品添加物と一緒に調合してもよい。ある実施態様では、当該組成物は、主にCDCを誘導することにより作用する1つの抗体を、主にアポトーシスを誘導することにより作用する別の抗体と組み合わせるなど、異なる機序で作用する単離された複数の（例えば2つ以上）本発明のヒト抗体の組合せを含む。

20

【 0 1 6 4 】

さらに本発明の医薬組成物を、併用療法で、即ち他の薬剤と組み合わせて、投与することができる。例えば、前記の併用療法には、本発明の組成物を、少なくとも1つの抗炎症剤又は少なくとも1つの免疫抑制剤と一緒に含めることができる。ある実施態様では、このような治療薬は、例えばステロイド系薬物又はNSAID（非ステロイド系抗炎症剤）など、一つ以上の抗炎症剤を含む。好適な薬剤には、例えば、アスピリン及び他のサリチル酸、Cox-2阻害剤、例えばロフェコキシブ（Vioxx）及びセレコキシブ（Celebrex）や、イブプロフェン（Motrin, Advil）、フェノプロフェン（Nalfon）、ナプロキセン（Naprosyn）、スリダック（Clinoril）、ジクロフェナック（Voltaren）、ピロキシカム（Feldene）、ケトプロフェン（Orudis）、ジフルニサル（Dolobid）、ナブメトン（Relafen）、エトドラック（Lodine）、オキサプロジン（Daypro）、及びインドメタシン（Indocin）などのNSAID、がある。

30

【 0 1 6 5 】

別の実施態様では、このような治療薬は、1つ以上のDMARD、例えばメトトレキセート（Rheumatrex）、ヒドロキシクロロキン（Plaquenil）、スルファサラジン（Asulfidine）、ピリミジン合成阻害剤、例えばレフルノミド（Arava）、IL-1 受容体遮断剤、例えばアナキンラ（Kineret）、及びTNF- 遮断剤、例えばエタネルセプト（Enbrel）、インフリキシマブ（Remicade）及びアダリムマブなど、を含む。

40

【 0 1 6 6 】

別の実施態様では、このような治療薬は、1つ以上の免疫抑制剤、例えばシクロスポリン（Sandimmune、Neoral）及びアザチオプリン（Imural）、を含む。

【 0 1 6 7 】

さらに別の実施態様では、このような治療薬、一つ以上の化学療法薬、例えばドキソルビシン（Adriamycin）、シスプラチン（Platinol）、ブレオマイシン（Blenoxane）、カルムスチン（Gliadel）、シクロホスファミド（Cytosan、Procytox、Neosar）、及びクロラムブシ

50

ル (Leukeran)、を含む。

【0168】

別の実施態様では、本発明のヒト抗体を、クロラムブシル及びプレドニゾン；シクロホスファミド及びプレドニゾン；シクロホスファミド、ビンクリスチン、及びプレドニゾン；シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、及びプレドニゾン；フルダラビン及びアントラサイクリン、と組み合わせる；又は他の普通のNHL用の多剤計画、例えば、in Non-Hodgkin's Lymphomas: Making sense of Diagnosis, Treatment, and Options, Lorraine Johnston, 1999, O'Reilly and Associates, Incに開示されたもの、と組み合わせる投与してもよい。

【0169】

さらに別の実施態様では、本ヒト抗体を、放射線治療及び/又は自己由来末梢幹細胞又は骨髄移植と併用投与してもよい。

【0170】

さらに別の実施態様では、本ヒト抗体を、抗CD25抗体、抗CD19抗体、抗CD21抗体、抗CD22抗体、抗CD37抗体、抗CD38抗体、抗IL6R抗体、抗IL8抗体、抗IL15抗体、抗IL15R抗体、抗CD4抗体、抗CD11a抗体（例えばエファリズマブ）、抗アルファ-4/ベータ-1 インテグリン (VLA4) 抗体（例えばナタリズマブ）、及び CTLA4-Igから選択される1つ以上の抗体と併用投与してもよい。

【0171】

ある具体的な実施態様では、本ヒトモノクローナル抗体を、例えば移植片対宿主疾患患者においてなど、水疱性類天疱瘡の治療に向けて抗CD25抗体と組み合わせる投与する。

【0172】

別の具体的な実施態様では、本ヒトモノクローナル抗体を、悪性疾患の治療に向けて、抗CD19抗体、抗CD21抗体、抗CD22抗体、抗CD37抗体、及び抗CD38抗体から選択される1つ以上の抗体と組み合わせる投与する。

【0173】

さらに別の具体的な実施態様では、本ヒト抗体を、炎症性疾患の治療に向けて、抗IL6R抗体、抗IL8抗体、抗IL15抗体、抗IL15R抗体、抗CD4抗体、抗CD11a抗体（例えばエファリズマブ）、抗アルファ4/ベータ-1 インテグリン (VLA4) 抗体（例えばナタリズマブ）、及び CTLA4-Ig から選択される1つ以上の抗体と組み合わせる投与する。

【0174】

さらに更なる実施態様では、補体活性化を高めるために本ヒト抗体を抗C3b(i)抗体と組み合わせる投与してもよい。

【0175】

ここで用いる場合の「薬学的に許容可能な担体」には、生理学的に適合性あるあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤及び抗カビ剤、等張剤及び吸収遅延剤等が含まれる。好ましくは、当該の担体が静脈内、筋肉内、皮下、腸管外、脊髄もしくは表皮投与（例えば注射又は輸注により）に適しているとよい。投与経路によっては、活性化化合物、即ち抗体、二重特異的及び多重特異的分子を、当該化合物を不活化しかねない酸及び他の天然条件の作用から当該化合物を保護する物質で被覆してもよい。

【0176】

「薬学的に許容可能な塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持しつつも、望ましくない毒性作用を与えないような塩を言う（例えばBerge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照されたい）。このような塩の例には、酸添加塩及び塩基添加塩がある。酸添加塩には、非毒性の無機酸、例えば塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、リン等から誘導されたものや、非毒性の有機酸、例えば脂肪族モノカルボン酸及びジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族の酸、脂肪族及び芳香族のスルホン酸等から誘導されたものがある。塩基添加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属から誘導されたものや、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエ

10

20

30

40

50

タノールアミン、エチレンジアミン、プロカイン等の非毒性の有機アミンから誘導されたものがある。

【0177】

本発明の組成物は、当業で公知の多種の方法により投与することができる。当業者であれば理解されるように、投与の経路及び/又は形態は、所望の結果に応じて様々であろう。当該活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、及びマイクロ封入送達系を含む制御放出製剤など、急速な放出から当該化合物を保護する担体と一緒に調製することができる。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、及びポリ乳酸など、生分解性で生体適合性あるポリマを用いることができる。このような製剤の調製法が数多く、当業者に広く公知である。

10

例えばSustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R.Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0178】

特定の投与経路で本発明の化合物を投与するには、当該化合物の失活を防ぐ物質でそれを被覆するか、又は当該化合物と同時投与することが必要な場合がある。例えば本化合物を、適したリポソームなどの担体又は希釈剤に入れて対象に投与してもよい。薬学的に許容可能な希釈剤には生理食塩水及び水性の緩衝液がある。リポソームには水中油中水CGFエマルジョンや、従来のリポソームがある(Strejan et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7:27)。

20

【0179】

薬学的に許容可能な担体には無菌の水溶液又は分散液並びに、無菌の注射液又は分散液の即時調製用の無菌粉末がある。このような媒質及び薬剤の、薬学的に活性な物質のための使用は当業で公知である。従来媒質又は薬剤が当該活性化合物にとって不適合でない限り、本発明の医薬組成物中のその使用は考察されたところである。補助的な活性化合物も、本組成物中に組み込むことができる。

【0180】

治療用の組成物は典型的に無菌でなければならず、また製造及び保管条件下で安定でなければならない。本組成物は、高い薬物濃度に適した溶液、マイクロ乳液、リポソーム、又は他の秩序ある構造として調合することができる。当該の担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等)、及びこれらの適した混合物などを含有する溶媒又は分散媒であってよい。適した流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを用いたり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、そして界面活性剤を使用するなどにより、維持できる。多くの場合、例えば糖類、マンニトール、ソルビトールなどの多価アルコール、又は塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含めることが好ましいであろう。注射用組成物の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸塩及びゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を組成物中に含めることにより、可能である。

30

【0181】

無菌の注射用溶液は、必要量の活性化合物を適した溶媒に、必要に応じて上に列挙した成分の1つ又は組み合わせと一緒に加えた後、滅菌マイクロ濾過を行うことにより、調製できる。分散液は一般的には、塩基性の分散媒と、上に列挙したものの中で必要な他の成分とを含有する無菌の賦形剤に当該活性化合物を加えることで、調製されている。無菌の注射用溶液の調製用の無菌粉末の場合、好適な調製法は真空乾燥及び凍結乾燥(凍結乾燥)であり、その結果、活性成分及び付加的な所望の成分の粉末が、予め殺菌濾過されたその溶液から生じる。

40

【0182】

投薬計画は、最適な所望の応答(例えば治療的応答)が得られるように調節される。例えば単一の巨丸剤を投与してもよく、複数に分割された用量を一定期間にわたって投与しても、又は、治療状況の緊急度を指標として用量を比率的に増減させてもよい。投与の容易さ及び投薬量の均一性のためには、非経口用組成物を単位剤形で調合することが特に有利

50

である。ここで用いる単位剤形とは、治療しようとする対象にとって単位型の投薬量として調整された物理的に別個の単位を言う。各単位は、必要な薬品用担体との関連から所望の治療効果を生ずるよう計算された所定量の活性化合物を含有する。本発明の単位剤形の詳細は、(a) 活性化合物の固有の特徴、及び、達成しようとする特定の治療効果、及び (b) このような活性化合物を、個体の感受性の治療に向けて配合する技術に内在する限界、によって決定され、またこれらに直接依存する。

【0183】

薬学的に許容可能な抗酸化剤の例には：(1) 水溶性の抗酸化剤、例えばアスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等；(2) 油溶性抗酸化剤、例えばアスコルビン酸パルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、アルファートコフェロール、等；及び(3) 金属キレート剤、例えばクエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸等がある。

10

【0184】

治療用組成物の場合、本発明の調合物には、経口、鼻孔、局所(口腔内及び舌下を含む)、直腸、膣及び/又は非経口投与に適したものが含まれる。当該調合物は適宜、単位剤形で提供してもよく、製薬業で公知の何らかの方法で調製してもよい。一個分の剤形を作製するために担体物質と組み合わせることのできる活性成分の量は、治療しようとする対象、及び特定の投与形態に応じて様々であろう。一個分の剤形を作製するために担体物質と組み合わせることのできる活性成分の量は、一般に、治療効果を生む組成物量となるであろう。概して、100パーセントのうちで、この量は約0.01パーセント乃至約99パーセントの活性成分、好ましくは約0.1パーセント乃至約70パーセント、最も好ましくは約1パーセント乃至約30パーセントの範囲であろう。

20

【0185】

経膣投与に適した本発明の調合物には、さらに、当業で適していることが公知の担体を含有するベッサリ、タンポン、クリーム、ゲル、ペースト、フォーム又はスプレー調合物がある。本発明の組成物の局所もしくは経皮投与用の剤形には、粉末、スプレー、軟膏、ペースト、クリーム、ローション、ゲル、溶液、パッチ及び吸入剤、がある。当該の活性化合物は、薬学的に許容可能な担体や、必要に応じて何らかの保存剤、緩衝剤、又は推進剤と無菌条件下で混合してよい。

30

【0186】

ここで用いる文言「非経口投与」及び「非経口的に投与する」とは、通常は注射による、腸管内及び局所投与以外の投与形態を意味し、その中には、限定はしないが、静脈内、筋肉内、動脈内、鞘内、嚢内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、被膜下、くも膜下、髄腔内、硬膜外及び胸骨内注射及び輸注、がある。

【0187】

本発明の医薬組成物中に用いてもよい適した水性及び非水性の担体の例には、水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、及びこれらの適した混合物、オリーブ油などの植物油、及びオレイン酸エチルなどの注射可能な有機エステル、がある。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティング材料を用いたり、分散液の場合には必要な粒子の大きさを維持したり、そして界面活性剤を使用するなどにより、維持できる。

40

【0188】

これらの組成物には、保存剤、湿潤剤、乳濁剤及び分散剤などのアジュバントを含有させてもよい。微生物の存在を防ぐには、上述の滅菌法と、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸等の多種の抗菌剤及び抗カビ剤の含有の両方を行うと、確実になる。例えば糖類、塩化ナトリウム等の等張剤を組成物に含めることも好ましい場合がある。加えて、注射用の薬形の吸収を長引かせるには、モノステアリン酸アルミニウム及びゼラチンなど、吸収を遅らせる薬剤を含めることにより、可能である。

【0189】

50

ある実施態様では、本発明のヒトモノクローナル抗体を、皮下注射により結晶型で投与する。Yang et al. (2003) PNAS, 100(12):6934-6939 を参照されたい。

【0190】

本発明の化合物を製薬としてヒト及び動物に投与する場合、これらを単独で与えることもできるが、又は、例えば0.01%乃至99.5% (より好ましくは0.1%乃至90%) の活性化化合物を薬学的に許容可能な担体と組み合わせて含有する医薬組成物としても、与えることができる。

【0191】

本発明の化合物を製薬としてヒト及び動物に投与する場合、これらを単独で与えることもできるが、又は、例えば0.01%乃至99.5% (より好ましくは0.1%乃至90%) の活性化化合物を薬学的に許容可能な担体と組み合わせて含有する医薬組成物としても、与えることができる。

10

【0192】

本発明の医薬組成物中の活性成分の実際の投薬量レベルは、特定の患者、組成物、及び投与形態にとって、患者に毒性となることなく所望の治療応答を得るために有効量の活性成分が得られるよう、変更してもよい。選択される投薬量レベルは、用いる本発明の特定の組成物又は、そのエステル、塩又はアミドの活性、投与経路、投与機関、用いる特定の化合物の排出速度、治療期間、用いる特定の組成物と併用する他の薬物、化合物及び/又は物質、治療する患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康及び以前の医療歴等、医薬で公知の因子を含め、多種の薬物動態学的因子に依拠することとなろう。

20

【0193】

当業において通常の技術を有する医師又は獣医であれば、本医薬組成物の必要な有効量を容易に決定及び処方することができる。例えば、この医師又は獣医は、当該医薬組成物中に用いる本発明の化合物の用量を、所望の治療効果を得るのに必要なそれより少ないレベルで開始し、この投薬量を所望の効果が得られるまで次第に増加させていってもよい。一般的には、本発明の組成物の適した一日当たりの用量は、治療効果を生むために有効な最も少ない用量である化合物量であろう。このような有効量は一般に、上で解説した因子に依拠するであろう。投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内、又は皮下によることが好ましく、好ましくは標的部位の近位に投与するとよい。必要に応じ、治療用組成物の有効な一日分の用量を、2回、3回、4回、5回、6回又はそれ以上の小分けした用量に分けて別々に、全日にわたって適当な間隔を置きながら、選択的には単位剤形で投与するとよい。本発明の化合物を単独で投与することも可能であるが、本化合物を医薬調合物(組成物)として投与することが好ましい。

30

【0194】

ある実施態様では、本発明に基づくヒトモノクローナル抗体を、例えば 200乃至 400 mg/m² など、10 乃至500 mg/m² の週間投薬量で輸注により投与してもよい。このような投与は、例えば3乃至5回など、例えば1乃至8回まで、繰り返してもよい。該投与を、例えば2乃至12時間など、2乃至24時間にわたる継続的輸注で行ってもよい。

【0195】

別の実施態様では、毒性の副作用を減らすために、本ヒトモノクローナル抗体を、例えば24時間を超えてなど、長時間にわたる遅い継続的輸注で投与してもよい。

40

【0196】

さらに別の実施態様では、本ヒトモノクローナル抗体を、例えば300 mg、500 mg、700 mg、1000 mg、1500 mg 又は2000 mgなど、250mg乃至2000magの週間投薬量で、例えば4乃至6回など、最高8回までで投与する。該投与を、例えば2乃至12時間など、2乃至24時間にわたる継続的輸注で行ってもよい。このような投与養生法を、必要に応じて、例えば6ヶ月後又は12ヶ月後など、一回以上、繰り返してもよい。投薬量は、本CD20抗体を標的決定する抗イディオタイプ抗体を用いることにより、生物学的試料に入れて投与したときの血中のモノクローナル抗CD20抗体の量を測定することにより、決定又は調節することができる。

50

【0197】

さらに別の実施態様では、本ヒトモノクローナル抗体を、例えば6ヶ月以上の期間にわたって週1回など、維持療法で投与する。

【0198】

さらに別の実施態様では、本発明に基づくヒトモノクローナル抗体を、CD20に対するヒトモノクローナル抗体の一回の輸注に続き、放射性同位体に結合させた抗CD20に対するヒトモノクローナル抗体を輸注するステップを含む養生法により、投与してもよい。該養生法を、例えば7乃至9日後など、この養生法を、例えば7乃至9日後に繰り返してもよい。

【0199】

治療用組成物は当業で公知の医療器具を用いて投与できる。例えばある好適な実施態様では、本発明の治療用組成物を、例えば米国特許第5,399,163号；第5,383,851号；第5,312,335号；第5,064,413号；第4,941,880号；第4,790,824号；又は第4,596,556号に開示された器具などの無針皮下注射器具で投与することができる。本発明で有用な公知のインプラント及びモジュールの例には、制御された速度で薬品を分配するインプラント可能なマイクロ輸注ポンプを開示する米国特許第4,487,603号；薬品を皮膚を透過させて投与する治療器具を開示する米国特許第4,486,194号；精確な輸注速度で医薬を送達する医療用輸注ポンプを開示する米国特許第4,447,233号；継続的な薬物送達のための可変流量式のインプラント可能な輸注装置を開示する米国特許第4,447,224号；多チャンバ・コンパートメントを有する浸透圧薬物送達系を開示する米国特許第4,439,196号；及び浸透圧薬物送達系を開示する米国特許第4,475,196号、がある。これらの特許を引用をもってここに援用することとする。数多くの他のこのようなインプラント、送達系、及びモジュールが当業者に公知である。

10

20

【0200】

いくつかの実施態様では、本発明のヒトモノクローナル抗体を、*in vivo*で確実に適正に分布するように調合することができる。例えば血液脳関門(BBB)は数多くの親水性化合物を排除する。本発明の治療用化合物がBBBを確実に透過するようにする(望ましい場合)には、これらを例えばリポソーム中に調合することができる。リポソームの製造方法については、例えば米国特許第4,522,811号；第5,374,548号；及び第5,399,331号を参照されたい。前記リポソームは、特定の細胞又は臓器に選択的に輸送されて目的の薬物送達を高めるような1つ以上の成分を含んでいてもよい

30

(例えばV.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685)。標的決定成分の例には、葉酸又はピオチン(例えばLow et al.の米国特許第5,416,016号を参照されたい)；マンノシド(Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038)；抗体(P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140；M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180)；その様々な種が本発明の調合物や、本発明の分子の構成成分を成していてもよいサーファクタントプロテインA受容体

(Briscoe et al. (1995) *Am. J. Physiol.* 1233:134)；p120(Schreier et al. (1994) *J. Biol. Chem.* 269:9090)；があり、さらにK. Keinanen；M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346:123；J.J. Killian；I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4:273を参照されたい。

本発明の一実施態様では、本発明の治療用化合物をリポソーム中に調合する。より好適な実施態様では、当該リポソームが標的決定成分を含む。最も好適な実施態様では、当該リポソーム中の治療用化合物を、腫瘍又は感染に近位の部位への大量注射により送達する。当該組成物は、注射筒での注入が容易な程度に流動性でなくてはならない。それは、製造及び保管条件下で安定でなくてはならず、細菌及び真菌などの微生物の汚染作用から守られていなくてはならない。

40

【0201】

更なる実施態様では、本発明のヒトモノクローナル抗体を、胎盤を通るそれらの輸送を妨げる又は減らすように調合することができる。これは、例えば抗体のPEG化や、又はF(ab)₂'フラグメントを用いるなど、当業で公知の方法により行うことができる。更に、"Cunningham-Rundles C, Zhuo Z, Griffith B, Keenan J. (1992) *Biological activities of p*

50

olyethylene-glycol immunoglobulin conjugates. Resistance to enzymatic degradation. J Immunol Methods. 152:177-190; and to "Landor M. (1995) Maternal-fetal transfer of immunoglobulins, Ann Allergy Asthma Immunol 74:279-283を参照することができる。これは、当該の抗体を、再発性自然流産を治療又は防止するために用いる場合に特に関係する。

【0202】

腫瘍の治療のための「治療上有効量」は、完全でも、又は部分的でもいい他覚的腫瘍応答により測定することができる。完全応答（CR）は、疾患の非臨床的、放射線学的又は他の証拠であると定義されている。部分的応答（PR）は、腫瘍の凝集物の大きさの50%を越える減少が原因で起きる。悪化までの中央値時間は、他覚的腫瘍応答の時間的長さを特徴付ける測定値である。

10

【0203】

また、腫瘍治療にとっての「治療上有効な投薬量」は、疾患の進行を安定化させるその力によっても、測定することができる。ある化合物の癌阻害能は、ヒト腫瘍での効験を予測する動物モデル系で評価することができる。代替的には、ある組成物のこのような特性を、当該化合物の細胞成長もしくはアポトーシス阻害能を調べたり、又は、当業者に公知の *in vitro* 検定法により、評価することができる。治療用化合物の治療上有効量は、対象において腫瘍の大きさを減らすか、又は、症状を改善することができるものである。当業者であれば、対象の体格、対象の症状の重篤度、及び選択された特定の組成物又は投与経路といった因子に基づいて、このような量を決定できよう。

20

【0204】

リウマチ性関節炎にとっての「治療上有効な投薬量」は、好ましくは、患者において ACR 20の改善の予備的定義（Preliminary Definition of Improvement）、より好ましくはACR 50の改善の予備的定義（Preliminary Definition of Improvement）、そしてさらにより好ましくは、ARC70の改善の予備的定義（Preliminary Definition of Improvement）をもたらすものであろう。

【0205】

ACR20の改善の予備的定義（Preliminary Definition of Improvement）は：
= 軟弱関節得点（TCJ）及び膨張性関節得点（SWJ）における20%の改善及び以下の五つの評価点のうち3つにおける 20%の改善：患者疼痛評価（VAS）、患者包括的評価（VAS）、担当医包括的評価（VAS）、患者自己評価による能力障害（HAQ）、急性相反応物（CRP 又は ESR）、と定義されている。

30

【0206】

ACR50及びACR70は、同じ方法でそれぞれ 50% 及び 70%の改善と定義されている。更なる詳細については、Felson et al. in American College of Rheumatology Preliminary Definition of Improvement in Rheumatoid Arthritis; Arthritis Rheumatism (1995) 38: 727-735を参照されたい。

【0207】

本組成物は、無菌、かつ、本組成物を注射筒で送達可能な程度に流動性でなくてはならない。当該の担体は、水に加え、等張の緩衝生理食塩水、エタノール、ポリオール（例えばグリセロール、プロピレングリコール、及び液体ポリエチレングリコール等）、及びこれらの適した混合物であってよい。適正な流動性は、例えばレシチンなどのコーティングを用いたり、分散液の場合には必要な粒子サイズを維持したり、そして界面活性剤を利用するなどにより、維持できる。多くの場合、糖類、マンニトール又はソルビトールなどの多価アルコール、及び塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物中に含めることが好ましい。注射可能な組成物の長期吸収は、モノステアリン酸アルミニウム又はゼラチンなど、吸収を遅らせる物質を組成物中に含めると、可能である。

40

【0208】

活性化合物を上述のように適切に保護すれば、当該化合物を、例えば不活性の希釈剤又は同化可能な食用担体と一緒に経口投与してもよい。

50

【0209】

VI. 発明の用途及び方法

本発明のヒト抗体（ここで解説された免疫複合体、二重特異的 / 多重特異的物質、組成物及び他の誘導体）は、CD20を発現する細胞の関与する診断及び治療を含め、*in vitro* 及び *in vivo* で診断上及び治療上の数多くの実用性を有する。例えば本抗体を、多種の疾患を治療、予防又は診断するために、*in vitro* 又は *ex vivo* などの培養中の細胞や、又は、*in vivo* でなどヒト対象に投与することができる。ここで用いる用語「対象」には、CD20に対するヒト抗体に応答（正常又は悪性）するヒト及び非ヒト動物が包含されるものと、意図されている。好適な対象には、B細胞を阻害又は制御することにより是正又は改善することのできる以上を有するヒトの患者が含まれる。

10

【0210】

例えば、ある実施態様において、本発明のヒト抗体を用いて、NHLなどのB細胞リンパ腫を含め、CD20を発現する腫瘍細胞の存在を特徴とする異常など、腫瘍化異常のある対象を治療することができる。治療及び / 又は防止の可能な腫瘍化疾患の例には、前駆B細胞リンパ芽球性白血病 / リンパ腫を含め、NHLなどのB細胞リンパ腫及び成熟B細胞新生物、例えばB細胞慢性リンパ球性白血病 (CLL) / 小リンパ球性リンパ腫 (SLL)、B細胞プロリンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、外套細胞リンパ腫 (MCL)、低級、中級及び高級FLを含む濾胞性リンパ腫 (FL)、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫 (MALT型、結節性及び脾性)、ヘアリーセル白血病、びまん性大B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髄腫、移植後リンパ増殖異常、ワルデンストレーム大グロブリン血症、及び異形成性大細胞リンパ腫 (ALCL)、がある。

20

【0211】

B細胞非ホジキンリンパ腫の更なる例は、リンパ腫様肉芽腫症、原発性浸出リンパ腫、血管内大B細胞リンパ腫、縦隔大B細胞リンパ腫、重鎖疾患（ λ 、 μ 及び δ 疾患を含む）、免疫抑制剤による治療で誘導されるリンパ腫、例えばシクロスポリン誘導性リンパ腫、及びメトトレキサート誘導性リンパ腫、である。

【0212】

更なる実施態様では、本発明のヒト抗体を用いてホジキンリンパ腫を治療することができる。

【0213】

CD20発現B細胞が関与する、治療及び / 又は予防の可能な免疫異常の例には、自己免疫異常、例えば乾癬、乾癬性関節炎、皮膚炎、全身性強皮症及び硬化症、炎症性腸疾患 (IBD)、クローン病、潰瘍性大腸炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、腎炎、湿疹、喘息、アテローム性硬化症、白血球接着不全、多発性硬化症、レイノー症候群、シェーグレン症候群、若年発症性糖尿病、ライター病、ベーチェット病、免疫複合体腎炎、IgAニューロパチー、IgM多発性神経炎、免疫媒介血小板減少症、例えば急性特発性血小板減少性紫斑病及び慢性特発性血小板減少性紫斑病、溶血性貧血、重症筋無力症、ループス腎炎、全身性エリテマトーデス、リウマチ性関節炎 (RA)、アトピー性皮膚炎、天疱瘡、グレーブズ病、橋本甲状腺炎、ウェグナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性感染性単核細胞症、HIV、及び疱疹ウイルス関連疾患、がある。更に、B細胞のウイルス感染により引き起こされる又は媒介される他の疾患及び異常は、更なる例は、重症急性呼吸窮迫症候群及び舞蹈病網膜炎である。更に、他の疾患及び異常には、エプスタイン - バーウイルス (EBV) 等、B細胞のウイルス感染によって引き起こされる又は媒介されるものがある。

30

40

【0214】

自己抗体及び / 又は過剰なBリンパ球活性が顕著であり、治療及び / 又は予防の可能な炎症性、免疫及び / 又は自己免疫異常の更なる更なる例には、以下のものがある：

脈管炎及び他の血管障害、例えば顕微鏡的多発性血管炎、チャージ - ストラウス症候群、及び他のANCA関連脈管炎、結節性多発性動脈炎、本態性クリオグロブリン血性脈管炎、皮膚白血球性 (leukocytoclastic) 血管炎、川崎病、高安動脈炎、巨細胞性関節炎、ヘノッ

50

ホ - シェーンライン紫斑病、原発性又は孤立性脳血管炎、結節性紅斑、閉塞性血栓動脈炎、血栓性血小板減少性紫斑病（溶血性尿毒症症候群を含む）、及び（B型肝炎、C型肝炎、ワルデンストレーム大グロブリン血症、B細胞新形成、リウマチ性関節炎、シェーグレン症候群、又は全身性エリテマトーデスに続発する）皮膚白血球性血管炎を含む続発性脈管炎；更なる例は、結節性紅斑、アレルギー性脈管炎、皮下脂肪組織炎、ウェーバー・クリスチャン病、高グロブリン血症性紫斑病、及びバージャー病；

皮膚障害、例えば接触性皮膚炎、線形IgA皮膚病、白斑、壊疽性膿皮症、後天性表皮水疱症、尋常性天疱瘡（癬痕性類天疱瘡及び水疱性類天疱瘡を含む）、円形脱毛症（全身性脱毛症及び完全脱毛症を含む）、疱疹状皮膚炎、多形性紅斑、及び慢性自己免疫蕁麻疹（血管運動神経性浮腫及び蕁麻疹性脈管炎を含む）；

免疫媒介性血球減少症、例えば自己免疫血球減少症、及び赤血球系無形成症；

結合組織異常、例えばCNSルーパス、円板状エリテマトーデス、CREST症候群、混合型結合組織病、多発性筋炎/皮膚筋炎、封入体筋炎、アミロイド症、I型及びII型クリオグロブリン血症、結合組織炎、リン脂質抗体症候群、続発性血友病、再発性多発性軟骨炎、サルコイドーシス、スティッフマン症候群、及びリウマチ熱；であり、更なる例は、酸親和性筋膜炎；

関節炎疹、例えば強直性脊髄炎、若年性慢性関節炎、成人スティール病、及びSAPHO症候群；であり、更なる例は仙腸骨炎、反応性関節炎、スティール病、及び痛風；

血液異常、例えば再生不良性貧血、原発性溶血性貧血（寒冷凝集素症候群を含む）、CLL又は全身性エリテマトーデスに続発する溶血性貧血；POEMS症候群、悪性貧血、及びワルデンストレーム高グロブリン血症性紫斑病であり；更なる例は無顆粒球症、自己免疫性好中球減少症、フランクリン病、セリグマン病、 μ 鎖病、胸腺腫及びリンパ腫に続発するパラネオプラスチック症候群、及びV I I I因子阻害物質形成；

内分泌障害、例えば多発性内分泌障害、及びアジソン病であり；更なる例は自己免疫性低血糖症、自己免疫性甲状腺機能低下症、自己免疫性インシュリン症候群、ド・ケルヴァン甲状腺炎、及びインシュリン受容体抗体媒介性インシュリン抵抗性；

肝 - 胃腸管異常、例えばセリアック病、ウィップル病、原発性胆汁性肝硬変、慢性進行性肝炎、及び原発性硬化性胆管炎であり；更なる例は、自己免疫性胃炎；

ネフロパチー、例えば急速進行性腎炎、後連鎖球菌腎炎、グッドパスチャー症候群、膜性系球体腎炎、及びクリオグロブリン性腎炎であり；更なる例は微小変化疾患；

神経障害、例えば自己免疫ニューロパチー、多発性単神経炎、ランバート - イートン筋無力症候群、シドナム舞踏病、脊髄癆、及びギラン - バレー症候群；であり；更なる例は、ミエロパチー/熱帯痙攣性麻痺、重症筋無力症、急性炎症性脱髄性多発性神経炎、及び慢性炎症性脱髄性多発性神経炎；

心臓及び肺の異常、例えば線維化性肺胞隔炎、閉塞性細気管支炎、アレルギー性アスペルギルス症、嚢胞性線維症、レフレル症候群、心筋炎、及び心膜炎；があり、更なる例は、過敏性肺炎、及び肺癌に続発するパラネオプラスチック症候群であり；

気管支喘息及び高IgE症候群などのアレルギー性異常があり；更なる例は一過性黒内障であり；

特発性脈絡網膜炎などの眼科系異常；

パルボウイルスB感染などの感染性疾患（ハンズ・アンド・ソックス（原語：hands-and-socks）症候群を含む）；

再発性流産、再発性胎児消失、及び子宮内成長遅延などの婦人科系 - 産科異常；更なる例は婦人科系新生物に続発する経産婦新生物障害；

精巣新生物に続発する腫瘍随伴性症候群などの男性生殖異常；

同種異系移植片及び異種移植片拒絶、及び移植片対宿主疾患などの移植由来異常、がある。

【 0 2 1 5 】

ある実施態様では、当該の疾患は、潰瘍性大腸炎、クローン病、若年発症性糖尿病、多発性硬化症、免疫媒介性血小板減少症、例えば急性特発性血小板減少紫斑病及び慢性特発性

10

20

30

40

50

血小板減少紫斑病、溶血性貧血（自己免疫溶血性貧血）、筋無力症、全身性硬化症、及び尋常性天疱瘡から選択される炎症性、免疫及び/又は自己免疫異常である。

【0216】

別の実施態様では、本発明のヒト抗体を用いて、CD20のレベル、又は、膜表面上にCD20を含有する細胞のレベルを検出することができ、その後このレベルを特定の疾患症状に結び付けることができる。代替的には、本抗体を用いて、CD20発現細胞の機能を枯渇させ又はCD20発現細胞の機能と相互作用することで、これらの細胞を、当該疾患の重要な媒介物質とすることができる。これは、試料及びコントロール試料を、本抗CD20抗体に、本抗体とCD20との間の複合体形成が可能な条件下で接触させることにより、達成することができる。本抗体とCD20との間で形成されたいずれかの複合体を検出し、試料及びコントロール間で比較する。

10

【0217】

本発明のヒト抗体は、まず、治療上又は診断上の使用に伴う結合活性について *in vitro* で検査することができる。例えば、本抗体を、下記の実施例で解説するフローサイトメトリ検定法を用いて検査することができる。さらに、CD20発現細胞の成長及び/又は致死の阻害を含め、少なくとも1つのエフェクタ媒介性エフェクタ細胞活性を惹起する上での本抗体の活性を検定することができる。例えば、本抗体のCDC及び/又はアポトーシス惹起能を検定することができる。CDC、同型接着、分子集合又はアポトーシスに関して検定するためのプロトコルは下記の実施例で解説されている。

【0218】

本発明のヒト抗体は、さらに、多種のCD20関連疾患の治療及び診断において更なる実用性を有する。例えば、本ヒト抗体を用いて、以下の生物学的活性のうちの1つ以上を *in vivo* 又は

20

in vitro で惹起することができる：CD20発現細胞の成長及び/又は分化を阻害する；CD20発現細胞を致死させる；ヒトエフェクタ細胞の存在下でCD20発現細胞の貪食又はADCCを媒介する；補体の存在下でCD20発現細胞のCDCを媒介する；CD20発現細胞のアポトーシスを媒介する；同型接着を誘導する；及び/又はCD20結合時に脂質ラフトへの転位を誘導する。

【0219】

ある具体的な実施態様では、本ヒト抗体を、多種のCD20関連疾患を治療、予防又は診断するために *in vivo* で用いる。CD20関連疾患の例には、とりわけ、B細胞リンパ腫、例えばNHL、及び免疫疾患、例えば上に挙げたものなどの自己免疫疾患、がある。

30

【0220】

ある具体的な実施態様では、本発明の抗体を用いて、本抗体がCD20担持腫瘍細胞を枯渇させる場合にはNHLを治療又は予防する。

【0221】

非ホジキンリンパ腫は、B細胞リンパ腫の一種である。B細胞リンパ腫などのリンパ腫は、リンパ球（血球）が悪性になったときに生じる一群の関連する癌である。リンパ球の正常な機能は、侵入物；ばい菌、ウイルス、真菌、さらに癌、から身体を防御することである。リンパ球には数多くのサブタイプ及び成熟段階があり、従って多種のリンパ腫がある。正常細胞同様に、悪性のリンパ球は身体の数多くの部分に移動することができる。典型的には、リンパ腫はリンパ系：骨髄、リンパ節、脾臓、及び血液、中で腫瘍を形成する。しかしながら、これらの細胞は他の器官に泳動する場合がある。特定の種類のリンパ腫は、正常な形の細胞が常在する位置で成長する傾向がある。例えば、濾胞性NHL腫瘍はリンパ節でよく発達する。

40

【0222】

CD20は通常、NHLに関連する新生物（即ち腫瘍原性）B細胞上に高レベルで発現する。従って、本発明のCD20結合抗体を用いて、NHLにつながるCD20担持腫瘍細胞を枯渇させることができ、従ってこの疾患を予防又は治療するために用いることができる。

【0223】

50

本発明のヒト抗体（例えばヒトモノクローナル抗体、多重特異的及び二重特異的分子）は、CD20の他の効果を遮断又は阻害するためにも用いることができる。例えばCD20は、Bリンパ球上に発現し、これらの細胞の増殖及び/又は分化に関与していることが公知である。Bリンパ球は免疫モジュレーターとして機能するため、CD20は、自己免疫異常に関与する、Bリンパ球を不活性化又は致死させるなど、Bリンパ球を標的決定するための抗体媒介性治療法の重要なターゲットである。このような自己免疫異常には、例えば上に挙げた疾患がある。

【0224】

本発明の抗体組成物（例えばヒトモノクローナル抗体、多重特異的及び二重特異的分子並びに免疫複合体）を *in vivo* 及び *in vitro* で投与する適した経路は当業で公知であり、当業者が選択することができる。例えば、本抗体組成物を注射（例えば静脈内又は皮下）投与することができる。用いられる分子の適した投薬量は、対象の年齢及び体重や、本抗体組成物の濃度及び/又は処方に依存するであろう。さらに、腫瘍の大きさを判定でき、適した投薬量を計算するために用いることができる。

10

【0225】

前に解説したように、本発明のヒト抗CD20抗体を、例えば細胞傷害性作用薬、放射毒性作用薬又は免疫抑制剤など、一種以上の他の治療薬と一緒に同時投与することができる。本抗体を作用薬に（免疫複合体として）連結することも、あるいは、当該作用薬とは別に投与することもできる。後者の場合（別の投与）、本抗体を、当該作用薬の前、後又は同時に投与することも、あるいは、放射線などの抗癌治療法など、他の公知の治療法と同時投与することもできる。このような治療薬には、とりわけ、ドキソルビシン、シスプラチン、ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、及びシクロホスファミドなどの抗新生物作用薬がある。本発明のヒト抗CD20抗体の、化学療法薬との同時投与により、ヒト腫瘍細胞に対して細胞傷害性効果を生ずる異なる機序で働く二種抗癌薬が提供される。このような同時投与は、薬物耐性の発生や、又は、腫瘍細胞を本抗体に対して非反応性にするであろう抗原性変化を原因とする問題を解決することができる。

20

【0226】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）に連結させたエフェクタ細胞など、標的特異的エフェクタ細胞を治療薬として用いることもできる。標的決定するエフェクタ細胞は、マクロファージ、好中球又は単球などのヒト白血球であってよい。他の細胞には、好酸球、ナチュラルキラー細胞及び他のIgG-もしくはIgA-受容体担持細胞、がある。好ましければ、エフェクタ細胞を、治療しようとする対象から得ることができる。標的特異的エフェクタ細胞は、生理学的に許容可能な溶液による細胞懸濁液として投与することができる。投与される細胞数は、 10^8 乃至 10^9 の桁でよいが、治療目的に応じて様々であろう。一般的には、当該の量は、CD20発現腫瘍細胞などの標的細胞への局在化や、貪食などによる細胞致死を行わせるために十分なものであろう。投与経路も様々であってよい。

30

【0227】

標的特異的エフェクタ細胞による治療法は、標的決定された細胞を除去する他の技術と併用して行うことができる。例えば、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）、及び/又は、これらの組成物で武装化させた抗腫瘍治療法は化学療法と併用することができる。加えて、併用療法を、2つの異なる細胞傷害性エフェクタ集団に腫瘍細胞拒絶を命令するために用いてもよい。例えば、抗Fc γ R1又は好CD3に連結させた抗CD20抗体を、IgG-もしくはIgA-受容体特異的結合剤と併用してもよい。

40

【0228】

本発明の二重特異的及び多重特異的分子は、細胞表面上の受容体をキャップする又は消失させるなどにより、エフェクタ細胞上のFc γ R又はFc γ Rレベルを調節するためにも用いることができる。抗Fc受容体の混合物もこの目的のために用いることができる。

【0229】

補体に結合するIgG1、-2、又は-3又はIgM由来の部分など、補体結合部位を有する本発明

50

の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子並びに免疫複合体）も、補体の存在下で用いることができる。ある実施態様では、標的細胞を含む細胞集団を本発明の結合剤及び適したエフェクタ細胞で *ex vivo* 処理する方法を、補体又は補体含有血清の添加により、補うことができる。本発明の結合剤で被覆した標的細胞の貪食は、補体タンパク質の結合により、向上させることができる。別の実施態様では、本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）で被覆した標的細胞も、補体により溶解させることができる。さらに別の実施態様では、本発明の組成物は補体を活性化しない。

【0230】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子並びに免疫複合体）を、補体と一緒に投与することもできる。従って、本発明の範囲内には、ヒト抗体、多重特異的もしくは二重特異的分子及び血清又は補体を含む組成物がある。これらの組成物は、当該の補体が、本ヒト抗体、多重特異的もしくは二重特異的分子に近い位置にあるという点で有利である。代替的には、本発明の本ヒト抗体、多重特異的もしくは二重特異的分子及び補体又は血清を別々に投与することができる。本発明の組成物の標的細胞への結合により、CD20抗原 - 抗体複合体の、細胞膜の脂質ラフトへの転位が起きる。このような転位の結果、高密度の抗原抗体複合体が生じて、CDCを効率的に活性化及び / 又は向上させるであろう。

【0231】

さらに本発明の範囲内には、本発明の抗体組成物（例えばヒト抗体及び免疫複合体）及び使用に関する指示を含むキットがある。本キットには、さらに、例えば免疫抑制性試薬、細胞傷害性作用薬又は放射毒性作用薬、又は一種以上の付加的な本発明のヒト抗体（例えば補完的な活性を有するヒト抗体など）など、一種以上の付加的な試薬を含めることができる。

【0232】

従って、本発明の抗体組成物で処理された患者に、本ヒト抗体の治療効果を高める又は増強する、例えば細胞傷害性もしくは放射毒性作用薬などの別の治療薬を（本発明のヒト抗体の投与前、投与と同時、又は投与後に）付加的に投与することができる。

【0233】

他の実施態様では、例えば対象をサイトカリンで治療するなどにより、Fc 又はFc 受容体の発現又は活性を高める又は阻害するなど調節する作用薬で対象を付加的に治療することができる。本多重特異的分子による治療中の投与に好適なサイトカインには、顆粒球コロニ刺激因子（G-CSF）、顆粒球 - マクロファージ・コロニ刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン - （IFN- ）、及び腫瘍壊死因子（TNF）、がある。

【0234】

本発明の組成物（例えばヒト抗体、多重特異的及び二重特異的分子）は、例えばFc R又はCD20を発現する細胞を標識するためなど、このような細胞を標的決定するためにも用いることができる。このような用途の場合、結合剤を、検出の可能な分子に連結することができる。このように、本発明は、Fc R又はCD20など、Fc受容体を発現する細胞を *ex vivo* 又は *in vitro* で局在化する方法を提供するものである。検出可能な標識は、例えば放射性同位体、蛍光化合物、酵素、又は酵素コファクタなどであってよい。

【0235】

ある具体的な実施態様では、本発明は、試料及びコントロール試料を、本抗体又はその部分とCD20との間の複合体形成が可能な条件下で、CD20に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体に接触させるステップを含む、試料中のCD20抗原の存在を検出する、あるいは、CD20抗原の量を測定する、方法を提供するものである。次に複合体の形成を検出するが、このとき、コントロール試料に比較したときの試料の複合体形成の違いは、この試料中のCD20抗原の存在の指標である。

【0236】

他の実施態様では、本発明は、上に解説したヒト抗体を対象に投与することにより、例えば非ホジキンリンパ腫又はリウマチ性関節炎など、対象におけるCD20発現細胞が関与する

10

20

30

40

50

異常を治療する方法を提供するものである。このような抗体及びその誘導体を用いて、例えば増殖及び/又は分化など、特定の異常に関連するCD20誘導性活性を阻害する。本抗体をCD20に接触させる（例えば本抗体を対象に投与するなどにより）と、CD20のkのような活性を誘導する能力が阻害されて、関連する異常が治療される。

【0237】

従って、別の実施態様では、本発明は、NHLなど、CD20発現細胞が関与する腫瘍原性異常を治療又は予防する方法を提供するものである。本方法は、本発明の抗体組成物を対象に、当該異常を治療又は予防するために有効量、投与するステップを含む。本抗体組成物は、単独で投与することも、あるいは、本抗体組成物と結合的又は相乗的に作用してCD20発現細胞が関与する疾患を治療又は予防するような、細胞傷害性もしくは放射毒性作用薬などの別の治療薬と一緒に投与することもできる。ある具体的な好適な実施態様では、非ホジキンリンパ腫を治療する方法を提供するものである。

10

【0238】

別の実施態様では、例えば上に挙げた疾患など、ヒトCD20発現細胞が関与する自己免疫異常を治療又は予防する方法を提供するものである。本方法は、本発明の抗体組成物を当該の異常の治療又は予防するのに有効量、対象に投与するステップを含む。本抗体を単独で投与することも、あるいは、本抗体組成物と結合的又は相乗的に作用して、CD20発現細胞が関与する疾患を治療又は予防するよう作用するような免疫抑制剤などとして、別の治療薬と一緒に投与することもできる。

20

【0239】

さらに別の実施態様では、本発明は、*in vivo* 又は*in vitro*のCD20発現細胞の存在を検出する、又は、量を定量する方法を提供するものである。本方法は、(i)検出可能なマーカに結合させた本発明の組成物（例えば多重もしくは二重特異的分子）を対象に投与するステップ；(ii)前記対象を、前記検出可能なマーカを検出する手段に曝露して、CD20発現細胞を含有する区域を特定するステップ、を含む。

【0240】

さらに別の実施態様では、本発明の免疫複合体を用いて、化合物（例えば治療薬、標識、細胞毒、放射性毒素、免疫抑制剤等）を当該抗体に連結することにより、表面上にCD20を発現させて有する細胞に標的決定することができる。このように、本発明は、リード-ステルンベルグ細胞などの*ex vivo* 又は

30

in vitro のCD20発現細胞を、（例えば放射性同位体、蛍光化合物、酵素、又は酵素コファクタなどの検出可能な標識で）位置確認するための方法を提供するものである。代替的には、本免疫複合体を用いて、細胞毒又は放射性毒素をCD20に標的決定することにより、表面上にCD20を発現させて有する細胞を致死させることができる。

【0241】

本発明を、以下の実施例でさらに解説するが、以下の実施例を更に限定的なものとして捉えられてはならない。

【0242】

Daudi、ARH-77、DOHH、Raji、Ramos-EHRB、及びTanoue B細胞系を、10% ウシ胎児血清（FCS）（カナダ、セント・ブルーノ、ウィセント社、オプティマムC241）2 mM L-グルタミン、100 IU/ml ペニシリン、100 µg/ml ストレプトマイシン、及び1 mM ビルビン酸ナトリウム（すべて、スコットランド、ペーズリー、ライフ・テクノロジーズ、ギブコBRL社）を添加したRPMI1640培養基で培養した。

40

【0243】

SU-DHL-4 B細胞系を、同じ媒質だがビルビン酸ナトリウムのない中で培養した。

【0244】

培養物を、加湿した5%

CO2インキュベータ内で37℃に維持し、分割し、そして80%-90%コンフルエントな時点で採集した。

【0245】

50

培養物を27℃に加湿した5%

CO₂インキュベータ内に維持し、分割し、80-90%コンフルエント時に採集した。培地を1週間に2回、取り替えた。この時点で細胞を分割し、1-1.5 x 10⁶細胞/mlになるように接種して、生存率及び最適な成長を確認した。

【0246】

実施例1 CD20に対するヒト抗体の作製

HCo7及びKMマウス：CD20に対する完全ヒトモノクローナル抗体を、ヒト抗体遺伝子を発現するHCo7及びKMマウスを用いて調製した。KMマウス株において、内因性のマウス・カップ軽鎖遺伝子を、Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820 に解説された通りにホモ接合型破壊し、内因性のマウス重鎖遺伝子を、PCT公報WO 01/09187の実施例1に解説された通りにホモ接合型に破壊した。このマウス株はFishwild

et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に解説された通りのヒトカップ軽鎖導入遺伝子KCo5を持つ。このマウス株は、さらに、WO 02/43478に解説された14番染色体フラグメントhCF(SC20)から成るヒト重鎖トランスクロモソームも持つ。

【0247】

HCo7マウスは、JKD破壊をそれらの内因性軽鎖(カップ)遺伝子に(Chen et al.(1993) EMBO J. 12: 821-830に解説された通りのもの)、CMD破壊をそれらの内因性重鎖遺伝子(WO 01/14424の実施例1に解説された通りのもの)、KCo5ヒトカップ軽鎖導入遺伝子(Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に解説されたもの)、及びHCo7ヒト重鎖導入遺伝子(US 5,770,429に解説されたもの)を持つ。

【0248】

HCo7及びKMマウス免疫化：HCo7及びKMマウスを、ヒトCD20トランスフェクトされたNS/O細胞で免疫した。1回目の免疫処理のために、マウス1匹当たり、1x10⁷個の細胞の150µl PBS溶液を1:1で完全フロイント・アジュバントに混合し、腹腔内(i.p.)注射した。次のi.p.免疫処理は、アジュバントとない同様の量の細胞を用いて行った。融合前の3及び2日間、マウスを0.5 x 10⁷個の細胞のPBS懸濁液で静脈内により追加刺激した。

【0249】

マウスの血清中のヒトCD20を狙った抗体の存在を、フローサイトメトリにより、FACS分析を用い、ヒトCD20をトランスフェクトされたNS/O細胞やCD20陰性親NS/O細胞を用いて観察した。

【0250】

CD20に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製：

マウス脾細胞をHCo7及びKMマウスから単離し、PEGでマウス骨髄腫細胞株に標準的なプロトコルに基づいて融合させた。次に、その結果できたハイブリドーマをヒトIgGの産生についてELISAでスクリーニングし、またCD20特異性について、ヒトCD20をトランスフェクトしたNS/O及びSKBR3細胞を用いてFACS分析によりスクリーニングした。免疫後のマウスの脾臓リンパ球の単個細胞懸濁液を、SP2/O非分泌性マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL 1581)の4分の1の数に50%PEG(シグマ社)で融合させた。細胞をほぼ1x10⁵/ウェルになるように平底微量定量プレートにプレートした後、約2週間、10%

ウシ胎児血清、10%

P388D1(ATCC、CRL TIB-63)調整培地、3-5%オリゲン(IGEN)のDMEM(高グルコース、L-グルタミン及びピルビン酸ナトリウムのメディアテック、CRL 10013)溶液に5mM HEPES、0.055mM 2-メルカプトエタノール、50mg/ml ゲンタマイシン及び1x HAT(シグマ社、CRL P-7185)を加えたものを含有する選択培地でインキュベートした。1-2週間後、細胞を、HATをHTに取り替えた培地で培養した。次に個々の細胞をフローサイトメトリによりヒト抗CD20モノクローナルIgG抗体についてスクリーニングした。広汎なハイブリドーマ成長が起きたら、培地を通常、10乃至14日後に観察した。抗体分泌性ハイブリドーマを取り替え、再度スクリーニングし、そしてまだヒトIgGについて陽性であれば、抗CD20モノクローナル抗体を限界希釈によりサブクロニングした。次に安定なサブクローンをin vitroで培養して少量の抗体を、特徴付け用の組織培養株中に産生させた。親細胞

10

20

30

40

50

の反応性を保持した (FACSにより) 各ハイブリドーマ由来のクローンを 1 つ、選び出した。5-10 個のバイアルの細胞バンクを、各クローン毎に作製し、液体窒素中に保管した。

【 0 2 5 1 】

CD20 / 一次スクリーンに結合するヒトモノクローナル抗体の選抜

抗体のアイソタイプを判定するために、アイソタイプELISAを行った。微量定量プレートのウェルを1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のマウス抗ヒトカッパ軽鎖で、1 ウェル当たり50 μl のPBS溶液にして被覆して、4 で一晩、インキュベートした。5%ニワトリ血清で遮断した後、プレートをその上清及び精製済みアイソタイプ・コントロールと反応させた。次にプレートを周囲温度で1乃至2時間、インキュベートした。次にこのウェルをヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4特異的西洋わさびペルオキシダーゼ結合プローブと反応させた。

10

プレートを展開させ、上述した通りに分析した。

【 0 2 5 2 】

4種類のハイブリドーマ細胞株を作製したが、3つはKMマウスの融合体であり、1つは、以下の抗体を発現するHCo7マウスの融合体である：

2F2：ヌクレオチド配列：配列番号1及び3、並びにアミノ酸配列：配列番号2及び4を持つヒトモノクローナルIgG1、抗体。

4C9：2F2と全く同じアミノ酸配列である配列番号2及び4を持つヒトモノクローナルIgG1、抗体。

7D8：ヌクレオチド配列：配列番号5及び7並びにアミノ酸配列：配列番号6及び8を持つヒトモノクローナルIgG1、抗体。

20

11B8：ヌクレオチド配列：配列番号9及び11並びにアミノ酸配列：配列番号10及び12を持つヒトモノクローナルIgG3、抗体。

【 0 2 5 3 】

用語「2F2」は、ここでは、ハイブリドーマ・クローン2F2由来の抗体と、ハイブリドーマ・クローン4C9由来の同一の抗体の両方を指すために用いられている。

【 0 2 5 4 】

本発明の抗体は、それらが由来するもとのトランスジェニック又はトランスクロモソーマル非ヒト動物により判定される他のアイソタイプに切り換えることができる。本発明のある実施態様では、11B8ヒトモノクローナルIgG3、抗体を、全く同じ V_H 及び V_L 鎖を有するヒトモノクローナルIgG1、に切り換えることができる。別の実施態様では、本2F2 IgG1、抗体又は7D8 IgG1、抗体を、全く同じ V_H 及び V_L 鎖を有するヒトモノクローナルIgG2、IgG4、IgA1、IgA2又はIgEアイソタイプに切り換えることができる。

30

【 0 2 5 5 】

実施例2 CD20に対するヒト抗体の抗体配列決定

V_L 及び V_H 領域の配列決定

RNAの調製：全RNAを、すべてHuMAb CD20ハイブリドーマ細胞株(2F2、7D8及び11B8)の 5×10^6 個の細胞から、RNeasyキット(オランダ、ライズデン、ウェストバーク、キアジェン社)をメーカーのプロトコル通りに用いて調製した。

【 0 2 5 6 】

2F2及び7D8のcDNA調製：RNAの5'-RACE-Ready相補DNA(cDNA)を、1 μg の全RNAから、SMART RACE cDNA増幅キット(クロンテック社)をメーカーのプロトコルに従って用いて調製した。

40

【 0 2 5 7 】

V_H 及び V_L 領域を、アドバンテージHF2 PCRキット(クロンテック社、BD)を用い、そして以下のプライマを用いて増幅した：

V_K RACE2 5' GCA GGC ACA

CAA CAG AGG CAG TTC CAG ATT TC C-カッパにアニール

V_H RACE2 5' GCT GTG CCC

CCA GAG GTG CTC TTG GAG G C_{H1} にアニール

【 0 2 5 8 】

50

11B8のcDNA調製： 118B細胞由来のRNAの相補DNA(cDNA)を、3 μ gの全RNAから、AMVリバー
ス・トランスクリプターゼを緩衝剤(ドイツ、マンハイム、ロシュ・ダイアグノスティッ
クスGmbH社)、オリゴ d(T)₁₅ (米国ウイスコンシン州マジソン、プロメガ社)、dNTP(ド
イツ、マンハイム、ロシュ・ダイアグノスティックス社)及びRNAsin(プロメガ社)と
一緒にメーカーのプロトコル(2000年、バージョン3)に従って用いて調製した。

【0259】

クローニング用のV_H及びV_L領域を増幅するために用いるPCRプライマ:

用いたプライマ対:

V_H: FR1 5' プライマ

AB62 CAg gTK CAg CTg gTg CAg TC

AB63 SAg gTg CAg CTg KTg gAg TC

AB65 gAg gTg CAg CTg gTg CAg TC

10

V_H リーダ5' プライマ

AB85 ATg gAC Tgg ACC Tgg AgC ATC

AB86 ATg gAA TTg ggg CTg AgC Tg

AB87 ATg gAg TTT ggR CTg AgC Tg

AB88 ATg AAA CAC CTg Tgg TTC TTC

AB89 ATg ggg TCA ACC gCC ATC CT

20

V_H 3' プライマ

AB90 TgC CAg ggg gAA gAC CgA Tgg

V_K: FR1 5' プライマ

AB8 RAC ATC CAg ATg AYC CAg TC

AB9 gYC ATC YRg ATg ACC CAg TC

AB10 gAT ATT gTg ATg ACC CAg AC

AB11 gAA ATT gTg TTg ACR CAg TC

AB12 gAA ATW gTR ATg ACA CAg TC

AB13 gAT gTT gTg ATg ACA CAG TC

AB14 gAA ATT gTg CTg ACT CAg TC

30

V_K リーダ5' プライマ

AB123 CCC gCT Cag CTC CTg ggg CTC CTg

AB124 CCC TgC TCA gCT CCT ggg gCT gC

AB125 CCC AgC gCA gCT TCT CTT CCT CCT gC

AB126 ATg gAA CCA Tgg AAg CCC CAg CAC AgC

V_K 3' プライマ

AB16 Cgg gAA gAT gAA gAC AgA Tg

40

但し式中 K = T 又は G、S = C 又はG、R = A 又は G、Y = C 又はT、及びW = A 又はT。

【0260】

2F2及び7D8をクローニングするためのV_H及びV_L領域を増幅するために用いたPCR条件: ポ
リメラーゼ連鎖反応(PCR)をHFポリメラーゼ・ミックス(クロンテック社)をT1サイク
ラ(ウェストバーク、バイオメトラ社)で用いて行った。

【0261】

PCR条件: 94 °C 30 秒、5サイクル

72 °C 1分

50

94 °C 30 秒

70 °C 30 秒 5 サイクル

72 °C 1 分

94 °C 30 秒

68 °C 30 秒 27-30 サイクル

72 °C 1分

【 0 2 6 2 】

11B8をクローニングするためのV_H及びV_L領域を増幅するために用いたPCR条件：ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）をAmpliTaqポリメラーゼ（パーキンエルマ社）をT1 サイクラ（オランダ、ライスデン、ウェストバーグ、バイオメトラ社）で用いて行った。

10

【 0 2 6 3 】

PCRサイクリング・プロトコル：

94 °C 2 分

11 サイクル 94 °C 30 秒

65 °C 30 秒、 1 サイクル毎にマイナス1 °C

72 °C 30 秒

30 サイクル 94 °C 30 秒

55 °C 30 秒

72 °C 30 秒

20

72 °C 10 分

4 °Cまで冷却

【 0 2 6 4 】

pGEMT-ベクタ系 I I（2F2、7D8、及び118B）中のV_H及びV_Lのクローニング：

アガロース・ゲルでPCR産物を分析後、この産物を、QIAEX II ゲル抽出キット（オランダ、ライスデン、ウェストバーグ、キアジェン社）で精製した。各V_H及びV_L領域の2つの個別に増幅したPCR産物をpGEMT-ベクタ系II（プロメガ社）でメーカーのプロトコル（1999年、バージョン6）に従ってクローニングした。

【 0 2 6 5 】

E. coli JM109への形質転換後、個々のコロニを、コロニPCRにより、T7及びSP6プライマを用いて、30回のアニーリング・サイクルを55 °Cで行うことにより、スクリーニングした。コロニからのプラスミドDNAをQiaprep スピン・ミニプレップ・キット（キアジェン社）を用いて精製した。V_H 及びV_L領域をさらに分析するために、Nco1/Not1（オランダ、ライスデン、ウェストバーグ、NE バイオラブズ社）消化を行い、アガロース・ゲル上で分析した。

30

【 0 2 6 6 】

配列決定（2F2、7D8及び118B）：V-領域を、pGEMT-ベクタ系IIでのクローニング後に配列決定した。配列決定は、Baseclear（オランダ、ライデン）で行われた。配列は、生殖細胞V遺伝子配列をVbase

(www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/public/intro.htm).<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase-ok.php?menu=901>. でアライメントすることにより、分析された。

40

【 0 2 6 7 】

得られた配列を図53 - 58に示す。

【 0 2 6 8 】

実施例3 GS-NS/0細胞系での2F2及び118Bの組換え作製

2F2T: 2F2抗体の重鎖及び軽鎖可変領域を、PCRを用いて標準的なクローニング・ベクタであるpGem-5Zf(Promega)から、最適なKozak配列と、GS定常領域ベクタpCON 1f及びpCON（ロンザ社）中で断片をクローニングするのに適した制限部位とを含有するプライマを用いて増幅した。

【 0 2 6 9 】

50

増幅後、当該断片を精製し、クローニング用の制限酵素で消化し、2つのベクタ内に連結した。重鎖可変断片をHind III 及びBsi WI で消化し、予めHind III及びBsi WIで消化してあるpCON 1fベクタ内に連結し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。軽鎖可変断片をHind III 及びApa I で消化し、予めHind III 及び

Apa Iで消化してあるPCON ベクタ内に連結し、アルカリホスファターゼで脱リン酸化した。pCON 1f/可変重及びPCON /可変軽ベクタをそれぞれ図1及び2に示す。形質転換させたE. coli コロニをコロニPCRでチェックし、各重鎖(HC)及び軽鎖(LC)コンストラクトのうちの2つの陽性コロニを、プラスミド単離用に成長させた。これら4つのクローンのうちの単離されたプラスミドを配列決定した配列を確認した。HCクローンの両方と、LCクローンのうちの1つが、正しい配列を有していることが見出された。

10

【0270】

2つのHC及び1つのLCコンストラクトを組み合わせて、LC-HCの2つの組合せを作製し、CHO-K1細胞内に過渡的に同時トランスフェクトして、2F2抗体の適正な産生のためのコンストラクトを確認した。正常な産生レベルには、この発現実験においてすべての組み合わせで到達し、HC及びLCコンストラクトのそれぞれのクローン1つを二重遺伝子ベクタの構築に選んだ。

【0271】

標準的なクローニング法を用いて、重鎖ベクタであるpCON 1f/可変-重鎖由来の完全発現カセットを、軽鎖ベクタであるpCON /可変軽に連結することにより、HC及びLCコンストラクトを二重遺伝子クローニング・ベクタを組み合わせて、pCON 1f/ 2F2と指名した。pCON 1f/ 2F2 ベクタを図3に示す。

20

【0272】

このコンストラクトは再度、CHO-K1細胞での過渡的トランスフェクションで機能検査され、正常な発現レベルを示した。

【0273】

pCON 1f/ 2F2 プラスミドの可変領域を配列決定して、正確な配列を再確認した。

【0274】

pCON 1f/ 2F2 を、非反復制限酵素Pvu Iで消化し、発現に重要な領域の外側で切断することで、直線状のプラスミドを安定なトランスフェクションのために調製した。完全な直線化は、アガロースゲル電気泳動法で確認され、DNAを精製し、使用時まで-20 で保存した。

30

【0275】

NS/O ホスト細胞の6回のトランスフェクションを、プラスミドDNAを用いたエレクトロポレーションにより、上記の直線状DNAプラスミドを用いて行った。トランスフェクション後、細胞を96ウェル・プレートに分配し、インキュベートした。選択培地(10%透析済みウシ胎児血清(dFCS)及び10µMのGS-阻害剤L-メチオニンスルホキシミンを含有するが、グルタミンは含有しない)を加え、プレートを観察して、いつ、非トランスフェクト細胞が死亡してトランスフェクト細胞の焦点距離が残るかを判定した。GSベクタ系に関する更なる詳細については、WO 87/04462を参照されたい。トランスフェクト後のプレートをほぼ3週間、インキュベートして、コロニを形成させた。その結果できたコロニを顕微鏡検査して、コロニが検定にとって適した大きさ(ウェルの底面を60%を越えて覆う)であること、そして、1つのコロニのみが各ウェル中に存在すること、を確認した。436個のトランスフェクタントからの細胞上清をスクリーニングして、集合した抗体について、IgG、 -ELISAで調べた。このデータを用い、111個のトランスフェクタントを、静的培養での進行及び更なる評価に向けて選抜した。選抜された細胞系の培養物を展開させ、低血清含有培地(ウシ胎児血清(BSA)及び添加された1%dFCSを含有する)に適合させ、静的培養での生産性の更なる評価を行った(ELISA及びコンフルエント率の測定)。65個の最もランクの高い細胞系を進行に向けて選抜した。選択された細胞系の生産性の予備評価を、低血清含有培地(BSA及び添加した1%dFCSを含有する)に入れたバッチ震盪フラスコ懸濁液培養株で行った。(ELISAによる)回収抗体濃度及び許容可能な成長特徴に基

40

50

づき、

30個の細胞系を、無血清培地でのバッチ震盪フラスコ懸濁液培養株を用いた更なる評価に向けて選抜した。最高の抗体濃度を生じた10個の細胞系を、更に、無血清培地に入れた複式供給バッチ震盪フラスコ懸濁液培養株で評価した。回収時の産物濃度は、公知の標準的な方法に従って、プロテインA高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により判定された。すべての細胞株が2F2抗体(2F2Tと指名)を、プロテインA HPLCで判定したところ671-1333 mg/Lの範囲の良好な収率で産生した。

【0276】

11B8T: 同様な方法で、GS-NS/0細胞株を、以下のように僅かに本トランスフェクション法を改変して、11B8(11B8Tと指名)の組換え産生のために樹立した。

【0277】

NS/0ホスト細胞のトランスフェクションを4回、プラスミドDNAを用いたエレクトロポレーションにより、上記の直線状DNAプラスミドを用いて行った。その結果できたコロニを顕微鏡検査して、コロニが検定にとって適した大きさ(ウェルの底面を60%を越えて覆う)であること、そして、1つのコロニのみが各ウェル中に存在すること、を確認した後、596個のトランスフェクタントからの細胞上清をスクリーニングして、集合した抗体について、IgG、
、-ELISAで調べた。このデータを用い、100個のトランスフェクタントを、静的培養での進行及び更なる評価に向けて選抜した。選抜された細胞系の培養物を展開させ、低血清含有培地(ウシ胎児血清(BSA)及び添加された1% dFCSを含有する)に適合させ、静的培養での生産性の更なる評価を行った(ELISA及びコンフルエント率の測定)。
60個の最もランクの高い細胞系を進行に向けて選抜し、生産性データが入手できなかった更に13個の細胞系も進行させた。選択された細胞系の生産性の予備評価を、低血清含有培地(BSA及び添加した1% dFCSを含有する)に入れたバッチ震盪フラスコ懸濁液培養株で行った。(ELISAによる)回収抗体濃度及び許容可能な成長特徴に基づき、

30個の細胞系を、無血清培地でのバッチ震盪フラスコ懸濁液培養株を用いた更なる評価に向けて選抜した。最高の抗体濃度を生じた10個の細胞系を、更に、無血清培地に入れた複式供給バッチ震盪フラスコ懸濁液培養株で評価した。回収時の産物濃度は、公知の標準的な方法に従って、プロテインA高速液体クロマトグラフィ(HPLC)により判定された。これに基づき、細胞系のうちの1つを廃棄した。残りの9個の細胞系は、すべて、11B8抗体(「11B8T」と指定)を、プロテインA HPLCで判定したところ354-771 mg/Lの範囲の
良好な収率で産生した。

【0278】

実施例4 ハイブリドーマ由来2F2及びトランスフェクトーマ由来組換え2F2Tの比較

ゲル電気泳動法(SDS-PAGE及び陰性アガロースゲル電気泳動)の使用により、2F2及び2F2Tは同じ大きさであり、電荷が僅かに異なることが示された。

【0279】

さらに、2F2及び2F2Tは、CD20トランスフェクトNS/0細胞及びRaji細胞に、FACScalibur™(米国カリフォルニア州、ベクトン・ディッキンソン社)を用いたフローサイトメトリで測定したところ同じ様な親和性で結合する。非トランスフェクトNS/0細胞への結合は観察されなかったことから、2F2及び2F2Tの特異性が実証された。2F2及び2F2Tはまた、ARH-77細胞(IgG形質細胞白血病)、Daudi細胞、DOHH細胞(濾胞性中心芽細胞性/中心溶解性リンパ腫から進行した難治性免疫芽球性B細胞リンパ腫、ドイツ、ブラウンシュバイグ、DSMZ)、及びRaji細胞において、CDCを濃度依存的な態様で同程度に誘導して、フローサイトメトリによる細胞溶解(PI陽性細胞)を計数する。二番目の実験では、2F2及び2F2Tの濃度を一定に維持し、他方、血清を様々な濃度で加えた。2F2及び2F2T間に有意な違いは観察されなかった。

【0280】

最後に、細胞関連CD20に結合した2F2及び2F2Tは、補体因子C1qに強く、かつ同程度に結合する。本実験はDaudi細胞、DOHH細胞、及びRaji細胞において、フルオレセイン結合抗C1qポリクローナル抗体を、C1qの結合を検出するために用いて行われた。

10

20

30

40

50

【0281】

実施例5：CD20に対するヒト抗体の結合特性

異なる細胞株への結合：NS/0、ヒトCD20をトランスフェクトしたNS/0、Dauidi細胞およびRaji細胞を、2F2、7D8および11B8を含有する培養上清とともに4で30分間インキュベートし、続いて、FITC結合抗ヒトIgG Abとともにインキュベートした。FACScaliburフローサイトメーターを用いたフローサイトメトリーによって結合を評価した。負の対照アイソタイプに対応したサンプルと、蛍光強度を比較した。図4に示すように、3つの抗体は全て、ヒトCD20をトランスフェクトしたNS/0細胞に結合したが、一方、親細胞、非トランスフェクトNS/0細胞に対する結合は認められなかった。3つ全ての抗体は、2つの異なるパーキットリンパ腫B細胞株（RajiおよびDauidi）にも結合した。このことは、2F2、7D8および11B8はCD20特異的であることを示している。7D8または11B8を含有する上清を非飽和条件下で試験した。したがって、2F2と比較してより低い中間蛍光強度が観察される。

10

【0282】

フローサイトメトリーにより測定した2F2のEC₅₀値：ヒトB細胞上で発現したCD20の2F2の見かけのアフィニティーを測定するために、3例のヒトドナーから単離したPBMCと、CD3陰性細胞のゲーティング法を用いて、2F2で結合曲線を作成した。単離したPBMCをある濃度域のFITC標識2F2とともに1時間インキュベートし、FACSで分析し、中間蛍光強度(MFI)を測定した。MFI値を抗体濃度の関数として図5Aおよび5Bに示す。EC₅₀値は、Graph Pad Prism 3.02を用いて、非線形回帰により計算した。ヒトにおける2F2のEC₅₀値は、3ドナー全てについて類似しており、中間値(±s.e.m.)は、287 ± 12.7 ng/ml (1.9 ± 0.1 nM)であった。

20

【0283】

CD20発現細胞に対する¹²⁵I標識mAbsの結合：mAbsを、ヨードビーズ(Iodobeats)(Pierce Chemical Co., Rockford, IL)を用いてヨウ素化した。¹²⁵I標識mAbsを連続的に希釈し、Ramos-EHRB細胞とともに、37で2時間、アジ化ナトリウムおよび2-デオキシグルコースの存在下でインキュベートし、エンドサイトーシスを阻害した。次いで細胞結合した¹²⁵I標識mAbs、および無細胞の¹²⁵I標識mAbsを、フタレートオイルの混合物を介して、14,000 x gで2分間遠心分離し、結合平衡状態を妨害することなく、急速分離させた。結合した抗体とともにペレット化した細胞をガンマカウンター(Wallac UK Ltd, Milton Keynes, UK)を用いて計測した。

30

【0284】

図6に示すように、2F2および11B8は、類似のK_D(もしくは類似の飽和点)を示している。これは、双方の抗体が類似のアフィニティーで結合することを示すものである。しかしながら、11B8は、2F2より低いレベルで飽和する。これは、11B8が異なる形態のCD20を認識することを示している。これはまた、更なる実験にも一致しており、同様のレベルの結合飽和(細胞1個につき約2~3 x 10⁵個の抗体分子)によって示されているように、同様の数の2F2およびリッキシマブ分子がRamos-EHRB細胞およびDauidi細胞上でCD20に結合することを示している。対照的に、11B8およびB1は、このレベルの半分のレベルで飽和し、約1~2 x 10⁵個の抗体分子のみがRamos-EHRB細胞(図7A)およびDauidi細胞(図7B)に結合する。

40

【0285】

ヨウ素化された抗体がFcレセプターを介して結合するという可能性を排除するために、抗CD20F(ab')₂断片を用いた結合曲線を確認した。また、同数の2F2およびリッキシマブ-F(ab')₂断片が、Ramos-EHRB細胞とDauidi細胞の双方に結合した。これらの実験においても、Ramos-EHRBおよびDauidi細胞に結合した2F2またはリッキシマブ抗体分子は、この細胞に結合した11B8およびB1の数の約2倍で飽和状態となった。

50

【0286】

解離速度：m A b sの解離速度を測定するために、R a m o s - E H R B細胞（アジド/2 D O Gの存在下での最終体積：1 m l）を37 で2時間、2 μ g / m lの¹²⁵I m A b sとともにインキュベートし、結合の最大値に達した。微小遠心管（2000 r p mで2分）での遠心分離後、上清を除去し、ペレットを迅速に1 m l培地中に再懸濁させ、すぐに、37 で、15 m l円錐チューブ中の9 m lの培地に移した。次の2時間の間の様々な時点において、0.4 m lのサンプルを除去し、フタレートオイル上で分離し、細胞表面に残る放射線標識したm A b sのレベルを測定した。図8に示すように、2 F 2および11 B 8の双方は、リッキシマブまたはB 1と比較して、C D 20から有意に遅く解離した。

10

【0287】

抗C D 20 F (a b)₂断片の解離速度：2 μ g / m lの、2 F 2、11 B 8およびリッキシマブの¹²⁵I標識F (a b)₂断片をそれぞれ用いて、Ramos-EHBR細胞を飽和状態にした。Ramos-EHBR細胞を高濃度の非標識抗体の存在下で洗浄し、インキュベートした。Ramos-EHBRとの最大の（最初の）結合を100%に設定した。ローディング後、次の3時間の複数の時点において、0.4 m lのサンプルを除去し、フタレートオイル上で分離し、細胞表面に残る放射線標識m A bのレベルを測定した。図9からわかるように、2 F 2および11 B 8は、リッキシマブと比べて、C D 20の表面からはるかにゆっくりと解離した。90分後、約50%のF (a b)₂リッキシマブ分子が細胞に結合したが、F (a b)₂ 2 F 2分子の半分が3時間後に解離した。2 F 2、11 B 8 T、およびリッキシマブのk_d (k_{o f f})値は、以下のように計算する。

20

【0288】

抗C D 20 m A b機能オフ速度：リッキシマブに比べて2 F 2解離速度が遅いことの効果を、機能的C D Cアッセイにおいて評価した。この目的のために、D a u d i細胞またはS U - D H L 4細胞を10 μ g / m lの抗C D 20 m A bまたはアイソタイプ対照抗体とともにプレインキュベートし、洗浄し、さらに別の時点において培地中でインキュベートした。アッセイ開始後のこれらの時点において、サンプルを補体（正常ヒト血清：20 v o l / v o l %）とともにインキュベートし、次いで、さらに45分間37 でインキュベートした。その後、細胞の溶解を、P I（ヨウ化プロビジウム）染色法を用いて、F A C Sで測定した。%溶解細胞（P I陽性細胞）を図10 A（D a u d i細胞）または図10 B（S U - D H L 4細胞）に、インキュベーション時間の関数として示す。2 F 2は、双方の細胞株において高C D Cを誘導し、6時間後、さらに細胞の90%まで溶解した。このことは、細胞のC D 20飽和が十分高く、補体が媒介する、大半の細胞の溶解を誘導したことを示している。対照的に、そして解離速度の研究と一致して、リッキシマブは、急速に細胞から解離し、6時間のインキュベーション後、特異的な溶解を誘導しなかった。11 B 8を対照として使用したが、C D Cを誘導しなかった。

30

【0289】

実施例6：C D 20に対するヒト抗体のC D C

血清の調製：補体溶解のための血清を、健康なボランティアからの血液をオートセップゲルおよび凝固アクチベーターバキュテイナーチューブ（autosep gel and clot activator vacutainer tubes）（BD

40

biosciences, Rutherford, NJ）中に抜き取って調製した。それを室温で30～60分間保持し、次いで3000 r p mで5分間遠心分離を行った。血清を回収し、-80 で保存した。

【0290】

フローサイトメトリー：フローサイトメトリーを行うために、CellQuestプロソフトウェア（BD

Biosciences, Mountain view, CA）とともにFACScaliburフローサイトメーターを用いた。前方側方スキャター（forward sideward scatter）（F C S）閾値を調節することによって細胞残骸を除外しながら、少なくとも5000の現象を分析のために集めた。

50

【0291】

CDCカインティクス：第1の一連の実験（ $n = 3$ ）において、5つの異なるB細胞株、すなわち、Dauidi、SU-DHL-4、Raji、DOHHおよびARH-77のCDCのカインティクスを、ヒト血清を加える10分前に、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の2F2、リッキシマブおよびIgG対照抗体をそれぞれ、添加することによって測定した。CDC誘導後、いくつかの時間間隔で（最大1時間）、細胞をPI溶液中に懸濁させ、細胞溶解（PI陽性細胞の数）をフローサイトメトリーによって測定した。その結果を図11A（ARH-77細胞）、11B（Dauidi細胞）、11C（Raji細胞）、11D（DOHH）および11E（SU-DHL-4）に示す。示されているように、抗体を添加すると、5分以内に、細胞溶解が誘導された。興味深いことに、2F2を添加したところ、5つ全てのB細胞株の80%より多くで、著明な細胞溶解が認められた。リッキシマブは、SU-DHL-4およびDauidi細胞株においてのみ、80%より多くの細胞溶解を誘導した。一方、DOHH細胞株の細胞溶解は、 $\sim 50\%$ であり、ARH-77およびRaji細胞株においては20%未満であった。IgG対照抗体を用いたものでは溶解は認められなかった（図11Bにのみデータを示している）。

10

【0292】

CDC血清滴定：別個の一連の実験（ $n = 5$ ）において、NHS（正常なヒト血清）を、2つの異なる抗体濃度、 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ および $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、で滴定した。ある濃度域のNHSを添加する前に、細胞を2F2またはリッキシマブを用いて10分間ブレインキュベートした。CDCの誘導の45分後、細胞をPI溶液に再懸濁した。細胞溶解（PI陽性細胞の数）をフローサイトメトリーで測定した。図12A～Dは、溶解した（PI陽性）細胞のパーセンテージを、NHS濃度の関数として示している。図12Aは、Dauidi細胞の細胞溶解を示し、図12Bは、ARH-77細胞の細胞溶解を示し、図12Cは、DOHH細胞の細胞溶解を示し、そして、図12Dは、Raji細胞の細胞溶解を示している。NHS濃度を増加させることによって、細胞溶解の増加が観察された。2F2を添加することによって、最も高いNHSおよび抗体濃度で、Dauidi細胞の溶解が最大となった。リッキシマブは、最も高いNHS濃度で、Dauidi細胞の約50%の細胞溶解を誘導した。

20

【0293】

ARH-77細胞においては、NHSおよび2F2の濃度が最も高いときのみ、約75%の細胞溶解が導かれた。抗体濃度が低いと、ARH-77細胞溶解を十分に誘導しなかった。リッキシマブは、本実験においては、ARH-77細胞の溶解を誘導することができなかった。

30

【0294】

2F2は、高濃度および低濃度において、NHS濃度依存性の細胞溶解を誘導することができた。一方、リッキシマブは、これらの条件下で溶解を誘導することができなかった。

【0295】

最後に、2F2は、Raji細胞のNHS濃度依存性の細胞溶解を誘導した。それは、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ のmAbを用いたときのみ明らかであった。リッキシマブを用いたものでは溶解は認められなかった。

40

【0296】

これらの実験においては、アイソタイプ対照抗体を用いた場合、溶解は認められなかった（データは示していない）。

【0297】

CDC抗体滴定：抗CD20抗体が低濃度でCDCを誘導する可能性を測定するために、抗体を滴定する（ $n = 6$ ）実験を行った。種々の細胞株をある濃度域の2F2およびリッキシマブそれぞれとともに、NHSを添加する10分前にブレインキュベートした。37でのインキュベーションの45分後（最大の溶解が生じるとき）、細胞をPI溶液に再懸濁させ、細胞溶解（PI陽性細胞の数）をフローサイトメトリーによって測定した。図13A（Dauidi細胞）、13B（DOHH細胞）、13C（ARH-77細胞）およ

50

び13D (Raji細胞)は、溶解した (PI陽性)細胞のパーセンテージを、抗体濃度の関数として示している。2F2もリッキシマブも、細胞溶解の濃度依存的増加を誘導した。2F2は、 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ のDauidi細胞を添加するとすぐ、80%より多くの細胞溶解を誘導した。一方、リッキシマブを用いた場合、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ を添加した後でさえ、このレベルに到達しなかった。また、2F2は、 $0.4\mu\text{g}/\text{ml}$ で、DOHH細胞の80%を超える溶解を誘導したが、一方、この濃度においてリッキシマブを用いた場合の溶解は最小であった。リッキシマブ (分析される細胞の合計の30%まで)を用いた場合のDOHH細胞の溶解は、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で最大に達した。2F2によるARH-77およびRaji細胞の溶解の誘導は、より低かったが、それでもなお、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗体濃度で70%までの溶解が達成された。最も高い濃度において、リッキシマブは、ARH-77細胞の~23%のみにおいて、Raji細胞の~6%のみにおいて、溶解を誘導した。

10

【0298】

同様の実験において、2F2、2F2T、11B8Tおよびリッキシマブについて、それぞれ、Dauidi細胞株およびRaji細胞株のCDCを誘導する能力を有しているかどうかを調べた。図14Aおよび14B参照。この実験においても、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ で (トランスフェクターマ (transfectoma) 由来の) 2F2Tを用いた場合、Dauidi細胞で80%を超える細胞溶解が認められた。一方、リッキシマブは、 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ においてさえも、溶解は60%に過ぎなかった。図14A参照。2F2Tを用いた場合のDauidi細胞の溶解は、ハイブリドーマ由来の2F2を用いた場合に観察された溶解と同じであった。

20

【0299】

Raji細胞の溶解は、より困難であったが、2F2および2F2Tもまた、Raji細胞の溶解を同程度に誘導した (図14B)。リッキシマブは、Raji細胞のCDCを誘導することができなかった。これは図13Dに示された実験と一致するものである。

【0300】

図14Aおよび14Bからわかるように、Dauidi細胞もRaji細胞も11B8TによるCDCの影響を受けやすかった。B1は、Dauidi細胞の溶解を誘導した (少量に過ぎなかった) が、Raji細胞の溶解を誘導することはできなかった。

【0301】

Dauidi細胞における抗CD20のCDC活性: 各抗体のCDC活性を測定するために、ヨウ化プロビジウム (PI) 染色細胞のFACS分析によって膜透過性の上昇を評価した。簡単に述べれば、Dauidi細胞を洗浄し、RPMI/1%BSA中に 1×10^6 個/mlで再懸濁させた。種々の濃度のヒトモノクローナル抗体をDauidi細胞に添加し、細胞上でCD20に室温で10~15分間、結合させた。その後、補体源としての血清を添加し、最終濃度を20% (v/v) とし、その混合物を37°Cで45分間インキュベートした。次いでその細胞を分析するまで、4°Cで保持した。次いで、各サンプル ($150\mu\text{l}$) を、FACSチューブ中の $10\mu\text{l}$ のPI溶液 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$ のPBS) に添加した。すぐにその混合物をフローサイトメトリーによって評価した。図15Aに示すように、2F2および7D8は、リッキシマブと比較してすぐれたCDC活性を示していた。

30

40

【0302】

第2の実験において、細胞を上記のようにヒトモノクローナル抗体で標識し、洗浄し、PBS中において、ヒト血清を添加する前に、37°Cで45分間インキュベートした。これによって、血清添加時に、細胞に結合する抗体のみが、細胞溶解のための補体を活性化することができることを確認した。図15Bに示すように、2F2および7D8と比較して、リッキシマブにおいて、CDC活性が減少した。これは、ヒト抗体 (2F2および7D8) が血清添加前に細胞を洗浄することによる影響を受けなかったことを示すものである。

【0303】

50

R a j i細胞における抗CD20のCDC活性：CD55およびCD59の表面発現が比較的高く、したがって、補体の攻撃に対する耐性が高い、R a j i細胞を用いてCDC活性を評価した。ヒト抗体をR a j i細胞に添加し、15分間結合させた。ヒト血清(20%)を添加し、その混合物を37℃で45分間インキュベートした。図16Aに示されているように、リッキシマブは、R a j i細胞のCDCの媒介において効果がなかったが、2F2または7D8によってオプソニン化されたR a j i細胞においては、有意なレベルの細胞溶解が発生した。したがって、2F2および7D8は、CD55/59陽性標的細胞を溶解する独自の能力を有している。

【0304】

別の実験において、R a j i細胞を、飽和濃度の抗CD55mAb(最終濃度：5μg/ml)および抗CD59mAb(最終濃度：5μg/ml)とともに、プレインキュベートし、これらの補体防御分子の効果をブロックした。次いで、ヒト抗CD20抗体を、血清(20%)とともに上記のように37℃で45分間添加した。図16Bに示されているように、CD55およびCD59分子の遮断によって、ヒト抗体2F2または7D8では、R a j i細胞のほぼ100%が溶解したが、一方、リッキシマブを用いて観察されたものにおいては、細胞溶解が25%増加したに過ぎなかった。

10

【0305】

補体インヒビターIの役割 - 表面分子の発現：CD55やCD59などの補体インヒビターは、リッキシマブ誘導性CDCに対する感受性において重要な役割を果たしているものであるので、検討中のB細胞株(R a j i、D a u d i、D O H H、A R H - 77およびS U - D H L - 4)上でのこれらの分子の発現を測定するために実験を行った。

20

【0306】

細胞をFITC結合抗CD55抗体、抗CD59抗体および抗CD20抗体で染色し、分子の発現をフローサイトメトリーによって分析した。その結果を下の表1に示す。

【0307】

【表1】

発現	CD20	CD55	CD59
ARH-77	++	++++	++
Raji	+	++	+++
DOHH	++	+++	++
SU-DHL-4	+++	+	++
Daudi	++	+	+

30

【0308】

補体インヒビターIIの役割 - CD55およびCD59のブロッキング：抗CD20誘導CDC中におけるCD55およびCD59の役割をさらに調べるために、CDCの誘導を行う前に(n=3)、双方の補体インヒビター分子を特異的な抗体でブロッキングした。2F2のみでは、部分的な溶解しか誘導されなかったので、R a j i細胞を用いた。R a j i細胞(1×10⁵個/50μl)を、ある濃度域の2F2およびリッキシマブと、抗CD55(5μg/ml)または抗CD59(5μg/ml)抗体とともに用いて、プールされたNHS(20%)を添加する前に10分間プレインキュベートした。CDC誘導の45分後、PI溶液中に細胞を再懸濁させた。細胞溶解(PI陽性細胞の数)をフローサイトメトリーによって測定した。図17A~17Cは、溶解した(PI陽性)細胞のパーセンテージを、抗体濃度の関数として示し、3つの実験のうち1つの実験を例として示している。図17Aは、抗CD55抗体を用いたR a j i細胞のインキュベーション、図17Bは、抗CD59抗体を用いたR a j i細胞のインキュベーション、そして、図17Cは、抗CD55抗体および抗CD59抗体を用いたR a j i細胞のインキュベーション

40

50

を示している。

【0309】

図17Aからわかるように、抗CD55抗体を添加しても、2F2もしくはリッキシマブ誘導CDCに影響がなかった。抗CD59抗体を添加したら、細胞の2F2およびリッキシマブへの感受性が~30%増加した(図17B)。抗CD55および抗CD59を添加したところ、さらに抗CD20誘導性の細胞溶解を~30%高めた(図17C)。

【0310】

フローサイトメトリーIによって測定された補体因子の役割 - C1q結合：抗CD20抗体(2F2およびリッキシマブ)ならびにアイソタイプ対照抗体を種々のB細胞株に添加した。インキュベーションの10分後、NHS(1vol/vol%)を添加した。さらに37で、10分間のインキュベーションを行い、細胞を洗浄した後、上清を捨て、細胞ペレットをFITC結合抗C1q抗体とともにインキュベートした。データは、C1qで染色した細胞の蛍光強度の中間値を示しており、図18A(Daudi)、18B(ARH-77)、18C(DOHH)および18D(Raji)(n=6)に示している。その結果は、検討したB細胞株とは無関係に2F2によるC1qの結合の抗体濃度依存性の上昇を示すものであった。さらに2F2によるC1qの結合は通常、試験した全ての細胞株において、リッキシマブによる結合より高かった。アイソタイプ対照抗体を用いた場合、蛍光の中間値の上昇は認められなかった(データは示していない)。

10

【0311】

フローサイトメトリーIIによって測定された補体因子の役割 - 古典経路を介しての補体の活性化：C4cの抗体が塗布された細胞への固着は、古典経路を介しての補体の活性化を示す。抗CD20抗体(2F2およびリッキシマブ)ならびにアイソタイプ対照抗体を、種々のB細胞株に添加した。37で10分間のインキュベーション後、NHS(1vol/vol%)を添加した。さらなるインキュベーションおよび細胞の洗浄後、上清を捨て、細胞ペレットをFITC結合抗C4c抗体とともにインキュベートした。データは、C4cで染色した細胞の蛍光強度の中間値を示しており、図19A(Daudi)、19B(ARH-77)、19C(DOHH)および19D(Raji)(n=6)に示している。補体因子C4cの2F2への固着は、試験した全てのB細胞株において証明され(n=3)、最大で抗体の1μg/mlに達した。細胞株とは無関係に、2F2結合後のC4cの固着は、リッキシマブ後よりはるかに高かった。アイソタイプ対照抗体を用いた場合、蛍光の中間値の上昇は認められなかった(データは示していない)。

20

30

【0312】

熱不活性化血清中のCDC：細胞(Daudi細胞、ARH-77細胞またはRaji細胞)および抗体(リッキシマブ、2F2、2F2T、11B8、およびアイソタイプ対照抗体HuMab-KLH IgG1)を、ある濃度域の抗CD20抗体で、10分間プレインキュベートした。NHS(活性もしくは30分後57の水浴中で熱不活性化されたもの)を添加した。CDC導入の45分後、細胞をPI溶液中に再懸濁した。細胞溶解(PI陽性細胞の数)をフローサイトメトリーによって測定した。熱不活性化血清の存在下では、用いられた細胞株およびCD20抗体とは無関係に、溶解は観察されなかった。そして、CDCは、熱不活性化血清の存在下では、認められなかった。

40

【0313】

実施例7 CD20に対するヒト抗体のADCC、ADCCアッセイI

ヒト好中球の濃縮：多形核細胞(好中球、PMN)を、ヘパリン化全血から濃縮した。血液をRPMI1640中で2倍に希釈し、フィコール(リンパ球分離培地1077g/ml、710g、RT、20分;BioWhittaker, cat. 17-829E, lot no. 014832)上に重ね、2000rpmで20分間遠心分離を行った。その分子細胞層を除去し、好中球を含むペレット内の赤血球を、氷冷NH₄Cl溶液(155mMのNH₄Cl、10mMのNaHCO₃、0.1mMのEDTA、pH7.4)を用いて低張溶解した。残りの好中球を2回洗浄し、10%FCS(RPMI-10)を添加したRPMI1640中に再懸濁した。

50

【0314】

ヒト抹消血単核細胞の濃縮：ヒト血をRPMI 1640で2倍に希釈し、血液細胞をフィコール（リンパ球分離培地：1077g/ml、710g、RT、20分；BioWhittaker, Cambrex Bio Science Verviers, Verviers, Belgium, cat. 17-829E, lot no. 0148 32）上に重ねた。抹消血単核細胞（MNC）を境界相から回収し、洗浄し、10% FCS、2mMのL-グルタミン、5U/mlのペニシリン、50μg/mlのストレプトマイシン（全てBioWhittakerから入手）を添加したRPMI 1640培養培地中に再懸濁し、それに25mMのHEPES（BioWhittaker）を添加した。

【0315】

ADCCセットアップ：標的B細胞（新鮮に単離されたB細胞もしくはB細胞株からのB細胞）を20μCiの⁵¹Cr（Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden）で2時間標識した。RPMI-10中で集中的に洗浄した後、該細胞を1×10⁵個/mlに調節した。全血または単離されたエフェクター細胞（50μl；MNCs、PMN）または血漿（50μl）、感作抗体（50μl）、およびRPMI-10（50μl）を丸底マイクロタイタープレート（Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany）に添加した。標的細胞（50μl）を最終的な体積が200μlとなるように添加することによって、アッセイを開始した。単離エフェクター細胞については、エフェクター対標的（E:T）の比率40:1を使用した。全血として、推定されたエフェクター対標的（E:T）の比率=40:1に対応する33vol/vol%の量を用いた。インキュベーション（3時間、37℃）後、遠心分離を行ってアッセイを止め、3倍からの⁵¹Cr放出を、シンチレーションカウンターにおいて毎分放射能数（cpm）で測定した。細胞毒性のパーセンテージを下記式から計算した。

【0316】

%相対溶解率 = (実験上のcpm - 基本cpm) / (最大cpm - 基本cpm) × 100
最大⁵¹Cr放出は、標的細胞に過塩素酸（最終濃度3%）を添加することによって測定し、基本放出は、感作抗体およびエフェクター細胞の不存在下で行った。

【0317】

統計：データをワンウェイANOVAによって分析した後、Tukey'sマルチ比較ポストホック試験を行った。分析は、Graph Pad Prism（version 3.02 for Windows（登録商標）、Graph Pad Software, San Diego, CA, USA）を用いて行った。

【0318】

ARH-77細胞の溶解：第1の一連の実験において、ARH-77細胞を標的細胞として用いた（図20）。2F2（n=3）、リッキシマブ（n=3）または11B8T（n=1）を添加した結果、約50%のMNC媒介性のARH-77細胞の溶解が起こった。好中球の存在下では、特異的溶解は認められなかった。（補体の役割を評価するために）血漿を添加したところ、2F2を用いたインキュベーション後、ARH-77細胞の溶解が起こったが、リッキシマブ（p<0.05、2F2対抗体ANOVAなし）または11B8Tを用いたインキュベーション後には起こらなかった。全血の存在下では、2F2（p<0.05、2F2対リッキシマブおよび2F2対抗体ANOVAなし）とともにインキュベーションを行った後、ARH-77細胞の溶解が増加したが、リッキシマブを用いた場合は、認められなかった。リッキシマブによって誘導される特異的溶解は、全血の存在下では実際非常に低かった。11B8Tは、全血の存在下で約25%（n=1）の細胞溶解を誘導した。抗体の不存在下では、10~15%の細胞溶解は認められなかった。

【0319】

B-CLL細胞の溶解：第2の一連の実験において、B-CLL患者から取得した（n=12）慢性Bリンパ球性白血病（B-CLL）細胞を5回サブクロニングし、次いでそれを実験において標的細胞として使用した（図21）。抗体が存在しない場合、特異的溶解は認められなかったが、2F2、11B8Tまたはリッキシマブ（10μg/ml）を添加することによって、MNC媒介性の特異的溶解が10~20%（p<0.001、ANOVA）に上昇した。標的細胞を血漿および2F2とともにインキュベートしたところ

、B - C L L細胞の溶解が誘導された。一方、1 1 B 8 Tまたはリックシマブ ($p < 0.001$ 、ANOVA)を用いた場合、特異的溶解は認められなかった。さらに、2 F 2は、全血におけるインキュベーション後、B - C L L細胞の特異的溶解を媒介した。1 1 B 8 T ($p < 0.01$ 、ANOVA)またはリックシマブ ($p < 0.001$ 、ANOVA)を用いた場合、全血によるB - C L L細胞の特異的溶解が認められた。好中球の存在下では、特異的溶解は認められなかった。

【0320】

リックシマブは、有効なADCCを媒介することができたが、試験される腫瘍細胞のCD Cを媒介することはできないので、全血が誘導する2 F 2によるB細胞溶解は補体を介して媒介されるものであると思われる。

10

【0321】

有毛細胞白血病(HCL)細胞の溶解：第3の一連の実験において、2 F 2、1 1 B 8 TおよびリックシマブによるHCL細胞の溶解を、ADCCにより、または血漿もしくは全血の存在下において測定した。データを図22に示す。一方、好中球は、使用したmAbとは無関係に、ADCCを媒介することができなかった。1 1 B 8 Tは、MNC媒介性のHCL細胞の溶解を2 F 2 ($p < 0.001$ 、ANOVA)やリックシマブ ($p < 0.05$ 、ANOVA)よりも効率的に誘導することができた。2 F 2およびリックシマブは、MNC媒介性のHCL細胞の溶解を誘導することができなかった。血漿媒介性の細胞溶解は、リックシマブ ($p < 0.05$ 、ANOVA)、1 1 B 8 T ($p < 0.01$ 、ANOVA)または抗体なし ($p < 0.001$ 、ANOVA)と比較して、2 F 2によって強く高められた。全血の存在下で、抗CD20によって誘導された溶解を調べたとき、2 F 2は、細胞の完全な溶解を誘導し、それは、リックシマブ ($p < 0.01$ 、ANOVA)、1 1 B 8 Tを用いたとき、または抗体を添加しないとき ($p < 0.001$ 、ANOVA)より優れていた。

20

【0322】

B - A L L細胞の溶解：2例の患者からの細胞を使用して、2 F 2およびリックシマブが、ADCCまたは補体によって、B - A L L細胞の溶解を誘導する能力を調べた(図23)。これまでの実験において観察されているように、2 F 2およびリックシマブは、B - A L L細胞のMNC媒介性のADCCを同程度に誘導した。しかし、ここでも2 F 2は、B - A L L細胞の、血漿媒介性および全血媒介性の溶解を誘導することができたが、リックシマブはできなかった。

30

【0323】

濾胞性リンパ腫細胞の溶解：濾胞性リンパ腫細胞の溶解を調べたとき ($n = 2$)、異なる図形が現れた(図24)。2 F 2を用いた場合、細胞のわずかなPMN媒介性溶解が認められ、2 F 2およびリックシマブは両方とも、MNC媒介性ADCCを誘導することができなかった。なお、1 1 B 8 Tは、約20%のMNC媒介性溶解を誘導することができた。比較的高い血漿媒介性溶解がリックシマブによって誘導されたものの、2 F 2を用いた場合には完全な血漿媒介性の溶解が観察された。全血を用いた場合にも、2 F 2を用いた場合に完全な溶解が認められた。一方、リックシマブを用いた場合、70%の溶解が認められた。最小の血漿媒介性溶解または全血媒介性溶解が、1 1 B 8 Tによって観察された。

40

【0324】

一次外套細胞リンパ腫細胞の溶解：外套細胞リンパ腫細胞の特異的溶解は、誘導することがより困難であった ($n = 1$ 、図25)。PMNまたはMNCおよびCD20mAbs添加後、2 F 2、1 1 B 8 Tまたはリックシマブによる溶解は、わずかに認められるか、または全く認められなかった。しかしながら、2 F 2は依然として、血漿または全血による、約40%の溶解を誘導することができたが、リックシマブを用いた場合、細胞の10~20%が溶解したに過ぎなかった。1 1 B 8 Tは、一次外套細胞リンパ腫細胞を誘導することができなかった。

【0325】

50

全血における抗体濃度依存性の A R H - 7 7 細胞の溶解：更なる実験において (n = 4)、全血の存在下での A R H - 7 7 細胞上での A D C C の誘導に関する用量依存性を分析した。図 2 6 からわかるように、2 F 2 を滴定することによって、A R H - 7 7 細胞の、特異的溶解のパーセンテージが用量依存的に増加した (p < 0 . 0 5 : 治療的に有効な、2 ウェイ A N O V A)。リッキシマブを用いた場合、A R H - 7 7 細胞の特異的溶解は認められなかった。

【 0 3 2 6 】

A D C C アッセイ I

⁵¹Cr 標識標的細胞の調製：A R H - 7 7 細胞および R a j i 細胞を R P M I + + 中に回収し (3 × 1 0 ⁶ 個)、回転させ (1 5 0 0 r p m、5 分間)、1 4 0 μ l ⁵¹Cr (Chromium-51;

10

CJS11-1mCi, バッチ 1 2 ; 1 4 0 μ l、約 1 0 0 μ C i) 中に再懸濁させ、インキュベートした (3 7 °C 水浴、1 時間)。細胞を洗浄した (1 5 0 0 r p m、5 分間、P B S 中、3 ×) 後、細胞を R P M I + + 中に再懸濁させ、トリパンブルー排除処理によって計測した。細胞を 2 × 1 0 ⁴ 個 / m l の濃度とした。

【 0 3 2 7 】

エフェクター細胞の調製：新鮮な抹消血単核細胞 (M N C) を、フィコール (Bio Whittaker; リンパ球分離培地、cat 17-829E) によって、製造元の指示にしたがって、4 0 m l のヘパリン血から単離した。細胞を R P M I + + 中に再懸濁後、細胞をトリパンブルー排除処理によって計数し、細胞を 1 × 1 0 ⁶ 個 / m l の濃度に調節した。

20

【 0 3 2 8 】

A D C C セットアップ：5 0 μ l の R P M I + + を 9 6 ウェルプレートにピペットで移し、5 0 μ l の ⁵¹Cr 標識標的細胞を添加した。その後、5 0 μ l の抗体を添加し、R P M I + + に希釈した (最終濃度：1 0、1、0 . 1、0 . 0 1 μ g / m l)。細胞をインキュベートし (室温、1 0 分)、5 0 μ l のエフェクター細胞を添加した。その結果、エフェクター：標的の比率が 5 0 : 1 となった (最大の溶解を測定するために、エフェクター細胞の代わりに 5 0 μ l の 5 % Triton-X-100 を添加した)。細胞を回転させ (5 0 0 r p m、5 分)、インキュベートした (3 7 °C、5 % C O ₂、4 時間)。細胞を回転させた後 (1 5 0 0 r p m、5 分間) 後、1 0 0 μ l の上清をマイクロニックチューブに回収し、ガンマカウンターで計数した。特異的な溶解のパーセンテージについては以下のように計算した。

30

% 特異的溶解 = (c p m サンプル - c p m 標的細胞のみ) / (c p m 最大溶解 - c p m 標的細胞のみ) × 1 0 0

【 0 3 2 9 】

統計：データをワンウェイANOVAによって分析した後、Tukey'sマルチ比較ポストホック試験を行った。分析は、Graph Pad Prism (Windows (登録商標) 用 version 3.02、Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) を用いて行った。

【 0 3 3 0 】

A R H - 7 7 細胞および R a j i 細胞の抗体濃度依存性溶解：リッキシマブとの比較において、2 F 2 T および 1 1 B 8 T が A R H - 7 7 および R a j i 細胞 (n = 3) の A D C C を誘導する能力を有するかどうかについて試験した。

40

【 0 3 3 1 】

C D 2 0 m A b s についての用量効果関連が、エフェクター細胞として M N C を用いた A R H - 7 7 細胞の A D C C において観察された (図 2 7)。2 F 2 T および 1 1 B 8 T は、A R H - 7 7 細胞の特異的溶解を誘導した。それは、1 0 μ g / m l の m A b のとき最大 (5 0 %) であった。リッキシマブは、標的細胞の 2 5 % を誘導したに過ぎなかった。アイソタイプ対照抗体 (HuMab-KLH) を添加したとき、A D C C を誘導しなかった。M N C を添加しなかった場合、特異的溶解は観察されなかった (データは示していない)。

【 0 3 3 2 】

標的細胞として、R a j i 細胞を用いた場合、A R H - 7 7 細胞を用いたときと同様の図

50

になった(図28)。2F2Tも11B8Tも、MNC媒介性のRaji細胞溶解を誘導した。とはいえ、2F2Tは、低濃度において、11B8Tより力価が高いと思われる。2F2Tおよび11B8Tを用いて達成する溶解の最大値は、約35%であった。標的細胞の20%のみがリキシマブに感受性を示していたにすぎなかったが、リキシマブは、MNC媒介性のRaji細胞溶解を誘導した。アイソタイプ対照抗体(HuMab-KLH)を添加したとき、ADCCを誘導しなかった。MNCを添加しなかった場合、特異的溶解は観察されなかった(データは示していない)。

【0333】

実施例8：FRETおよびTriton-X不溶性分析

蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を調べるためのCy3-およびCy5-結合mAbの調製：モノクローナル抗体を直接、上記のように製造元の指示にしたがって、Cy3およびCy5(Amserham Biosciences UK

Ltd)の二官能性NH₂-エステル誘導体に結合させた。簡単に述べれば、mAbを0.1Mカーボネート/ピカーボネートに対して透析した(pH9)。その後、染料をH₂Oに溶解し、すぐに1mgのmAbに添加し、室温で、暗室で、45分間インキュベートした。PBS中で均衡化させたPD10-Sephadex G25カラムを用いたゲルクロマトグラフィーによって、標識mAbsを未結合の染料から分離した。結合のモル比を、Cy3については $552 = 150 / \text{mM} / \text{cm}$ 、Cy5については、 $650 = 250 / \text{mM} / \text{cm}$ 、タンパク質については、 $280 = 170 / \text{mM} / \text{cm}$ から、分光分析による測定を行った。余剰の染料：タンパク質は、5~8倍の範囲であった。

【0334】

FRET分析：Dauidi細胞を、 5×10^6 個/mlで、PBS/0.1%BSA中で再懸濁させ、等モルドナー(Cy3)結合およびアクセプター(Cy5)結合mAbを組み合わせ、細胞懸濁液に添加した(最終濃度：10 μ g/ml)。細胞を暗室で4または37で30分間インキュベートした。各実験では、等モルの未標識mAbの存在下で、20倍の余剰モルの未結合mAbとともにプレインキュベーションを行った後、細胞をドナー結合およびアクセプター結合mAbで標識した。標識抗原の会合を評価するために、FACScalibur(BD Biosciences)を用いて、フローサイトメトリーによるFRET測定を行った。585nmの蛍光強度(FL2)および650nmの蛍光強度(FL3)(双方とも488nmで励起した)、ならびに661nmの蛍光強度(FL4)(635nmで励起した)を検出し、下記式(式中、Aはアクセプター(Cy5)であり、Dは、ドナー(Cy3)である)からFRETを計算するために用いた。取得した全ての値を、下記式を用いて、自発蛍光のために修正した：

$$\text{FRET} = \text{FL3}(D, A) - \text{FL2}(D, A) / a - \text{FL4}(D, A) / b$$

(式中、 $a = \text{FL2}(D) / \text{FL3}(D)$ 、 $b = \text{FL4}(A) / \text{FL3}(A)$ を表す)

【0335】

単一の標識細胞から集めたデータを用いて修正パラメーターを取得し、サイドアングル(side angle)光散乱を利用して、残骸および死んだ細胞をゲートアウトした。二重に標識された細胞上のドナーmAb誘導体とアクセプターmAb誘導体の間のFRETは、488nmでの発光に敏感なアクセプターに関連して表される。FRET値が大きいときは、ドナー標識抗体とアクセプター標識抗体が、物理的により近接して会合していること、またはドナー標識mAbに近接したアクセプター標識mAbの密度がより高いことを示している。

【0336】

Triton X-100(TX)不溶性による、ラフト会合した抗原の評価：ラフトマイクロドメイン中の抗原の存在の迅速な評価として、前述したように、低温でのTriton X-100(TX)不溶性に基づいたフローサイトメトリー法を用いた。簡単に述べれば、Dauidi細胞をRPMI/1%BSAで洗浄し、 $2.5 \times 10^6 / \text{ml}$ で再懸濁した。その後細胞(100 μ l)を、10 μ g/mlのFITC結合mAbとともに37で15分間インキュベートし、冷PBS/1%BSA/20mMアジ化ナトリウム(

PBS - BS) 中で洗浄し、サンプルを半分に分割した。全てのサンプルを残りのアッセイの間、氷上で維持した。半분을氷上で維持し、100%の表面抗原レベルの計算を行うようにした。一方、他の半分は、0.5% TXで15分間、氷上で処理し、不溶ラフト画分中に残る抗原の割合を計算した。次いで細胞を、残りのアッセイを通して、4 で維持し、PBS - BSで1回洗浄し、PBS - BSに再懸濁させ、フローサイトメトリーによる評価を行った。標的抗原のラフト会合の構成レベルを決定するために、まず細胞を0.5% TXで15分、氷上で処理し、FITC標識mAbの結合前にPBS - BS中で洗浄した。

【0337】

図29A、29Bおよび29に示されているように、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)分析により、2F2または7D8を用いたインキュベーション後、CD20のクラスター化が起こることが示されている。11B8とともにインキュベートした場合、そのようなクラスター化は観察されなかった。これらの結果は、TX処理データ(図29C参照)と一致し(すなわち、2F2および7D8は、11B8とは異なり、結合の後、不溶性画分とともに残留する)、また2F2および7D8は、結合するとすぐ、CD20をB細胞膜の脂質ラフト区画に近づけるといった概念を裏付けるものである。

10

【0338】

図30(ワンウェイANOVA、続いてTukey'sマルチ比較ポストホック試験を用いた3つの実験のFRET値およびs.e.m.)に示されているように、FRET分析は、リッキシマブおよび2F2のクラスター化を示しているが、一方、11B8Tを用いた場合、クラスター化はみとめられなかった。これらのデータは、図31(n=2)に示すように、FITC標識mAbsの結合前に0.5%のTXで処理した後得られたデータと一致している。

20

【0339】

脂質ラフト画分の調製およびウェスタンブロット: CD20と脂質ラフトとの会合を調べるための別の方法は、スクロースの代わりにOptiprep(Sigma)を使用したことを除き、Deans, J.P., et al., J. Biol. Chem., 1998, 273(1):pp 344-348に開示されているスクロース勾配分画法を用いて、ラフトおよび非ラフト膜画分間のCD20のばらつきを調べることである。CD20(10 µg/ml)に対するモノクローナル抗体を、37で20分間、Dauidi細胞(1 × 10⁷)結合させた。このインキュベーション後、細胞をペレット化し、PBSで2回洗浄し、氷冷溶解緩衝液中で溶解した(1.0% TXの入ったMES-緩衝塩(25 mMのMES、pH 6.5、150 mMのNaCl、1 mMのフェニルメチルスルホニル、5 µg/mlのアプロチニン、5 µg/mlのロイペプチン、10 mMのEDTA))。細胞ペレットを完全に再懸濁し、氷上で20分間インキュベートした。その後、溶解物を400 µlの60%の冷Optiprep(Sigma)と混合した。そのサンプルに600 µlの、35%、30%、25%、20%、0%のOptiprepの入ったリシス緩衝液をそれぞれ塗布した。勾配は、40.000 rpm、4 で18時間回転させた。上から6つの画分を回収し、4~15%のSDS-PAGEゲルに溶解し、ニトロセルロース膜に移し、一次抗体(マウス抗CD20ポリ血清、Serotec, UK)、続いてHRP結合2次抗体(ウサギ抗マウスHRP、Jackson, Bar Harbor, Maine, USA)を用いてインキュベートした。プロットは、Supersignal West Dura extended duration substrate(Pierce, Woburn, MA, USA)を用いて視覚化した。

30

40

【0340】

その結果を図32に示している。示されているように、CD20分子は、高密度画分5(未処理の細胞)に限定されている。リッキシマブで処理した細胞は、膜ラフトが沈澱することが期待される場合の画分に一致した、低密度膜画分2および3において有意な割合で、CD20ばらつきにおいて明らかなシフトを示していた。2F2で処理した細胞も、画分2および3に対するこのシフトを示していた。対照的に、11B8Tで20分間処理した細胞は、未処理の細胞、画分5におけるCD20分子と同様のばらつきを示していた。

50

結果として、2F2およびリッキシマブへの結合は、CD20分子の低密度膜画分へのシフトを誘導するが、11B8Tへの結合はそれをしない。

【0341】

実施例9：CD20に対するヒト抗体を用いたパーキット細胞株のアポトーシス

アポトーシス：Dauidi細胞（1mlの組織培養培地中 0.5×10^6 個）を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のmAbまたは対照抗体とともに24ウェル平底プレートに入れ、37℃でインキュベートした。20時間後、細胞を集め、アネキシン-V-FITC結合緩衝液（BD biosciences）で洗浄し、アネキシン V-FITC（BD biosciences）で15分間、暗室で、4℃で標識した。その細胞を分析するまで4℃で保持しておいた。FACSチューブ中で各サンプル（ $150 \mu\text{l}$ ）を $10 \mu\text{l}$ のPI溶液（PBS中 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）に添加した。その混合物をCellQuest pro softwareを備えたFACScaliburフローサイトメーター（BD Biosciences, Mountain view, CA）を用いてローサイトメリーによって即座に評価した。分析のために少なくとも10,000の現象を集めた。

10

【0342】

Dauidi細胞におけるアポトーシスの誘導：Dauidi細胞をCD20に対するヒト抗体（ $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ）の存在下で（2次架橋抗体を添加せずに）、20時間インキュベートした。フローサイトメリーを用いて、アネキシンV/PI染色によりアポトーシスの誘導を調べた。

【0343】

図33A~Gに示すように、11B8は、アポトーシス誘導の明らかな証拠を示している（抗IgM抗体によって誘導されたものと類似する）。2F2および7D8は、Dauidi細胞のアポトーシスを誘導しなかった。アポトーシス誘導性マウス抗CD20抗体、AT80を、対照として用いた。

20

【0344】

Raji細胞におけるアポトーシスの誘導：Raji細胞のアポトーシスの誘導を、ある濃度域のCD20 mAbを用いて調べた。図34は、アネキシン-V-陽性細胞のパーセンテージを示す。図34からわかるように、陽性対照マウス抗ヒトCD20-mAb、B1は、Raji細胞のアポトーシスの濃度依存性の増加を、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のmAbにおいて、最大で約70%誘導した。11B8も強くアポトーシスを誘導し、その結果、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のmAbにおいて、最大で約53.4%のRaji細胞のアポトーシスを誘導した。一方、2F2およびリッキシマブは、Raji細胞のアポトーシスの誘導が非常に弱く、陰性対照レベルと比較して、わずかにアポトーシスのレベルが増加しただけであった。

30

【0345】

Dauidi細胞におけるアポトーシスの誘導： $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ のCD20 mAb（図35Aおよび35B）を添加後、標的細胞としてDauidi細胞を用いた場合も同じ図形が現れた。図35Aに示されたデータは、アネキシン-V陽性細胞を示し、図35B（X軸はアネキシン-Vを示し、Y軸はPIを示している）は、初期アポトーシス（アネキシン-V陽性およびPI陰性）および晩期アポトーシス（アネキシン-V陽性およびPI陽性）における、Dauidi細胞のアポトーシスのパーセンテージを示す。ここでも、濃度 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ で使用したとき、B1（65.9%）および11B8T（56.3%）の双方は、アポトーシスを強く誘導した（図36）。2F2Tを添加したところ、低レベルのアポトーシスDauidi細胞が得られた（17%）。リッキシマブを添加したところ、29%のアポトーシスDauidi細胞が得られた。アイソタイプ対照抗体HuMab-KLHを添加したところ、Dauidi細胞のアポトーシスは得られなかった（6%）。

40

【0346】

実施例10：CD20に対するヒト抗体を用いた、細胞のホモタイプの接着

ホモタイプの凝結は、アポトーシスの誘導と相関している。したがって、抗CD20 mAbがB細胞のホモタイプの凝結を誘導する能力を調べた。

【0347】

50

Ramos - EHRB細胞のホモタイプの凝結：Ramos - EHRB細胞（1mlの組織培養培地中 0.5×10^6 ）を、抗CD20抗体11B8、2F2または7D8（架橋なし）の存在下で、37℃で4時間インキュベートし、ホモタイプの接着の誘導を光学顕微鏡検査によって、（上記したように）評価した。

【0348】

図36A～Eに示されているように、11B8は、Ramos - EHRB細胞の集中的な凝結を引き起こした（ネズミ抗CD20抗体、AT80によって引き起こされる凝結に類似している）。2F2および7D8は、Ramos細胞のホモタイプの凝結を誘導しなかった。

【0349】

Daudi細胞のホモタイプの凝結：Daudi細胞を、 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ または $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ のmAbまたは対照抗体とともに24ウェル平底プレートに入れ、37℃で4時間インキュベートした。ホモタイプの凝結の範囲を光学顕微鏡検査によって測定した。図37からわかるように、2F2は、 $1.0 \mu\text{g}/\text{ml}$ では（および $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、データは示していない）、Daudi細胞のホモタイプの凝結を殆ど誘導しなかった。リッキシマブは、Daudi細胞のホモタイプの凝結をわずかに誘導しただけであった。対照的に、B1抗体は、ホモタイプの凝結を強く誘導した。

【0350】

実施例11：CD20に対するヒト抗体を用いた免疫治療

高用量（ $100 \mu\text{g}$ ）の、Daudi細胞攻撃したSCIDマウスの2F2および7D8を用いた治療：SCIDマウスは、Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, UKから入手し、病原体の無い条件下で飼育し、保持した。Daudi細胞（ 2.5×10^6 ）を、12～16週齢のSCIDマウスのコホートの尾部の静脈に静脈注射し、7日後、 $100 \mu\text{g}$ の2F2または7D8を同じ投与経路で注射した。実験動物は、動物倫理委員会の指示にしたがい、下肢麻酔を行って実験に用いた。図38に示されているように、2F2または7D8で治療した後のマウスの生存率が延びている。

【0351】

高用量（ $100 \mu\text{g}$ ）の、Tanoue細胞攻撃したSCIDマウスの2F2およびリッキシマブを用いた治療：Tanoue細胞（ 2.5×10^6 、 $200 \mu\text{l}$ のPBS中）を、12～16週齢のSCIDマウス（Harlan UK Ltd., Blackthorn, Oxon, UK）のコホートの尾部の静脈に静脈注射し、7日後、 $100 \mu\text{g}$ （ $200 \mu\text{l}$ のPBS中）の抗CD20 mAbを同じ投与経路で注射した。本実験においては、2F2をリッキシマブおよびB1と比較した。実験動物は、後脚麻酔を行って実験に用いた。結果を図39に示している。39日後、最初の2匹の対照マウスが死に、54日後にはこの群が完全に死亡した。このときまでに、下記の2F2治療のものは1匹だけが死に、この群の他のマウスの生存率はかなり増加した。81日後、腫瘍細胞を注射した後、1匹のマウスが死に、残りのマウス（合計数の60%）が腫瘍攻撃の100日後、実験期間中生存していた。対照的に、リッキシマブは、5匹のマウス中2匹の生存率が増加し（攻撃後66日後、および83日後に死亡）、実験終了時に生存マウスはなかった。B1群において、SCIDマウスの生存率は、2F2群のそれと類似しており、2匹のマウスが48日に死亡し、1匹が76日後に死んだ。この群においては、40%が実験終了時に生きていた。

【0352】

Daudi細胞攻撃されたSCIDマウスの2F2およびリッキシマブの用量反応性：腫瘍発生からの保護に関して、リッキシマブとの比較における2F2の有効性を評価するために、Daudi腫瘍細胞で攻撃されたSCIDマウスの治療において、用量滴定を行った。Daudi細胞は、Tanoue細胞よりもCD20を多く発現し、in vitroでの殺傷への感受性が高い。10個の群のSCIDマウス（各群4匹）および1個の対照群（5匹のSCIDマウス）に、0日目に 2.5×10^6 のDaudi細胞（ $200 \mu\text{l}$ のPBS中）を静脈注射し、20、5、2、0.5または0.1 μg （ $200 \mu\text{l}$ のPBS中）のリッキシマブ、2F2またはPBS（対照）を7日目に静脈注射した。実験動物は、後

10

20

30

40

50

脚麻酔を行って実験に用いた。結果を図40に示している。

【0353】

対照群では、全てのマウスが26～29日の時間間隔で死んだ。しかしながら、2F2を用いた場合、明らかな用量効果関係が認められた(図40、上のグラフ)。0.1μgおよび0.5μgの用量の2F2を用いた場合、効果は認められなかったものの、2μg程の2F2を用いた場合、生存日数が41日まで実質的に延び、5μgの2F2を用いた場合、生存日数が47日まで、そして20μgの2F2を用いた場合、生存日数が50日まで実質的に延びた。

【0354】

対照的に、リッキシマブは、最も高い用量である20μgで試験した場合でさえ、生存日数はわずかに延びただけで、したがって、用量効果関係は低濃度で試験した場合は、認められなかった(図40、下のグラフ)。

10

【0355】

11B8TおよびB1によるDauidi腫瘍細胞を持つSCIDマウスの治療：Dauidi細胞(2.5×10^6)を含む200μlのPBSを、12～16週齢のSCIDマウスのコホートの尾部の静脈に静脈注射し、7日後、100μgの11B8またはB1(200μlのPBS中)を同じ投与経路で注射した。実験動物は、後脚麻酔を行って実験に用いた。PBSで処置した対照マウスにおいては、全てのマウスが35～53日の時間間隔で死亡した(図41)。11B8Tによる治療は、マウスは腫瘍攻撃の72および98日後に死亡していることから、マウスを強く保護した。B1治療群においては、大半のマウスは、実験終了以降、すなわち、100日後も生存していた。

20

【0356】

実施例12：SCIDマウスを用いた、Dauidi-luc異種移植片モデルにおける抗CD20抗体の評価

抗CD20抗体の治療効果を、ヒトB細胞腫瘍細胞の播種性派生物が続いて起こる、マウスモデルで、外部の光学画像を用いて評価した。このモデルにおいては、腫瘍細胞をホタルルシフェラーゼでトランスフェクトする。ルシフェリン(Molecular Probes, Leiden, The Netherlands)をマウスに投与後、標識された細胞をin vivoで、バイオルミネセントイメージングによって、高感度CCDカメラを用いて、検出することができる(Wetterwald et al. (2002) American Journal of Pathology, 160(3):1143-1153.)。

30

【0357】

Dauidi細胞をGene Therapy Systems(San Diego, CA)から入手したgWIZルシフェラーゼを用いてトランスフェクトし、10%のFCS、Pen/Strep、Sodium Pyruvateおよび1μg/mlのピューロマイシン(Sigma)を含むRPMI中で培養した。細胞を分析して、ルミノメーター(luminometer)でルシフェラーゼ発現(RLU/ 1×10^5 個の細胞において発現した)を、そして、FACSによってCD20の発現を調べた。マウス一匹につき、 2.5×10^6 個のルシフェラーゼ-トランスフェクトDauidi細胞を静脈注射し、SCIDマウスにした。接種8日後、マウスに2F2T、11B8T、リッキシマブ、B1またはアイソタイプ対照抗体(huIgG1)の単一の用量(10μg)による治療を施した(1治療群につき6匹)。撮像するために、マウスにケタミン/キシラジン/アトロピンの混合物を腹腔内注射して、麻酔をかけた。合成D-ルシフェリン(ナトリウム塩、Molecular Probes)を、25mg/mlの用量で腹腔内投与した。次いで、マウスを遮光ボックスに入れ、3分後、VersArray 1300B液体窒素冷却CCD検出器(Roper Scientific)を用いて撮像を開始した。5分間の露光の間、ルシフェラーゼから発光されるフォトン数を計数した。照明のもとで、黒色と白色の画像を参照のために作製した。データ収集および画像分析にMetaVueソフトウェア(Universal Imaging Corp)を用いた。群の間の統計学的有意さは、GraphPad PRISM version 3.02(Graphpad Software Inc)を用いたNewman-Keuls post testによって、ばらつきのワンウェイ分析によって推定した。

40

50

【0358】

後方からの撮像を1週間の時間間隔で行った。8日目、治療の日、発光は、尾部の接種部位のみにおいて検出された。別の部位における腫瘍形成は、アイソタイプ対照群(huIgG1)およびリキシマブ群の全てのマウスにおいて14日目に検出された。次の週には、発光は着実に増加していた。図42は、39日目(治療31日目)における全てのマウスの画像を示す。ここでは、マウスの黒および白の体の画像の上に表したように、バイオルミネセンスを赤で表している(マウスの暗い部分)(光度>50フォトン/5分)。各マウスの腫瘍質量を、光シグナルを体表面に統合させることによって、25、32、39および46日目に定量化した。図43参照。最速の腫瘍成長は、アイソタイプ対照群において観察された。リキシマブでの治療によって、腫瘍成長が有意に阻害された。しかしながら、2F2T、11B8TおよびB1による腫瘍成長阻害の方が、より強かった。有意なレベルを示した以下の表2を参照されたい。

10

【0359】

【表2】

群の間の異なる時間における積分光度の有意差

	25日目	32日目	39日目	46日目
B1 対 リキシマブ	P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001
B1 対 11B8T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
B1 対 2F2T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
B1 対 huIgG1	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	
リキシマブ 対				
11B8T	P > 0.05	P < 0.05	P < 0.01	P < 0.001
リキシマブ 対 2F2T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P < 0.001
リキシマブ 対				
huIgG1	P < 0.001	P > 0.05	P < 0.05	
11B8T 対 2F2T	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05	P > 0.05
11B8T 対 huIgG1	P < 0.001	P < 0.001	P < 0.001	
2F2T 対 huIgG1	P < 0.001	P < 0.01	P < 0.01	

20

30

【0360】

実施例13: カニクイザルでの実験および薬物導体学的研究

1日1回連続4日間静脈投与(伏在静脈を介して)後、カニクイザル(約2歳;体重:2.1~2.6kgの範囲)における2F2の薬物動態学的パターンおよび薬理学的効果を決定することを目的とした。その同等の力価を決定するために、本研究では、リキシマブの薬理学的効果の比較も行った。この目的のために、6匹のオスおよび6匹のメスカニクイザルを、4日間連続で、定用量体積の10ml/kgで、1.25、6.25および12.5mg/kg/日の用量レベルで2F2またはリキシマブをそれぞれ投与する、6用量群に割り付けた。最後の用量を投与後、130日間、動物を投与後観察した。この研究に採用した実践および手順は、United Kingdom

40

Department of Healthが制定したOECD Principles of Good Laboratory Practiceにしたがっている。全ての動物を、処置に対して悪い健康状態の徴候または反応を示していないかどうかについて、定期的に観察し、身体測定を行った。本研究の間に、血液学、凝固、臨床化学および尿検査の実験室での検査を行った。血液サンプルおよびリンパ節生体組織

50

を（リンパ節表面から）取得し、投与中、および投与後観察を通して、フローサイトメトリ分析を行った。以下の細胞表現型、すなわち、CD3、CD4、CD8、CD20およびCD21について、フローサイトメトリーによって分析した。投与後観察期間完了後、動物を殺し、詳細な剖検を行った。

【0361】

2F2またはリッキシマブを用いた治療に関連すると考えられる有害な臨床徴候または所見は認められなかった。図44および45は、治療された動物の抹消血のCD20およびCD21発現細胞のフローサイトメトリー分析をそれぞれ示す。図46は、リンパ節でのCD20発現細胞のフローサイトメトリー分析を示す。あわせて、本研究中に分析された双方の表現型は、6.25mg/kg/日（合計25mg/kg）および12.5mg/kg/日（合計50mg/kg）で2F2およびリッキシマブを投与した後、強く、有効なB細胞欠失を示している。さらに、データは、2F2で処置した動物のリンパ節および抹消血におけるCD20発現細胞の再増殖は、25mg/kgおよび50mg/kgを投与した75日後、すなわち、リッキシマブで治療した動物におけるより著明に遅く、起こった。

10

【0362】

さらに、図47A~Cは、抹消血におけるCD20^低CD23⁺CD40^高発現細胞サブポピュレーション（Y. Vugmeyster et al. (2003) Cytometry 52A:101-109）のフローサイトメトリー分析を示す。

20

【0363】

1日1回1.25mg/kg（図47A）、6.25mg/kg（図47B）、および12.5mg/kg（図47C）の用量レベルで、2F2またはリッキシマブのいずれかを連続4日間静脈投与することによって治療したサルから取得した抹消血細胞を、抗ヒトCD20 FITCネズミモノクローナル抗体（Coulter）を用いて、室温で10分間、インキュベートした。その後、PBSとともにカウントビーズ（count beads）添加し、細胞を2回洗浄し（300g、10分間）、その後すぐ、CD20^低CD23⁺CD40^高対CD20^高CD23⁺CD40^低発現細胞サブポピュレーションの分析を、フローサイトメーター（Beckman Coulter）で行った。示されたCD20^低CD23⁺CD40^高細胞は個/μlで表した。図47からわかるように、2F2は、CD20^低CD23⁺CD40^高発現細胞では、リッキシマブと比較して完全な長い欠失を示していた。

30

【0364】

実施例14：部位特異的突然変異誘導を用いたエピトープマッピング

突然変異誘導アプローチを用いたエピトープマッピング研究によれば、第2の細胞外ループの170位のアラニン（A170）および172位のプロリン（P172）は、公知の抗CD20抗体によるヒトCD20の認識にとって重要である。Deansと共同研究者（M.J. Polyak, et al., Blood, (2002) 99(9): pp 3256-3262; M.J. Polyak, et al., J. Immunol., (1998) 161(7): pp 3242-3248）による研究においては、試験された全ての抗CD20 mAbの結合は、A170とP172を対応するネズミCD20残基S170およびS172に変更することによって阻害された。A x Pエピトープの認識における異種性が認識されたが、リッキシマブのような大半の抗体は、ヒトA170 x P172配列に突然変異したS170およびS172を持つネズミCD20を認識する。ところが、他のいくつかのものは、A x P配列のN末端の近くにさらなる突然変異を必要とする。本発明のA170 x P172刺激がまた、抗体の結合にとって有用であるかどうかを確認するために、部位特異的突然変異誘導（A x P突然変異 = A170S、P172S）を用いて、A x P配列をS x Sに突然変異させ、細胞をA x P突然変異および野生型（WT）CD20 DNAを用いて、トランスフェクトし、抗CD20 mAbsの結合特性を比較した。

40

【0365】

さらなる突然変異体、P172S（172位のプロリンをセリンに変異させた）、N166D（166位のアスパラギンをアスパラギン酸に変異させた）およびN163D（16

50

3位のアスパラギンをアスパラギン酸に変異させた)を調製した。部位特異的突然変異誘導を用いて、変異したアミノ酸残基が本発明の抗体の結合に重要であるかどうかを評価した。これを調べるために、制限部位を導入する好適なプライマーおよび最適な発現のための理想的なKozak配列を用いてCD20コード配列を増幅させることによって、CD20発現ベクターを構築した。増幅した断片を消化し、発現ベクターpEE13.4中にライゲーションした。E.coli中でトランスフォーメーション後、挿入物についてコロニーをスクリーニングし、正しい配列を確認するために、配列のための2つのクローンを選択した。コンストラクトをpEE13.4CD20HSと名づけた。

【0366】

突然変異誘導を行い、A x P突然変異を導入し、またヒトCD20の20マウス突然変異を細胞外ループ領域に導入した。制限酵素による消化および配列決定によって突然変異誘導を確認した。そのコンストラクトを一時的にCHO細胞(A x P突然変異のため)またはHEK293F細胞にトランスフェクトし、トランスフェクションの24時間後または48時間後にフローサイトメトリーを用いて分析を行った。

【0367】

オリゴヌクレオチドPCRプライマー：オリゴヌクレオチドプライマーを合成し、Isogen BV (Maarssen, The Netherlands)によって定量化した。濃度100 pmol / μ lの水中にプライマーを再構築し、必要時まで-20 で保存した。PCRおよび配列プライマーの概要を表3に示す。

【0368】

核酸の光学密度測定：Ultrospec 2100 pro Classic (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)を用いて、製造元の指示にしたがって、光学密度を測定した。OD_{260nm}の分析によってDNA濃度を測定した(OD_{260nm}ユニット = 50 μ g / ml)。参照溶液は、核酸を溶解するために使用される溶液と同じとした。

【0369】

E.coli培養物からのプラスミドDNAの単離：プラスミドDNAを、Qiagen社製キットを用いて、製造元の指示にしたがって、E.coli培養物から単離した(Westburg BV, Leusden, The Netherlands)。「嵩高の」プラスミドを調製するために、Hi-Speed plasmid Maxi kitか、Hi-Speed plasmid Midi kitのいずれかを使用した(Qiagen)。小規模のプラスミドを調製するためには(すなわち、2mlのE.coli培養物)、Qiaprep Spin Miniprep Kit (Qiagen)を使用し、DNAを50 μ lのTE (Tris - HCl, 10 mM, pH 8.0, EDTA, 1 mM)中に溶出させた。

【0370】

PCR増幅：Pfu-Turbo (c) Hotstart DNAポリメラーゼ (Stratagene, Amsterdam, The Netherlands)について、製造元の指示にしたがって、PCR反応を行った。各反応物(20 μ l)は、1 x PCR反応緩衝液、200 μ Mの混合dNTPs、6.7 pmol ずつのフォワードプライマーおよびリバースプライマー、約1 ngの鋳型DNAおよび1ユニットのPfu-Turbo (c) Hotstart DNAポリメラーゼを含有していた。+95 で2分のプログラムを30サイクル、次いで+95 で30秒を30サイクル用いて、T-gradient Thermocycler 96 (Biometra GmbH, Goettingen, Germany)上でPCR反応を行い、45 ~ 65 の勾配で30秒のアニーリング、+72 で2分の伸長、次いで、72 で10分の最終的な伸長ステップ、続いて4 で保存を行った。完全な反応をアガロースゲル電気泳動によって分析した。

【0371】

アガロースゲル電気泳動：アガロースゲル電気泳動を、1 x トリス / 酢酸 / EDTA (TAE) 緩衝液中、50 mlのゲルを用いて、Sambrook (Molecular Cloning Laboratory Manual, 第3刷) にしたがって行った。ゲルにエチジウムブロミドを含ませ、UV光の下で観察することによってDNAを視覚化した。ゲルの画像は、CCDカメラおよび画像分析システムによって記録した (GeneGnome; Syngene, Cambridge, UK)。

【0372】

10

20

30

40

50

制限酵素による消化：制限酵素は、New England Biolabs (Beverly, MA) から供給を受け、供給元の推奨に従って使用した。通常、100 ng は、最終体積 10 μ l で、適切な緩衝液中に含まれた 5 ユニットの酵素によって消化された。必要に応じて、反応の体積を増加させた。消化物を製造元の推奨温度で、最低 60 分インキュベートした。

【0373】

不適合の緩衝液または温度要件を有する制限酵素を用いて、2 倍の消化を必要とする断片の場合は、各酵素の好ましい条件が結果として提供されるように、消化を連続的に行った。

【0374】

アルカリフォスファターゼ処理：Shrimp アルカリフォスファターゼ (USB, Cleveland, OH) を供給元の推奨にしたがって使用した。アルカリフォスファターゼは、DNA 断片の末端から 5' - ホスフェート基を除去し、それによって、セルフライゲーションを妨害する。DNA 断片のセルフ再ライゲーションは、複製 - 競合ベクターとすることができた。この酵素は、大半の制限酵素緩衝液において活性であるが、必要に応じて添加された。消化後、温度を 15 分間 70 $^{\circ}$ C に上げることによって、酵素を不活性化した。

10

【0375】

PCR の精製および制限酵素反応生成物：ミニ溶出 PCR 精製キット (Qiagen より供給) を用いて、製造元の指示にしたがって精製を行った。簡単に述べれば、DNA サンプルを 5 体積の結合緩衝液 I (Qiagen) 中に希釈し、エッペンドルフ型遠心チューブ中のミニ溶出カラム上に載せた。集合体をベンチトップ微量遠心機中で遠心分離した。このカラムを緩衝液 II (Qiagen) で 2 回洗浄した：緩衝液処理後、集合体を遠心分離にかけ、フロースルーを捨てた。緩衝液を添加せずに、遠心分離によってカラムを乾燥させた。溶出緩衝液をカラムに添加することによって DNA を溶出し、溶出物を遠心分離によって回収した。単離 DNA を UV スペクトロスコピーによって定量化し、また、アガロースゲル電気泳動によって質を評価した。

20

【0376】

アガロースゲルからの DNA 断片の単離：適切であれば (すなわち、多数の断片が存在する場合)、消化された DNA サンプルをゲル電気泳動によって分離し、所望の断片をゲルから切り出し、QIAEX II ゲル抽出キット (Qiagen) を用いて、製造元の指示にしたがって、回収した。簡単に述べれば、DNA バンドをアガロースゲルから切り出し、適切な緩衝液中に、+ 55 $^{\circ}$ C で溶融した。QIAEX II 樹脂を添加し、5 分間インキュベートした。QIAEX II 樹脂を短い遠心分離ステップ (1 分、14000 g、RT) によってペレット化し、500 μ l の洗浄緩衝液 PE で 2 回洗浄した。最終的なペレットをフードで乾燥させ、DNA を適切な体積の TE と温度 (DNA のサイズによる) で溶出させた。

30

【0377】

DNA 断片のライゲーション：ライゲーションを、Quick Ligation Kit (New England Biolabs) を用いて製造元の指示にしたがって行った。各ライゲーションにおいては、ベクター DNA を適切に 3 倍の余剰モルの挿入 DNA と混合し、その結果、DNA の総量を 10 μ l 中 200 ng 未満とし、必要に応じて体積を水で調整した。これに、10 μ l の 2 \times Quick ライゲーション緩衝液および 1 μ l の Quick T4 DNA リガーゼを添加し、このライゲーション混合物を室温で、5 ~ 30 分間インキュベートした。

40

【0378】

DNA のバクテリアへのトランスフォーメーション：DNA のサンプルを用いて、One Shot DH5 α -T1R コンピテント E. coli 細胞 (Invitrogen, Breda, The Netherlands) を、ヒートショック法により、製造元の指示にしたがって、トランスフォーメーションした。簡単に述べれば、1 ~ 5 μ l の DNA 溶液 (典型的には、2 μ l の DNA ライゲーション混合物) をトランスフォーメーションコンピテントバクテリア細胞のアリコートに添加し、その混合物を氷上で 30 分間インキュベートした。42 $^{\circ}$ C で 30 秒間、水浴に移すことによって、細胞にヒートショックを施し、その後、氷上で 5 分間、さらにインキュベーションを行った。非選択的培地 (SOC) で、37 $^{\circ}$ C、1 時間、撪拌しながらインキュベ

50

ションすることによって、細胞を回収し、続いて、適切な選択物質（アンピシリン、50 μg/ml）を含有する寒天プレート上に伸ばした。プレートを、+37 で16～18時間、または、バクテリアのコロニーが明らかになるまで、インキュベートした。

【0379】

バクテリアコロニーのPCRによるスクリーニング：バクテリアコロニーをスクリーニングして、PCRコロニースクリーニング技法を用いて、所望の配列を含むベクターの存在を調べた。0.5体積のHotStarTaq Master Mix（Qiagen）、4pmolのフォワードおよびリバースプライマーを含有し、水を含んだ、20μlのPCR反応混合物をPCRチューブに添加した。コロニーに20μlのピペットチップで軽く触れ、（対応するプラスミドを含有するバクテリアを成長させるための）培養チューブ中の2mlのLBに接触させた後、20μlのPCR混合物中に再懸濁させた。+95 で15分のプログラムを35サイクル、次いで+94 で30秒を35サイクル用いて、T-gradient Thermocycler 96（Biometra）上でPCR反応を行い、55 で30秒のアニーリング、+72 で2分の伸長、次いで、72 で10分の最終的な伸長ステップ、続いて4 で保存を行った。出来上がった反応をアガロースゲル電気泳動によって分析した。コロニーPCRに用いられるプライマーの詳細については、表3を参照されたい。

10

【0380】

DNA配列：プラスミドDNAサンプルを、配列分析をするためにAGOWA（Berlin, Germany）に送信した。配列分析は、ベクターNTIソフトウェアパッケージ（Informax, Frederick, MD, USA）を使用して行った。

20

【0381】

【表3】

名称	適用	長さ	オリゴ配列
CD20P172S	CD20 突然変異誘発	36	TGGGGAGTTTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTTCACACTTG TA
CD20N166D	CD20 突然変異誘発	39	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
CD20N163D	CD20 突然変異誘発	36	AATCATGGACATACTTAATATTA
cd20exfor	CD20 構築	41	TATAGCCCCGGGGCCGCCACCATGACAACACCCAGAAATT CA
cd20exrev	CD20 構築	38	GCGTCTCATGTACATTAAGGAGAGCTGTCAATTTCTAT
pee13.4seqrev2	コロニー PCR	23	TCCGACATCTCATGACTTCTTT
pConKseq1	コロニー PCR	23	GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC
cd20hsapmutr (AxP)	CD20 突然変異誘発	42	TGGGGAGTTTTTCTCAGAGGAATTCGATGGTTCACACTTG TA
cd20hsapmutf (AxP)	CD20 突然変異誘発	42	TACAACGTGAACCATCGAATTCCTCTGAGAAAAACTCCC CA
CD20seq2	CD20 配列	23	TGTAACAGTATTGGGTAGATGGG
cd20seq1	CD20 配列	23	AATCATGGACATACTTAATATTA

30

40

【0382】

突然変異誘導：QuikChange（登録商標）XL部位特異的突然変異誘導キット（Cat 200517-5, Lot 1120630, Stratagene Europe）のいずれかを用いて、製造元の指示にしたがって、突然変異誘導を行った。

【0383】

突然変異誘導反応物を、エタノール製剤を用いて濃縮し、1ショットDH5⁻-T1RコンピテントE.coli細胞にトランスフォームするか、またはElectroTen-Blue（登録商標）Electro

50

poration-Competent Cellsにエレクトロポレーションした。トランスフェクションを行う前に、コロニーをコロニーPCRと制限酵素による消化によって確認した。

【0384】

HEK293F細胞トランスフェクション：HEK293F細胞をInvitrogenから取得し、製造元の指示にしたがって、293fectinを用いて、トランスフェクトした。HEK293F細胞を全ての単一突然変異体配列のために用いた。

【0385】

CHO細胞トランスフェクション：約95%のコンフルエンスに成長したCHO細胞を、リポフェクタミン2000 (M668-019, Invitrogen, Breda, Netherlands)を用いて、CD20野生型、突然変異体cDNAまたは双方のコンストラクトの組み合わせで、一時的にトランスフェクトした。この目的のために、24 μ gの析出したDNAを500 μ lのオプチメム (optimem) 中に、AxP 100% : WT 0% ; AxP 33.3% : WT 66.6% ; AxP 66.6% : WT 33.3% ; AxP 0% : WT 100%の比率で希釈した(1 μ g/ μ l)。各トランスフェクションにつき、24 μ lのリポフェクタミンを500 μ lのオプチメム中に希釈した。その後、希釈リポフェクタミンとともにインキュベートし(RT、5分)、その希釈DNAを希釈リポフェクタミンとともにインキュベートした。その溶液を穏やかに混合し、インキュベートした(RT、20分間)後、1000 μ lのDNA/リポフェクタミンをCHO細胞に添加し、37 $^{\circ}$ Cで48時間、5%CO₂のもとで、十分に混合し、インキュベートした。CHO細胞をトランスフェクトした2日後、細胞をFACS緩衝液(0.1%BSAおよび0.002%NaN₃が添加されたPBS)で2回洗浄した。CHO細胞をトリプシン/EDTA (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotland)で処理し、培養プレートをはずした。

【0386】

抗CD20抗体結合：HEK293F細胞およびCHO細胞を、2 \times 10⁶/mlの濃度で、PBSに取り出し、丸底プレート(1 \times 10⁵/ウェル)に添加した。その後、50 μ lのCD20 mAbを添加し、1ウェルにつき、10、5、2.5または0 μ gの連続希釈を行った(4、30分間)。FACS緩衝液(0.1%BSAおよび0.002%NaN₃を添加したPBS)中で洗浄後、該細胞をフローサイトメーター (Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)で分析し、サンプルごとに5,000の現象を高流速で得た。

【0387】

図48A~Eからわかるように、全てのCD20 mAbsは、WT CD20を発現するCHO細胞に効率的に結合した。予期した通り、リッキシマブは、AxP突然変異体と結合し(図48A)、そしてB1は、この突然変異体と弱く結合した(図48D)。対照的に、2F2と11B8の双方は、WTおよびAxP突然変異体CD20に同様に十分に結合した(図48Bおよび図48C)。ある量のWT CD20を表面に滴定することは、実際には、リッキシマブとB1の結合を滴定することである。2F2と11B8はまた、突然変異の有無とは無関係である。

【0388】

本研究は、2F2および11B8のヒトCD20への結合は、170位および172位のアミノ酸に感受性がないことを示している。したがって、2F2および11B8は、新規なCD20エピトープを認識する新たなクラスのCD20 mAbsを表すものである。

【0389】

図49Aは、2F2、11B8T、B1またはリッキシマブの突然変異体P172S対WT CD20へのパーセンテージ結合を示し、図49Bは、2F2T、11B8T、B1、CAT (CAT13.6E12、マウスモノクローナルIgG2A抗CD20抗体、Diatec.Com)、対照アイソタイプ抗体(KLH)、またはリッキシマブの突然変異体CD20 (AxP)対WT CD20へのパーセンテージ結合を示す。

【0390】

166位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換している突然変異体(CD20N166

10

20

30

40

50

D)としては、2 F 2が非常に低い結合を示している。一方、B 1、リッキシマブおよび1 1 B 8 Tは、結合可能であった。図4 9 Cを参照されたい。同様の実験において、C A T 1 3 . 6 E 1 2およびリッキシマブは、C D 2 0 N 1 6 6 Dと結合することが可能であったが、2 F 2 Tのみが非常に低い結合を示していた。図4 9 Dを参照されたい。1 6 3位のアスパラギンがアスパラギン酸に置換している突然変異体(C D 2 0 N 1 6 3 D)としては、ここでも、リッキシマブ、1 1 B 8 TおよびB 1は、C D 2 0 N 1 6 3 Dと結合することが可能であったが、2 F 2および2 F 2 Tは非常に低い結合を示しただけであった。図4 9 Eを参照されたい。同様の実験において、C A T 1 3 . 6 E 1 2およびリッキシマブは、C D 2 0 N 1 6 3 Dと結合することが可能であったが、2 F 2 Tだけは非常に低い結合を示した。図4 9 Fを参照されたい。

10

【0391】

これらの実験は、2 F 2および1 1 B 8が異なるエピトープに結合することを示している。

【0392】

実施例15：Pepscan法を用いたエピトープマッピング

ペプチドの合成：7 -、9 -、および15量体ペプチドを常法によって合成した。いくつかのケースにおいて、15量体ペプチドの辺の化学的結合は、潜在的に不連続なエピトープのアミノ酸配列を同定するのを助けている。公知の処置にしたがって(H.M. Geysen et al. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:3998; J.W. Sloodstra et al. (1996) Mol. Divers. 1:87; およびPCT国際公開第WO 01/60769号)、7 -、9 -、および15量体ペプチドを合成した。それは、2 F 2または1 1 B 8のヒトC D 2 0分子への可能な結合に関与する結合部位またはエピトープとなり得るだろう。9 -、および15量体をループとして合成し、クレジットカードフォーマットのミニPEPSCANカード(4 5 5ペプチドフォーマット/カード)を用いてスクリーニングを行った。様々な位置の全てのループ状ペプチドアミノ酸をシステインで置換した(例えば、アセチル-XCXXXXXXXXX XXXCX - ミニカード)。ペプチドを、標準的なF m o c化学を用いて合成し、スカベンジャーを有するT F Aを用いて脱保護した。続いて、脱保護されたペプチドをマイクロアレイ上で、0.5 mMの1, 3 - ビス(プロモメチル)ベンゼンにアンモニウムピカーボネート溶液(20 mM、pH 7.9)と反応させ、アセトニトリル(1:1 (v/v))を添加した。マイクロアレイをその溶液中で穏やかに30~60分間振とうし、溶液中に完全に浸した。最後に、マイクロアレイを余剰のミリポア水で十分洗浄し、1%ドデシル硫酸ナトリウム、0.1% -メルカプトエタノールをPBS(pH 7.2)中に含有する破壊緩衝液中で、70 で30分間、超音波処理し、続いて、ミリポア水でさらに45分超音波処理した。続いて、マイクロウェルをELISAアッセイのスクリーニングのために準備した。

20

30

【0393】

Pepscan

ELISAアッセイ：共有結合したペプチドを含有する4 5 5ウェルクレジットカードフォーマットのポリエチレンカードを血清(5%ウマ血清(v/v)および5%オボアルブミン(w/v))を含有するブロッキング溶液中で1:1000に希釈)とともにインキュベートした(4、一晩)。洗浄後、ペプチドを抗ヒト抗体ペルオキシダーゼ(1:1000に希釈、1時間、25)とともにインキュベートし、ペルオキシダーゼ基質を洗浄後、2, 2' - アジノ - ジ - 3 - エチルベンズチアゾリンスルホネートおよび2 μl/mlの3% H₂O₂を添加した。1時間後、発色を測定した。ELISAの発色を、CCDカメラと画像プロセッシングシステムを用いて定量化した。セットアップは、CCDカメラと55 mmレンズ(Sony CCD Video Camera XC-77RR, Nikon micro-nikkまたは55mm f/2.8レンズ)、カメラアダプター(Sony Camera adaptor DC-77RR)およびImage Processing Software package Optimas,バージョン6.5(Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, U.S.A.)からなる。Optimasは、ペンティアムII コンピュータシステム上で動く。

40

【0394】

50

異なる抗体濃度でのペプチドの吸光度（OD値）を下記の表4および表5に示す。
【0395】

【表 4】

	11B8 10 µg/ml	11B8 100 µg/ml	7D8 10 µg/ml	7D8 100 µg/ml	リッキシマ 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml	2F2 100 µg/ml	B1 10 µg/ml	B1 100 µg/ml
KMECLNFIRAHCPY I	763	2997	134	41	90	48	66	147	304
LKMECLNFIRCHTP Y	165	738	160	41	120	49	87	179	216
KMESCNFIRACTPY I	625	3090	142	52	123	39	78	170	308
MESLCFIRAHCPYI N	179	956	127	55	102	41	65	119	178
CFIRAHTPC	188	534	181	69	134	91	114	170	212
CIRAHTPYC	151	449	186	60	132	57	92	151	195
CRAHTPYIC	427	1605	188	64	145	48	87	179	216
CAHTPYINC	179	452	174	65	125	42	106	161	172
IPAGIYA	217	950	164	76	177	48	85	165	192
PAGIYAP	449	2501	170	64	111	43	85	165	300
AGIYAPI	251	2207	188	73	110	44	98	187	143
GIYAPIC	99	251	152	64	141	34	93	177	147
IYAPICV	137	313	174	58	159	58	99	175	90
GIYAPIA	172	857	177	96	156	62	96	165	121
IYAPLAV	161	654	181	58	116	62	76	161	106

【 0 3 9 6 】

10

20

30

40

50

【表 5】

	11B8 10 µg/ml	7D8 10 µg/ml	リッキシ マブ 10 µg/ml	2F2 10 µg/ml
PCINIYNAEPANPCE	118	163	152	65
YCNINYNAEPANPSCK	287	181	2418	86
ICIYNAEPANPSECN	138	192	142	78
NCYNAEPANPSEKCS	93	121	2649	49
ICNAEPANPSEKNCP	115	165	3283	43
YCAEPANPSEKNSCS	106	188	3770	65
NCEPANPSEKNSPCT	159	183	3476	61
ACPANPSEKNSPSCQ	146	148	250	77
ECANPSEKNSPSTCY	134	179	188	68

【0397】

表4から明らかのように、11B8は、10 µg/mlでも、100 µg/mlでも、ヒトCD20の小さな第1の細胞外ループのAGIYAPへの結合を示したが、試験した他の抗体は、AGIYAPへの有意な結合を示さなかった。

【0398】

さらに、11B8は、10 µg/mlでも、100 µg/mlでも、ヒトCD20の第2の細胞外ループのMESLNFI RAHTPYIへの結合を示したが、試験した他の抗体は、MESLNFI RAHTPYIへの有意な結合を示さなかった。

【0399】

表5から明らかのように、リッキシマブは、10 µg/mlでも、100 µg/mlでも、ヒトCD20の第2の細胞外ループのEPANPSEKへの結合を示したが、試験した他の抗体は、EPANPSEKへの有意な結合を示さなかった。

【0400】

実施例16：抗イディオタイプ抗体

抗イディオタイプ抗体の生成：マウス抗イディオタイプ抗体を、Balb/Cマウスを2F2または11B8Tで免疫し、NS1骨髄腫細胞と融合して、これらのマウスの脾臓からハイブリドーマを生成することによって、常法を用いて作製した。以下の抗イディオタイプ抗体、すなわち、抗2F2 sab 1.1、抗2F2 sab 1.2、抗2F2

sab 1.3、抗11B8T sab 2.2、抗11B8T sab 2.3、抗11B8T

sab 2.4、抗11B8T sab 2.5および抗11B8T sab 2.6を作製した。これらを、2F2T、7D8および11B8Tとの特異的結合について試験した。ELISAプレートを精製した2F2T、7D8または11B8T（最終濃度が1.2 µg/mlとなるようにPBS中に希釈した。37、2時間）を塗布した。プレートを、0.05% Tween-20および2%トリ血清を含有するPBSでブロッキングした（室温、1時間）。続いて、そのプレー

トを抗イディオタイプ抗体の培養から得た上清とともにインキュベートした（最終濃度を 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調節した。RT、2 時間）。結合したマウス抗イディオタイプ抗体を、ウサギ抗マウス IgG - HRP 結合抗体（Jackson ImmunoResearch）を用いて検出した。

【0401】

図 5 0 に示すように、抗 2F2 sab 1.1、抗 2F2 sab 1.2 および抗 2F2 sab 1.3 は、2 F 2 T および 7 D 8 と結合するが、1 1 B 8 T または無関係のアイソタイプ対照ヒト抗体とは結合しない。2 F 2 T と 7 D 8 は、 V_L および V_H 配列が非常に相同しているため、抗 2 F 2 イディオタイプ抗体と 7 D 8 とが反応することが期待される。

【0402】

図 5 1 は、抗 11B8T sab 2.2、抗 11B8T sab 2.3、抗 11B8T sab 2.4、抗 11B8T sab 2.5 および抗 11B8T sab 2.6 の全てが 1 1 B 8 T に同程度結合することを示している。

【0403】

免疫診断ツールとしての抗イディオタイプ抗体：2 F 2 / 7 D 8 特異的抗イディオタイプ抗体および 1 1 B 8 T 特異的抗イディオタイプ抗体を、免疫診断ツールとして使用して、実験室または患者サンプル中の CD 2 0 に対するヒトモノクローナル抗体のレベルを検出し、定量化することができる。これは抗 CD 2 0 抗体の薬物動態学を調べるために、または、抗 CD 2 0 抗体の投与量を決定および調整するために、そして、患者における疾患および治療効果をモニターするために有用かもしれない。そのようなアッセイの例として、E L I S A プレートに 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の抗 2F2sab 1.1、抗 2F2 sab 1.2 または 2F2 sab 1.3 を塗布した。プレートを 0 . 0 5 % Tween-20 および 2 % トリ血清を含有する P B S でブロッキングした（室温、1 時間）。続いて、そのプレートを連続希釈した 2 F 2 T とともにインキュベートした（10, 000 ~ 9 . 77 ng / ml、RT、2 時間）。結合した 2 F 2 T をマウス抗ヒト IgG HRP - 結合抗体を用いて検出した。図 5 2 A ~ C に示すように、2 F 2 T の用量依存的結合が観察された。

【0404】

等価物

当業者なら、ルーチンの実験法を用いるだけで、ここに記載された本発明の特定の実施形態に対して多くの均等物を認識または確認することができるであろう。そのような均等物は、以下の請求項に包含されることが意図される。従属請求項に開示された態様のあらゆる組み合わせも本発明の範囲であると考えられる。

【0405】

引用による援用

本明細書において引用した全ての特許、ペンディングの特許出願、他の文献は、その全体を引用によってここに援用している。

【図面の簡単な説明】

【0406】

【図 1】図 1 は、ヒトモノクローナル抗体 2F2 及び 11B8 の組換え作製に用いられる pCON 1 f / 可変-重ベクタを示す。

【図 2】図 2 は、2F2 及び 11B8 の組換え作製に用いられる pCON 1 f / 可変-軽ベクタを示す。

【図 3】図 3 は、2F2 及び 11B8 の組換え作製に用いられる二重遺伝子クローニング・ベクタ (pCON 1 f / 2F2) を示す。

【図 4】図 4 は、Raji 細胞、Daudi 細胞、及び CD20 をトランスフェクトした NS/0 細胞及び親 NS/0 細胞に対するヒトモノクローナル抗体 2F2、7D8、及び 11B8 の結合を、フローサイトメトリを用いて比較したグラフである。

【図 5】図 5 A 及び 5 B は、3 人のヒト・ドナーからの PBMC に対する 2F2 の結合をフローサイトメトリを用いて示す。

【図 6】図 6 は、 ^{125}I -標識 2F2 及び ^{125}I -標識 11B8 の Ramos-EHR B 細胞に対する結合親和性

10

20

30

40

50

を比較したグラフである。

【図 7】図 7 A 及び 7 B は、 ^{125}I -標識 2F2 及び ^{125}I -標識 11B8の結合を ^{125}I -標識リツキシマブ（キメラ抗CD20抗体、IDEC）に比較して、そして ^{125}I -標識 B1（用語B1は、Coulter社の ^{131}I -標識マウス抗ヒトCD20抗体BexxarTMの未標識の形に相当する）の結合をRamos-EHR B細胞（A）及びDaudi細胞（B）に比較して示す。

【図 8】図 8 は、 ^{125}I -標識 11B8T、 ^{125}I -標識 2F2、 ^{125}I -標識リツキシマブ（RIT）、及び ^{125}I -標識 B1の解離速度を比較したグラフである。

【図 9】図 9 は、Ramos-EHR B細胞における2F2、11B8TのF(ab')₂フラグメント及びリツキシマブの解離速度を示す。

【図 10】図 10 A 及び 10 B は、Daudi細胞(A)及びSU-DHL-4細胞(B)の2F2T、11B8T、7D8、リツキシマブ、及びアイソタイプ・コントロール抗体（HuMab-KLH）による様々な時点（機能的off速度）でのCDCをフローサイトメトリを用いて示す。

【図 11】図 11 A - E は、様々な細胞系において2F2及びリツキシマブにより誘導されるCDCの動態をフローサイトメトリを用いて示す。

【図 12】図 12 A - D は、様々な細胞系において2F2及びリツキシマブにより誘導されるCDCの動態を、2つの異なる抗体濃度での補体濃度（正常ヒト血清（NHS））の関数として、フローサイトメトリを用いて示す。

【図 13】図 13 A - D は、様々な細胞系において2F2及びリツキシマブにより誘導されるCDCの濃度依存的誘導をフローサイトメトリを用いて示す。

【図 14】図 14 A 及び 14 B は、Daudi細胞（A）及びRaji細胞（B）における2F2、2F2T、11B8T、B1、及びリツキシマブによるCDCの濃度依存的誘導を示す。

【図 15】図 15 A 及び 15 B は、ヒトモノクローナル抗体 2F2、7D8、及び11B8並びにリツキシマブによるDaudi細胞（低レベルのCD55/59を発現する細胞）のCDCを比較したグラフである；(A)は、未洗浄細胞の溶解率を示し、(B)は血清添加前の細胞の溶解率を示す。

【図 16】図 16 A 及び 16 B は、ヒトモノクローナル抗体 2F2、7D8、及び11B8並びにリツキシマブによるRaji細胞（高レベルのCD55/59を発現する細胞）のCDCを比較したグラフである；(A)は、抗CD55及び抗CD59抗体で遮断していない細胞の溶解率を示し、(B)は抗CD55及び抗CD59抗体で遮断した細胞の溶解率を示す。

【図 17】図 17 A - C は、Raji細胞において2F2及びリツキシマブにより誘導されるCD55及びCD59の役割を示す。(A)は、抗CD55抗体添加時に溶解した細胞のパーセンテージを示し、(B)は、抗CD59抗体添加時に溶解した細胞のパーセンテージを示し、そして(C)は、抗CD55抗体及び抗CD59抗体の両方の添加時に溶解した細胞のパーセンテージを示す。

【図 18】図 18 A - D は、フローサイトメトリで調べたときの、様々な細胞系における2F2及びリツキシマブによる補体因子C1qの結合を示す。

【図 19】図 19 A 及び D は、フローサイトメトリで調べたときの、様々な細胞系における2F2及びリツキシマブによる補体因子フラグメントC4cの析出を示す。

【図 20】図 20 は、PMN、MNC、血漿又は全血の存在下での2F2、リツキシマブ、及び11B8TによるARH-77細胞の溶解を示す。

【図 21】図 21 は、PMN、MNC、血漿又は全血の存在下での2F2、リツキシマブ、及び11B8TによるB-CLL7細胞の溶解を示す。

【図 22】図 22 は、PMN、MNC、血漿又は全血の存在下での2F2、リツキシマブ、及び11B8TによるHCL（ヘアリーセル白血病）細胞の溶解を示す。

【図 23】図 23 は、PMN、MNC、血漿又は全血の存在下での2F2、及びリツキシマブによるB-ALL細胞の溶解を示す。

【図 24】図 24 は、PMN、MNC、血漿又は全血の存在下での2F2、リツキシマブ、及び11B8Tによる濾胞性リンパ腫（FL）細胞の溶解を示す。

【図 25】図 25 は、PMN、MNC、血漿又は全血の存在下での2F2、リツキシマブ、及び11B8Tによる外套細胞リンパ腫細胞の溶解を示す。

【図 26】図 26 は、全血の存在下での2F2及びリツキシマブによるARH-77細胞の濃度依

存的溶解を示す。

【図27】図27は、2F2T、11B8T、及びリツキシマブによるARH-77細胞のMNC媒介性溶解を示す。

【図28】図28は、2F2T、11B8T、及びリツキシマブによるRaji細胞のMNC媒介性溶解を示す。

【図29】図29A、B、及びCは、2F2、7D8、又は11B8と一緒にインキュベートしたときの脂質ラフト中のCD20の凝集をFRET分析及びTriton-X不溶性検定を用いて示したグラフである。

【図30】図30は、2F2、リツキシマブ、又は11B8と一緒にインキュベートしたときの脂質ラフト中のCD20の凝集をFRET分析を用いて示したグラフである。

【図31】図31は、TritonX-100 (TX) で処理し、2F2、リツキシマブ、又は11B8と一緒にインキュベートした後の不溶性ラフト画分中に残ったCD20の比率を示す。

【図32】図32は、Daudi細胞を2F2、リツキシマブ、又は11B8Tで刺激したときのラフトと非ラフト膜画分間のCD20の分布を示す。

【図33】図33A - Gは、2F2、7D8、及び11B8によるDaudi細胞のアポトーシスをフローサイトメトリを用いて示す。

【図34】図34は、2F2、11B8T、リツキシマブ、又はB1によるRaji細胞のアポトーシスの誘導をフローサイトメトリを用いて示す。

【図35A】図35Aは、2F2T、11B8T、リツキシマブ、又はB1によるDaudi細胞のアポトーシスの誘導をフローサイトメトリを用いて示す。

【図35B】図35Bは、ヒトモノクローナル抗体 2F2T、11B8T、リツキシマブ、及びB1によるDaudi細胞の初期及び後期アポトーシスをフローサイトメトリを用いて示す。

【図36】図36A - Eは、2F2、7D8、及び11B8によるRamos-EHR B細胞の同型接着を光学顕微鏡法を用いて示す。

【図37】図37は、2F2、リツキシマブ、及びB1によるDaudi細胞の同型接着を光学顕微鏡法を用いて示す。

【図38】図38は、Daudi細胞を注射され、2F2又は7D8で処理されたSCIDマウスの生存率を示したグラフである。

【図39】図39は、Tanoue細胞を注射され、2F2、リツキシマブ、又はB1で処理されたSCIDマウスの生存率を示す。

【図40】図40は、Daudi細胞を注射され、異なる濃度の2F2又はリツキシマブで処理されたSCIDマウスの生存率を示す。

【図41】図41は、Daudi細胞を注射され、11B8T又はB1で処理されたSCIDマウスの生存率を示す。

【図42】図42は、39日目のSCIDマウスにおける腫瘍細胞の生物発光画像を示す(10 μ gのB1、リツキシマブ、11B8T、2F2T、又はhuIgG1での処理後31日目)。前記生物発光は、マウスの黒白身体像上に重なった赤色で表される(マウスの暗色域)(光輝度>5分当たり50光子)。

【図43】図43は、8日目に10 μ gのB1、リツキシマブ、11B8T、2F2T、又はhuIgG1を投与してから25日目、32日目、39日目、及び46日目に定量された各マウスにおける腫瘍の塊を、身体表面全体の光シグナルを積分することにより示す。

【図44】図44A - Cは、4x 1.25 mk/kg (A)、4 x 6.25 mg/kg (B)、又は4 x 12.50 mg/kg (C)という様々な投薬量で2F2又はリツキシマブを静脈内投与した後のカニクイザルの末梢血中のCD20⁺細胞のフローサイトメトリ分析を示す。

【図45】図45A - Cは、4x 1.25 mk/kg (A)、4 x 6.25 mg/kg (B)、又は4 x 12.50 mg/kg (C)という様々な投薬量で2F2又はリツキシマブを静脈内投与した後のカニクイザルの末梢血中のCD21⁺細胞のフローサイトメトリ分析を示す。

【図46】図46A - Cは、4x 1.25 mk/kg (A)、4 x 6.25 mg/kg (B)、又は4 x 12.50 mg/kg (C)という様々な投薬量で2F2又はリツキシマブを静脈内投与した後のカニクイザルのリンパ節中のCD20⁺細胞のフローサイトメトリ分析を示す。

10

20

30

40

50

【図47】図47A - Cは、4x 1.25 mg/kg (A)、4 x 6.25 mg/kg (B)、又は4 x 12.50 mg/kg (C)という様々な投薬量で2F2又はリツキシマブを静脈内投与した後のカニクイザルの末梢血中のCD20^{low}CD23⁺CD40^{high} 発現細胞のフローサイトメトリ分析を示す。

【図48】図48A - Eは、フローサイトメトリで調べたときの、野生型 (WT) CD20、変異型 CD20 (AxP)、又は WT CD20 及び変異型 CD20 (AxP)の両方を発現するCHO細胞に対するリツキシマブ (A)、2F2 (B)、11B8 (C)、B1 (D)、又はアイソタイプ・コントロール抗体 (E) の結合を示す。

【図49】図49A - Fは、2F2、11B8T、B1又はリツキシマブの変異型P172S vs. WT CD20 (A)に対する結合率、2F2T、11B8T、B1、CAT (CAT 13.6E12、マウスモノクローナルIgG 2A 抗CD20抗体、ディアテック社)、コントロール・アイソタイプ抗体 (KLH)又はリツキシマブの変異型CD20 (AxP) vs. WT CD20 (B)に対する結合率、2F2、11B8T、B1又はリツキシマブの変異型N166D vs. WT CD20 (C)に対する結合率、2F2T、CAT又はリツキシマブの変異型N166D vs. WT CD20 (D)に対する結合率、2F2T、2F2、11B8T、B1又はリツキシマブの変異型N163D vs. WT CD20 (E)に対する結合率、及び2F2T、CAT又はリツキシマブの変異型N163D vs. WT CD20 (F)に対する結合率を示す。

【図50】図50は、ELISAで調べたときの2F2T、7D8、及びアイソタイプ・コントロール抗体の、2F2に対して産生する3つの抗イデオタイプ抗体、抗2F2 sab 1.1、抗2F2 sab 1.2、及び抗2F2 sab 1.3に対する結合を示す。

【図51】図51は、ELISAで調べたときの11B8Tの、11B8Tに対して産生する抗イデオタイプ抗体、抗11B8T sab 2.2、抗11B8T sab 2.3、抗体11B8T sab 2.4、抗11B8T sab 2.5、及び抗11B8T sab 2.6への結合を示し、しかし抗イデオタイプ抗2F2抗体への結合は示さない。

【図52】図52A - Cは、ELISAで調べたときの、2F2Tの、2F2に対して産生する3つの抗イデオタイプ抗体、抗2F2 sab 1.1 (A)、抗2F2 sab 1.2 (B)、及び抗2F2 sab 1.3 (C)の用量依存的結合を示す。

【図53】図53は、指定したCDR領域を持つヒトモノクローナル抗体2F2の重鎖V領域のアミノ酸配列 (配列番号2) 及び軽 (カッパ) 鎖V領域のアミノ酸配列 (配列番号4) を示す。

【図54】図54は、ヒトモノクローナル抗体2F2の重鎖V領域のヌクレオチド配列 (配列番号1) 及び軽 (カッパ) 鎖V領域のヌクレオチド配列 (配列番号3) を示す。

【図55】図55は、指定したCDR領域を持つヒトモノクローナル抗体7D8の重鎖V領域のヌクレオチド配列 (配列番号6) 及び軽 (カッパ) 鎖V領域のヌクレオチド配列 (配列番号8) を示す。

【図56】図56は、ヒトモノクローナル抗体7D8の重鎖V領域のヌクレオチド配列 (配列番号5) 及び軽 (カッパ) 鎖V領域のヌクレオチド配列 (配列番号7) を示す。

【図57】図57は、指定したCDR領域を持つヒトモノクローナル抗体11B8の重鎖V領域のアミノ酸配列 (配列番号10) 及び軽 (カッパ) 鎖V領域のアミノ酸配列 (配列番号12) を示す。

【図58】図58は、ヒトモノクローナル抗体11B8の重鎖V領域のヌクレオチド配列 (配列番号9) 及び軽 (カッパ) 鎖V領域のヌクレオチド配列 (配列番号11) を示す。

10

20

30

40

【 図 1 】

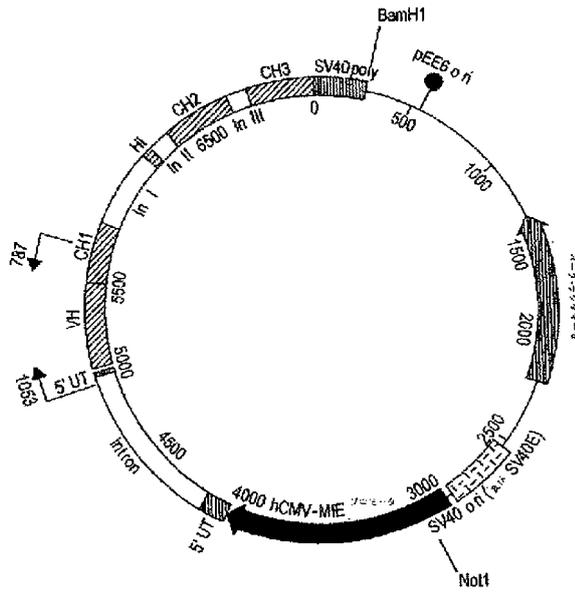


Fig. 1

【 図 2 】

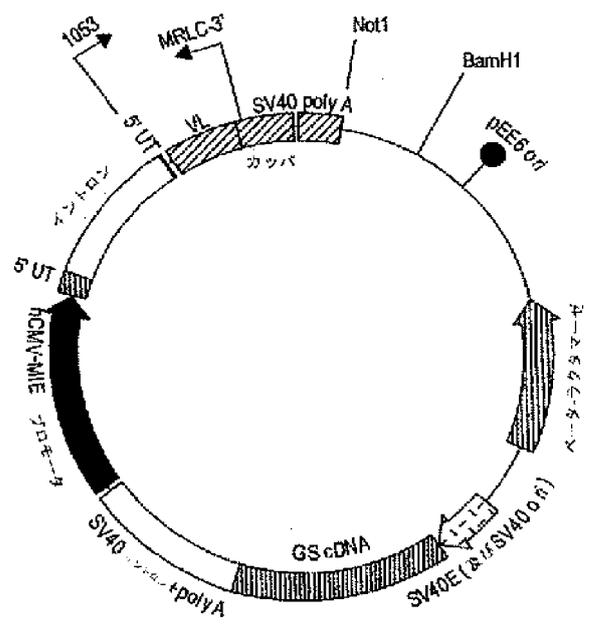


Fig. 2

【 図 3 】

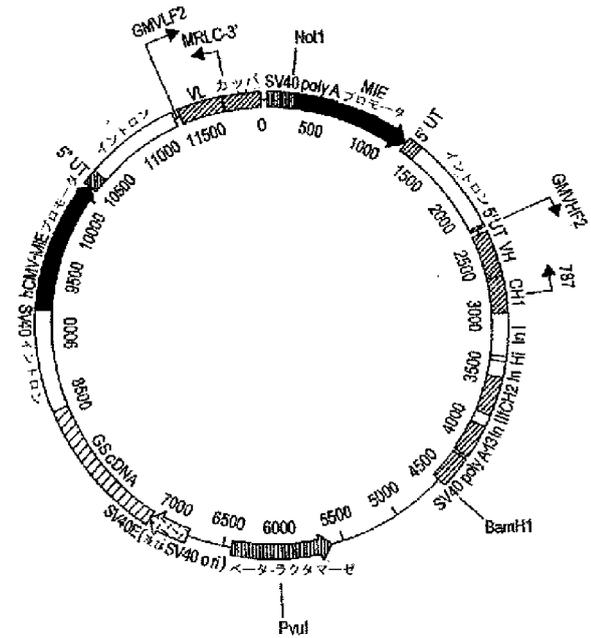


Fig. 3

【 図 4 】

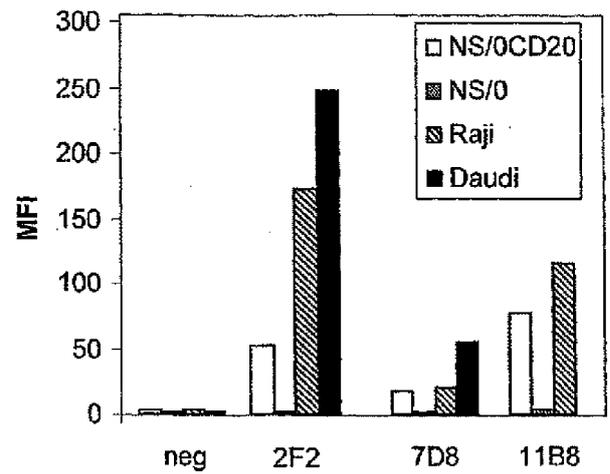


Fig. 4

【 図 5 】

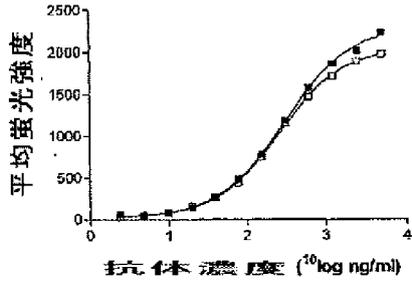


Fig. 5A

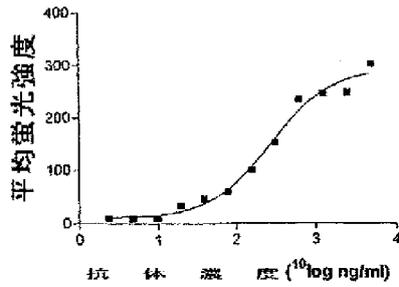


Fig. 5B

【 図 6 】

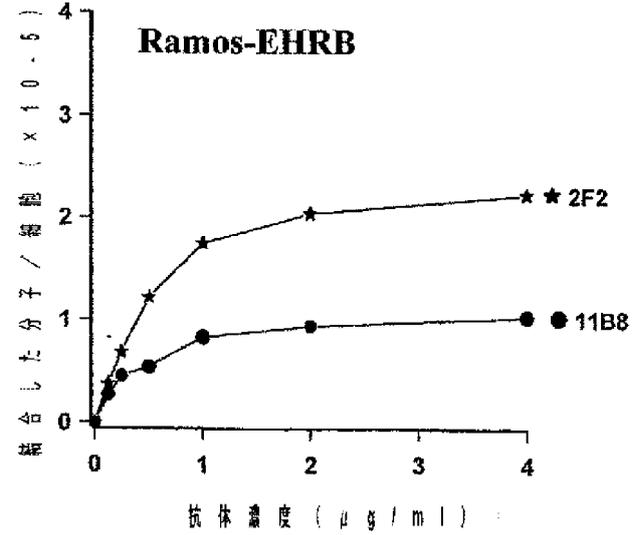


Fig 6

【 図 7 】

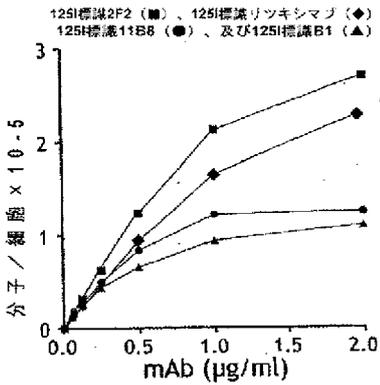


Fig. 7A

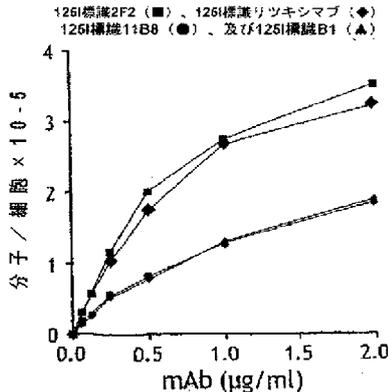


Fig. 7B

【 図 8 】

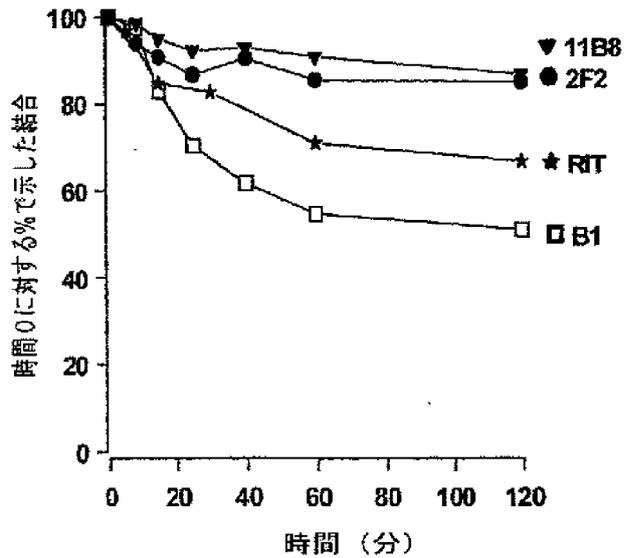


Fig. 8

【 図 9 】

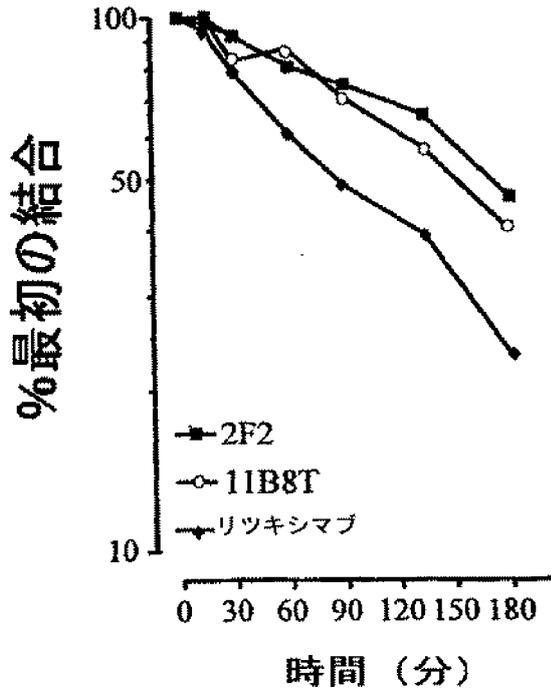


Fig. 9

【 図 10 】

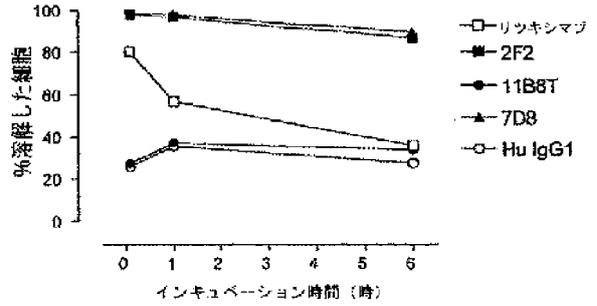


Fig. 10A

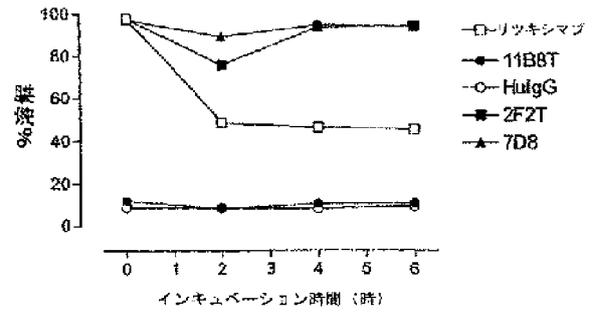


Fig. 10B

【 図 11 A 】

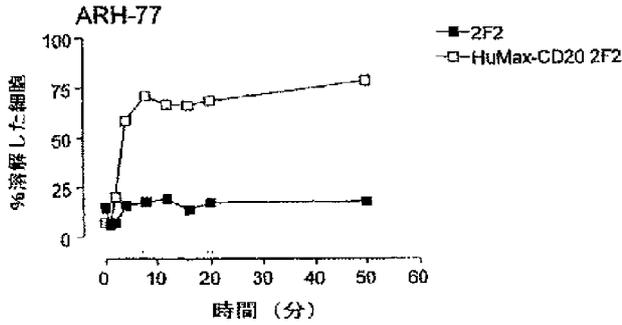


Fig. 11A

【 図 11 B 】

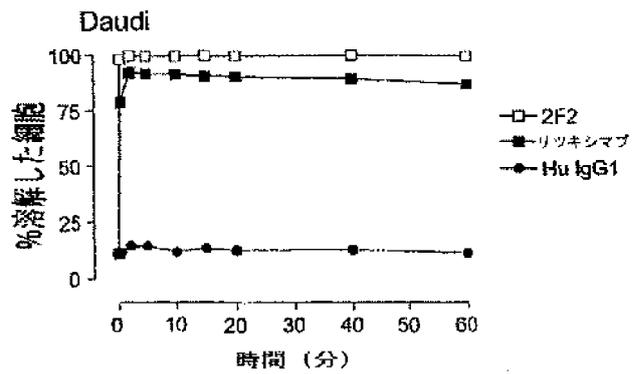


Fig. 11A (B)

【 図 1 1 C 】

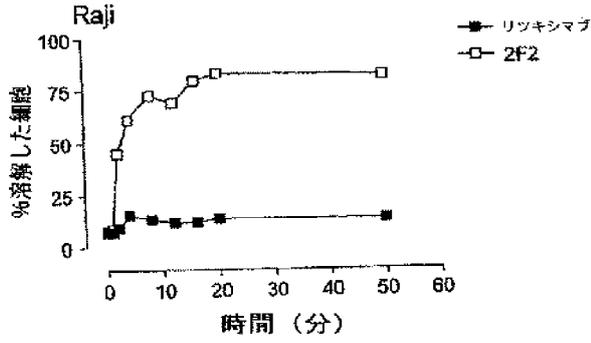


Fig. 11C

【 図 1 1 D 】

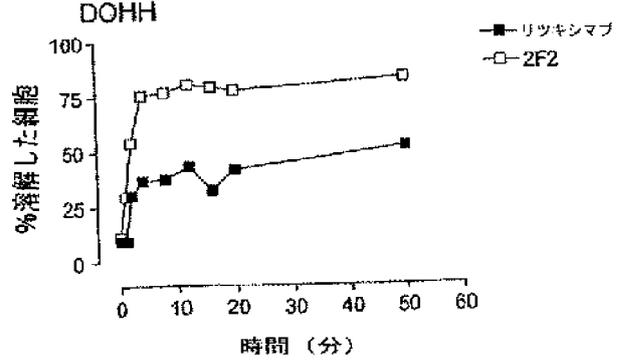


Fig. 11D

【 図 1 1 E 】

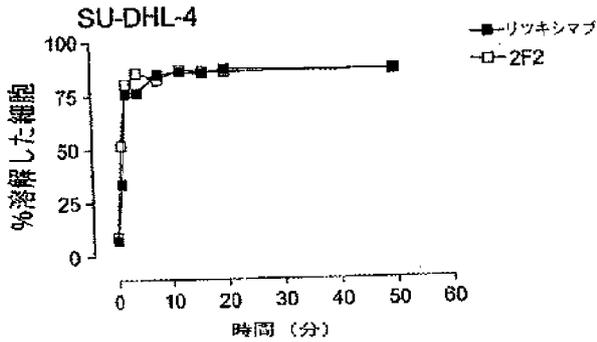


Fig. 11E

【 図 1 2 A 】

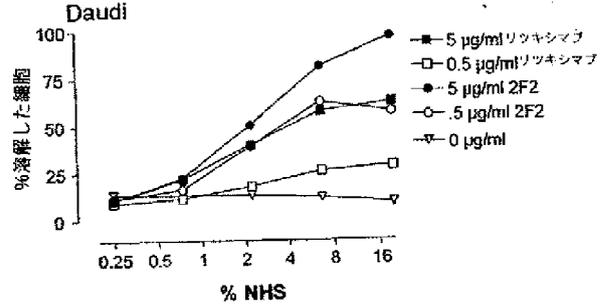


Fig. 12A

【 図 1 2 B 】

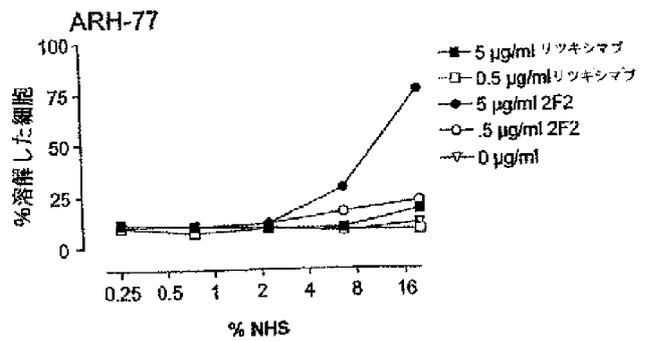


Fig. 12B

【 図 1 2 C 】

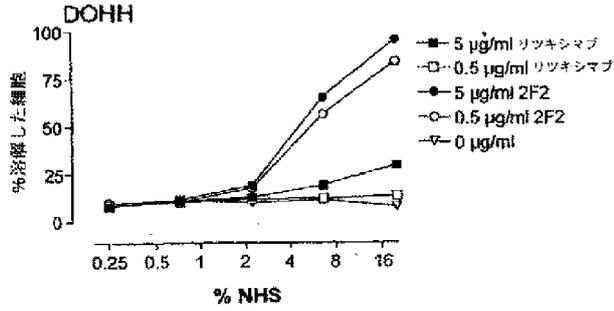


Fig. 12C

【 図 1 3 A 】

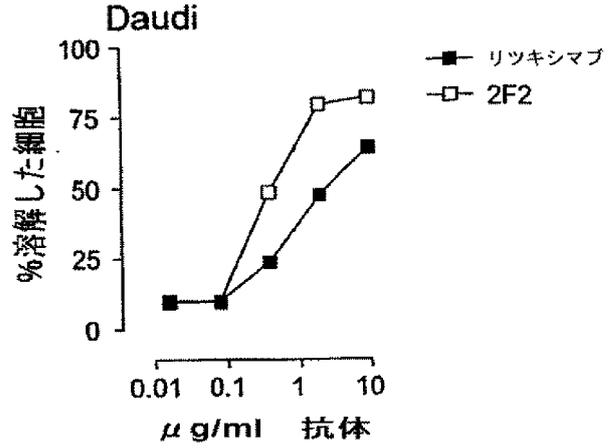


Fig. 13A

【 図 1 2 D 】

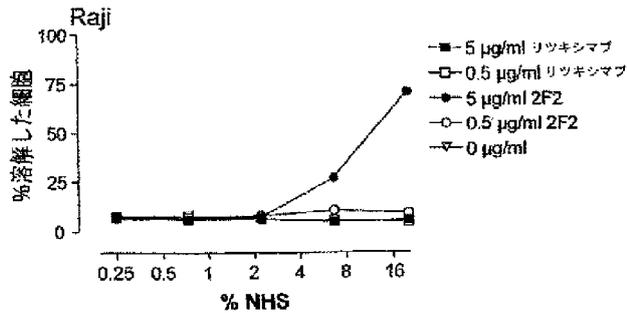


Fig. 12D

【 図 1 3 B 】

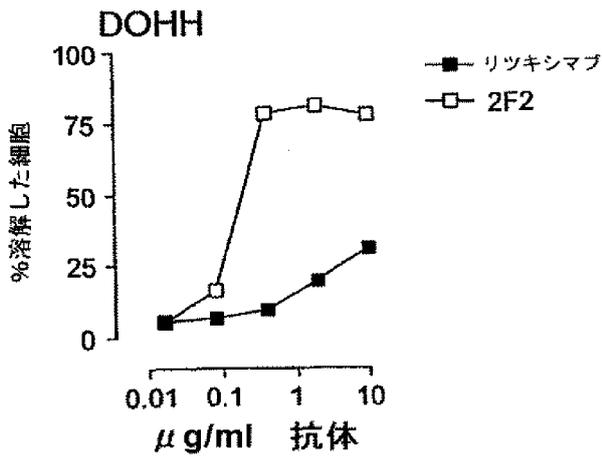


Fig. 13B

【 図 1 3 C 】

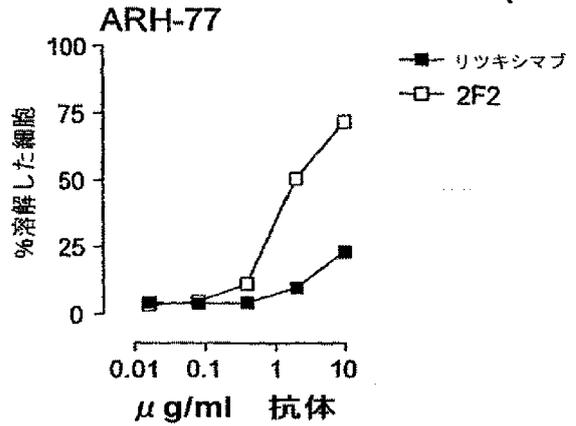


Fig. 13C

【 図 1 3 D 】

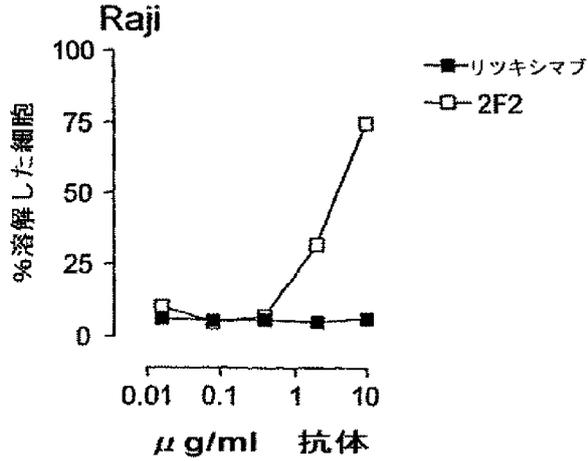


Fig. 13D

【 図 1 4 】

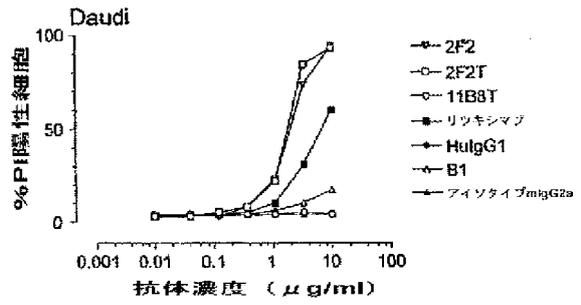


Fig. 14A

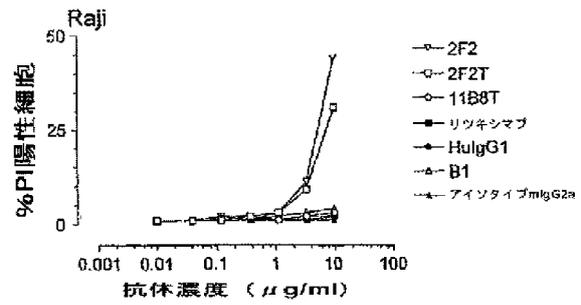


Fig. 14B

【 図 1 5 】

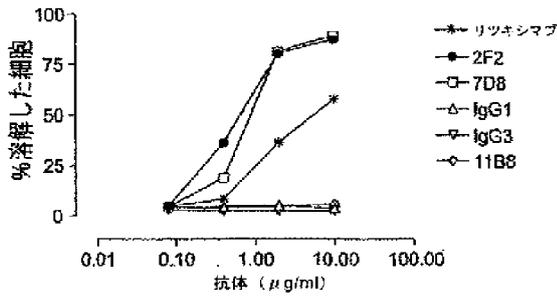


Fig. 15A

【 図 1 6 】

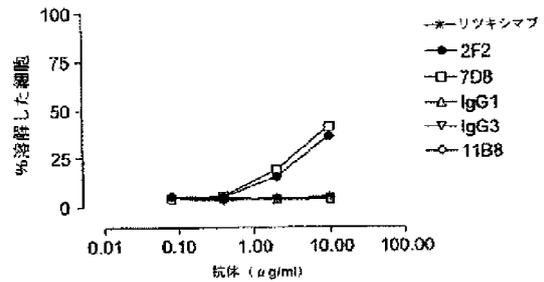


Fig. 16A

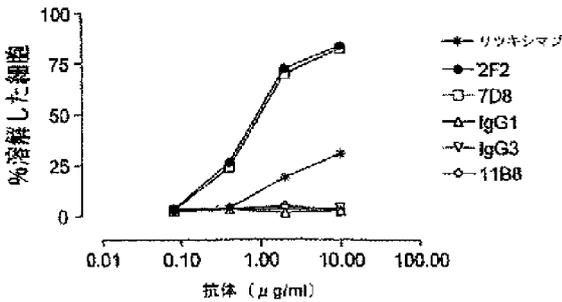


Fig. 15B

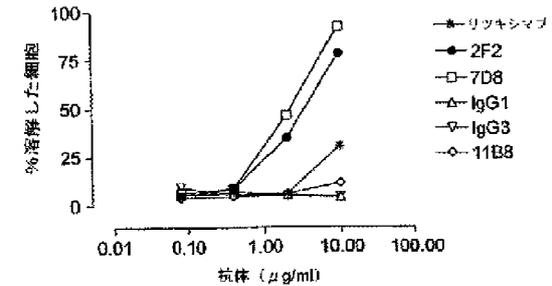


Fig. 16B

【 図 17 A 】

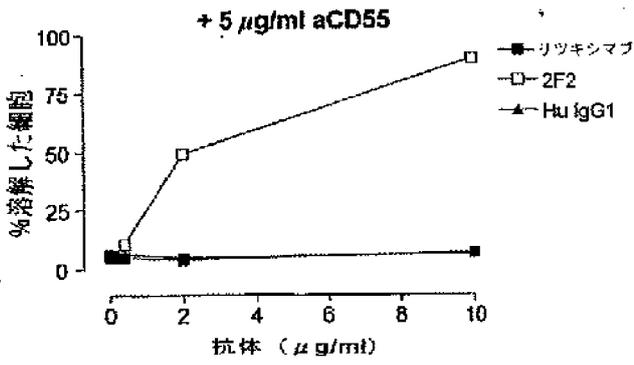


Fig. 17A

【 図 17 B 】

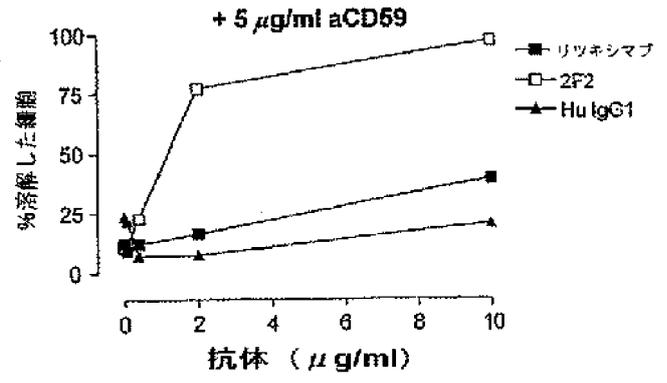


Fig. 17B

【 図 17 C 】

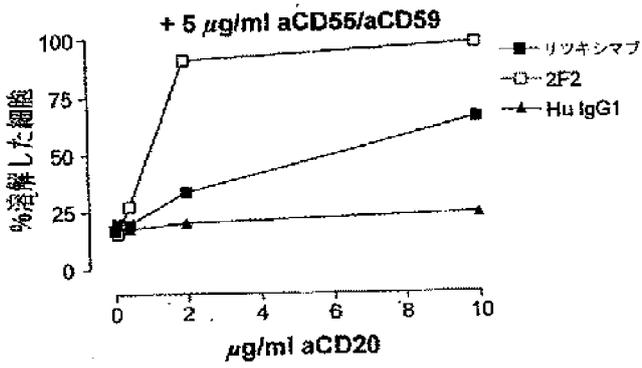


Fig. 17C

【 図 18 A 】

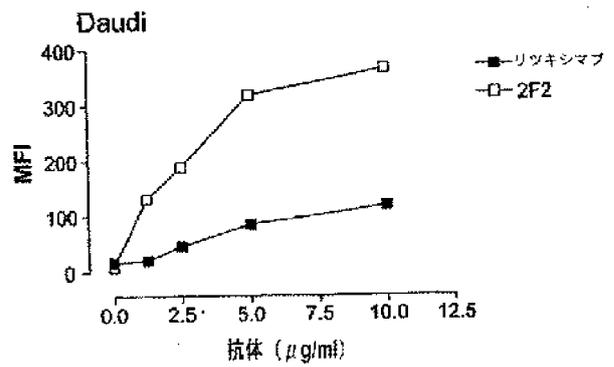


Fig. 18A

【 図 1 8 B 】

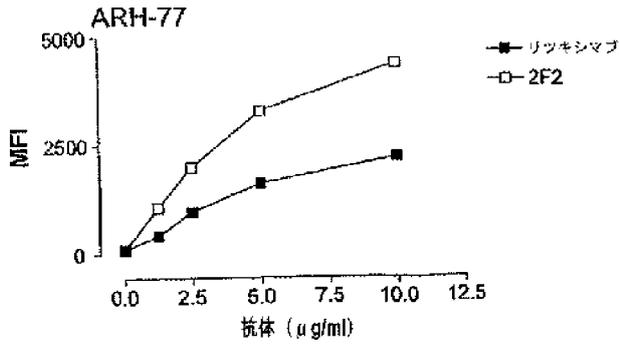


Fig. 18B

【 図 1 8 C 】

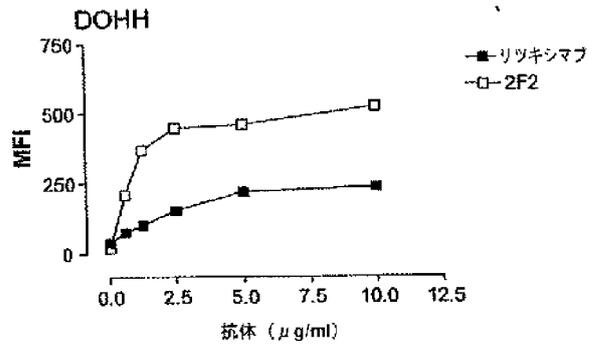


Fig. 18C

【 図 1 8 D 】

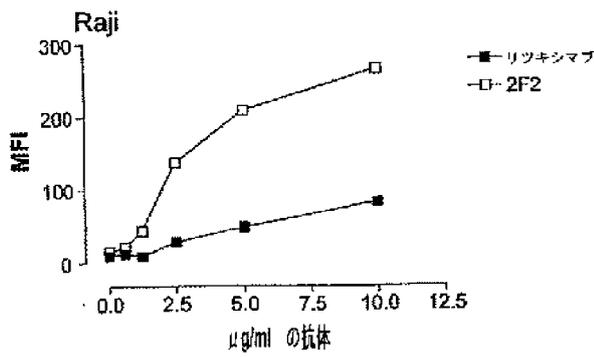


Fig. 18D

【 図 1 9 A 】

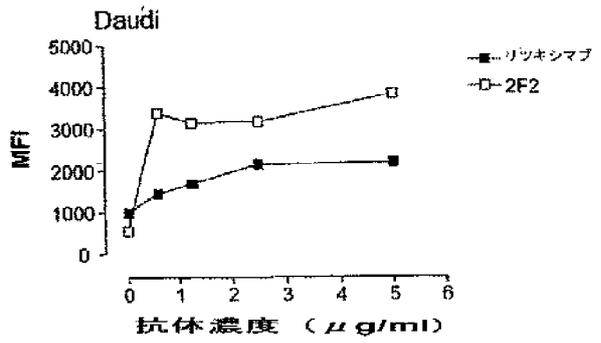


Fig. 19A

【 図 19 B 】

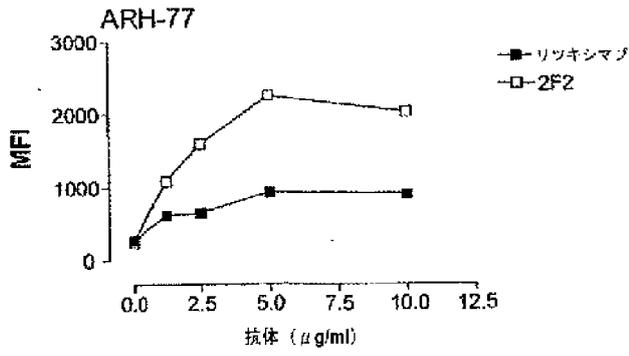


Fig. 19B

【 図 19 C 】

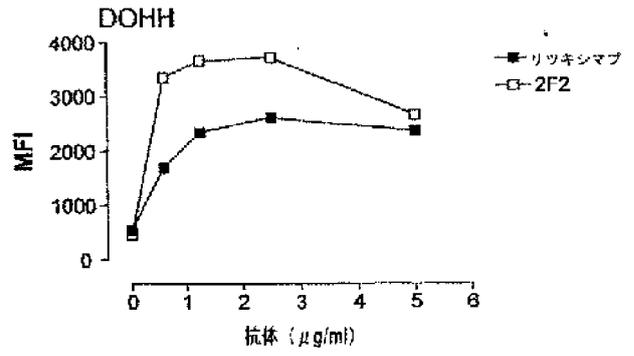


Fig. 19C

【 図 19 D 】

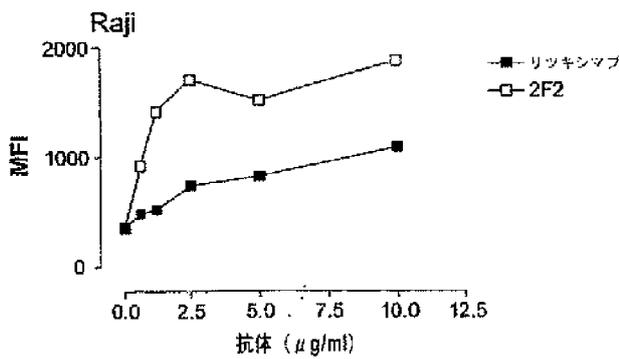


Fig. 19D

【 図 2 1 】

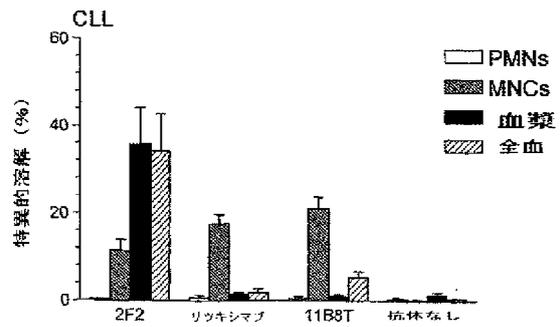


Fig. 21

【 図 2 0 】

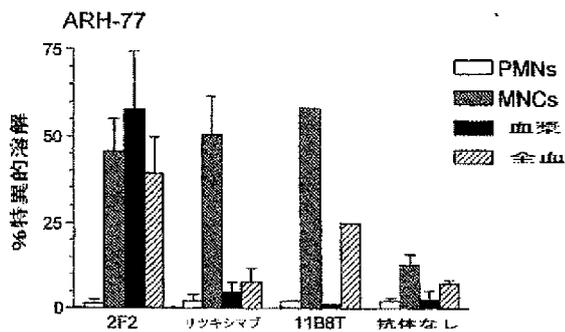


Fig. 20

【 図 2 2 】

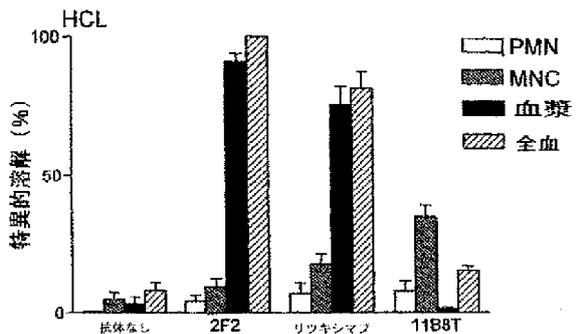


Fig. 22

【 図 2 3 】

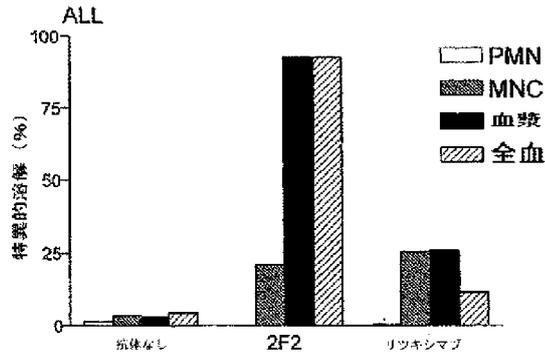


Fig. 23

【 図 2 4 】

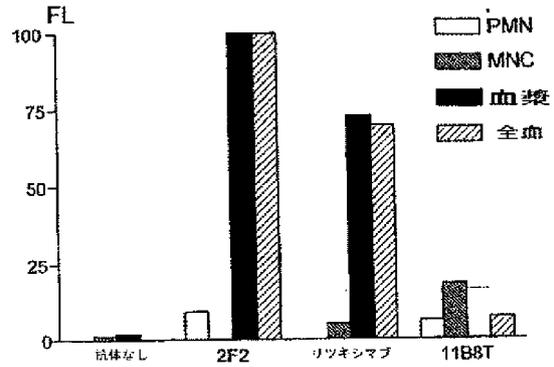


Fig. 24

【 図 2 5 】

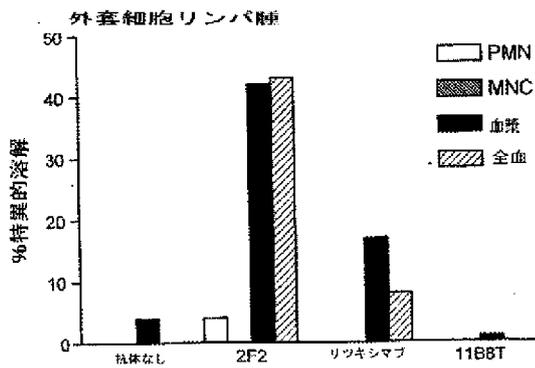


Fig. 25

【 図 2 6 】

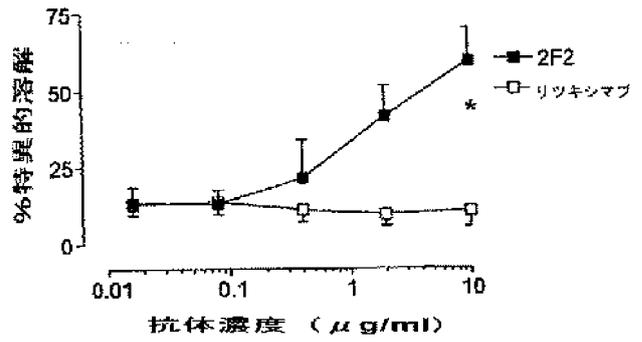


Fig. 26

【 図 2 7 】

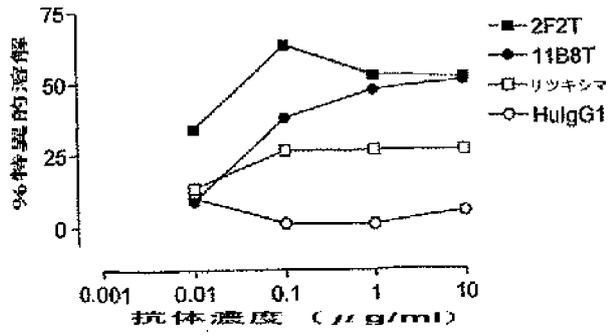


Fig. 27

【 図 2 8 】

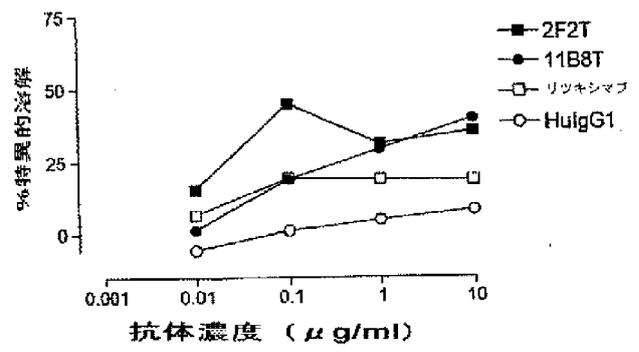


Fig. 28

【 図 2 9 A 】

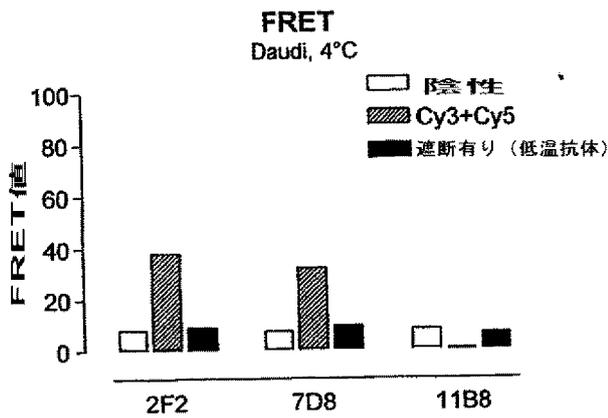


Fig. 29A

【 図 2 9 B 】

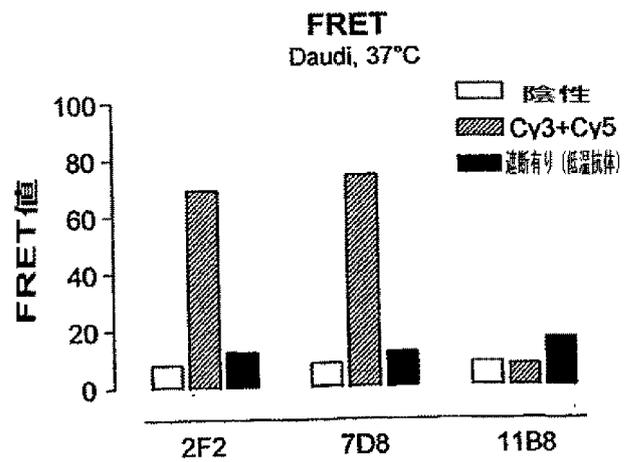


Fig. 29B

【 図 29 C 】

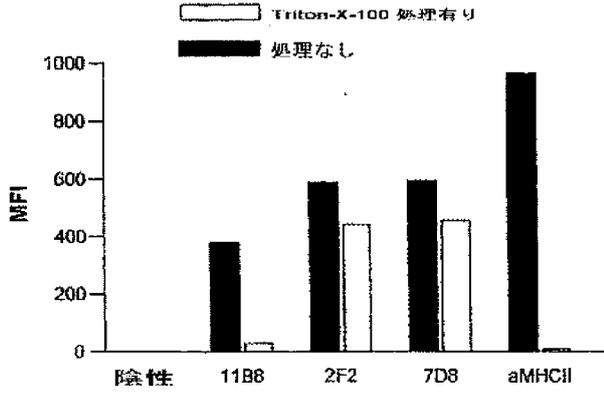


Fig. 29C

【 図 30 】

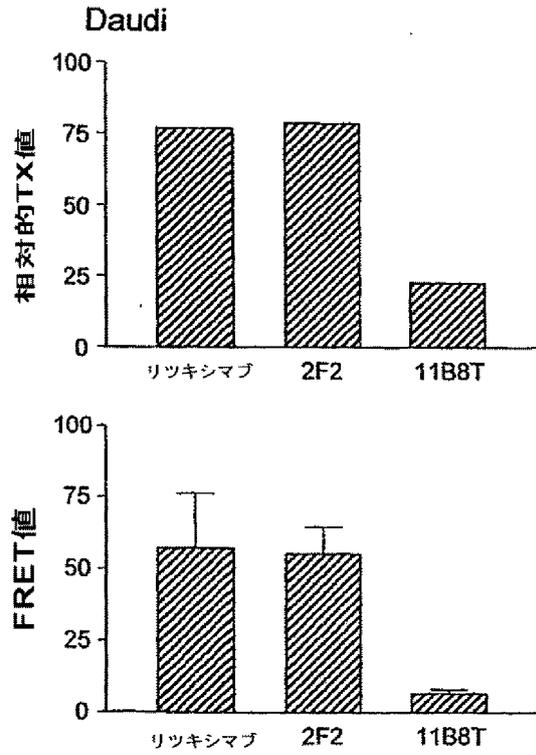


Fig. 30

【 図 31 】

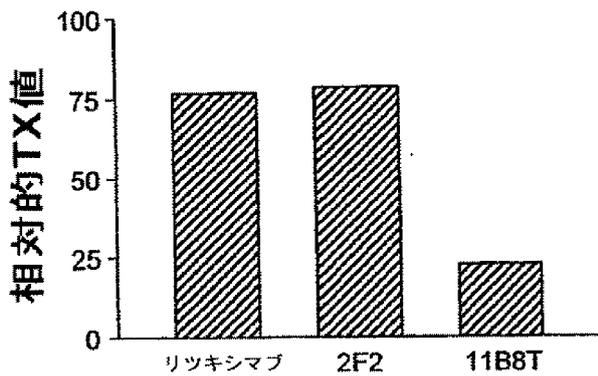


Fig. 31

【 図 32 】

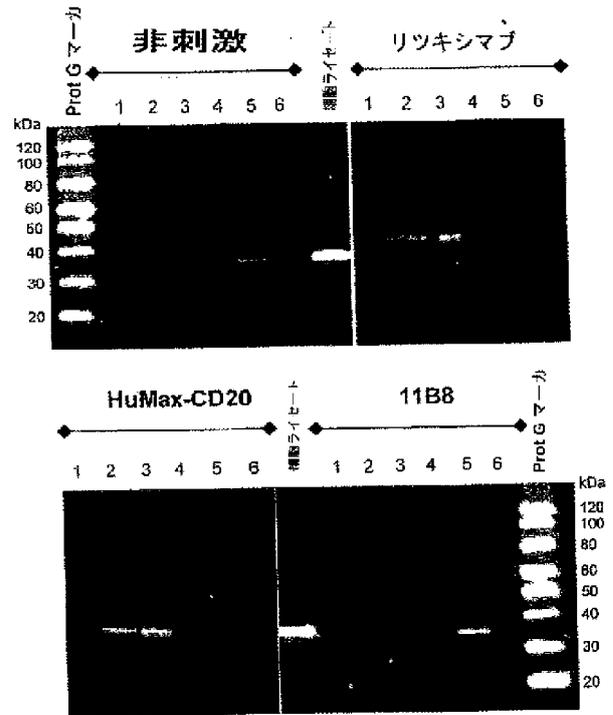


Fig. 32

【 図 3 3 A 】

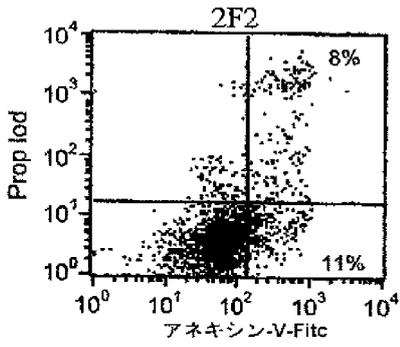


Fig. 33A

【 図 3 3 C 】

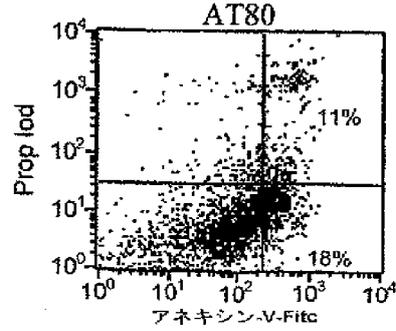


Fig. 33C

【 図 3 3 B 】

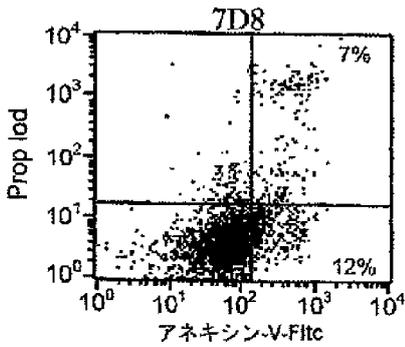


Fig. 33B

【 図 3 3 D 】

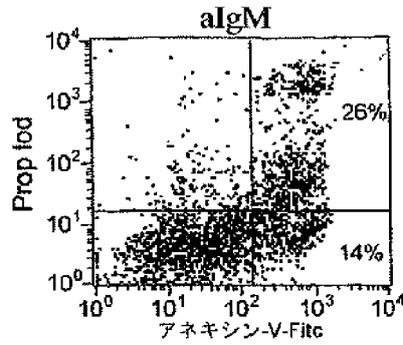


Fig. 33D

【 図 3 3 E 】

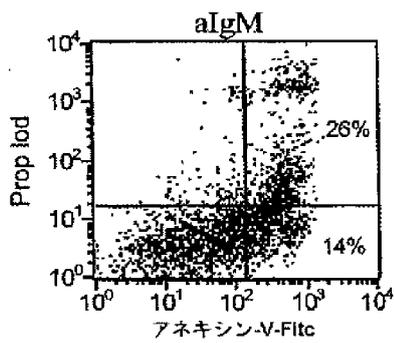


Fig. 33E

【 図 3 3 G 】

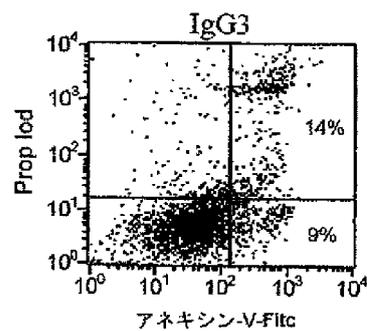


Fig. 33G

【 図 3 3 F 】

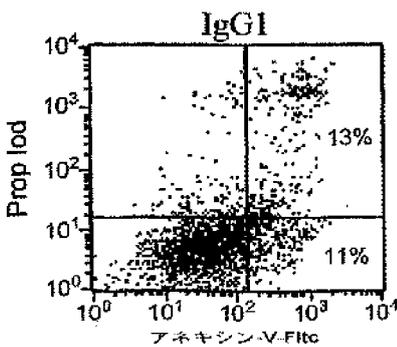


Fig. 33F

【 図 3 4 】

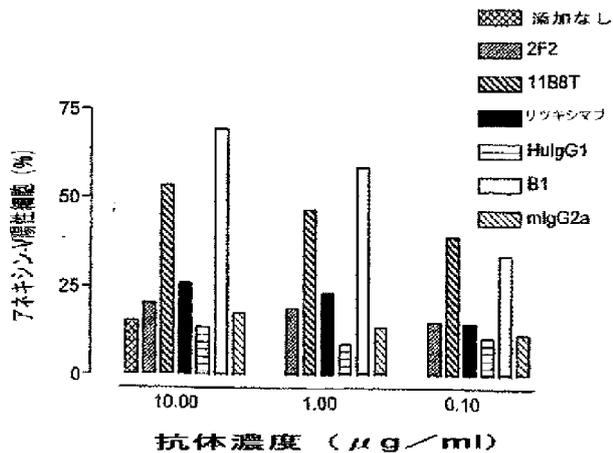


Fig. 34

【 図 3 5 A 】

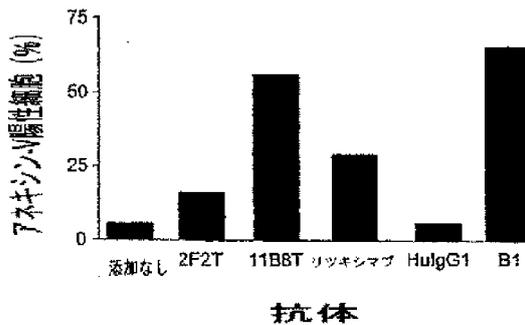


Fig. 35A

【 図 3 5 B 】

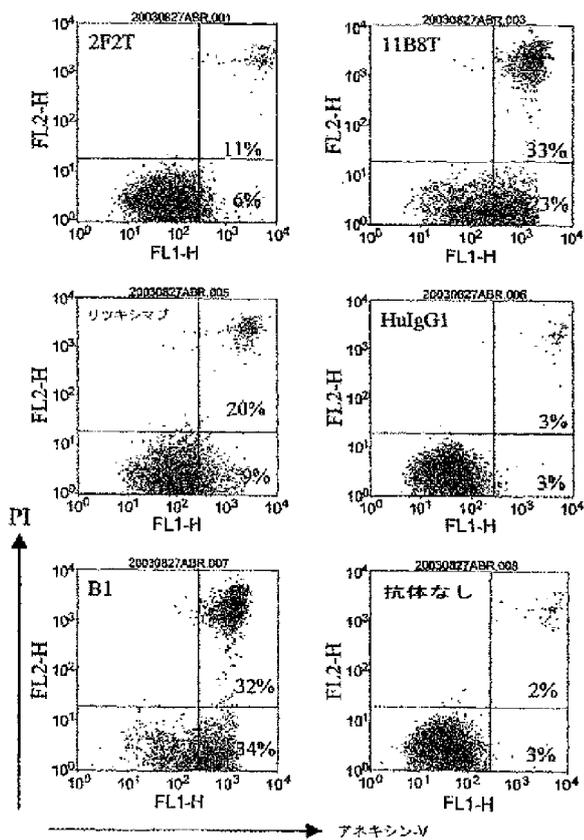


Fig. 35B

【 図 3 6 】

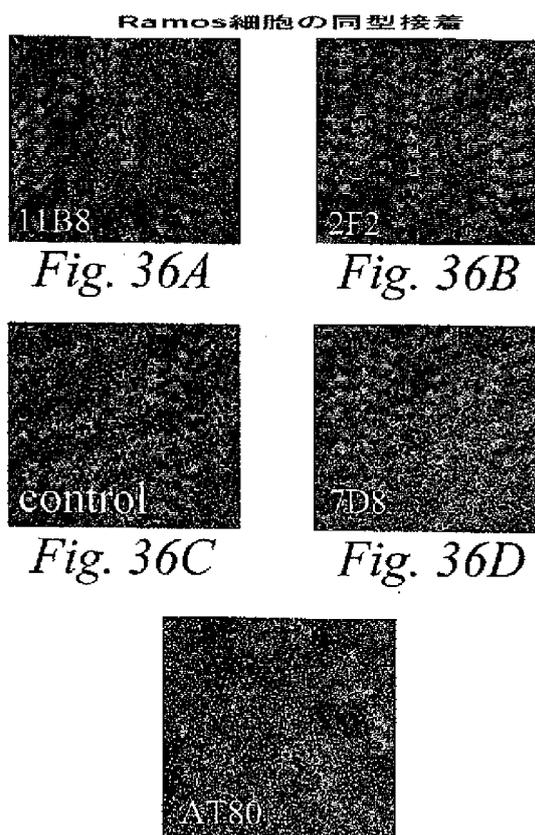


Fig. 36A

Fig. 36B

Fig. 36C

Fig. 36D

Fig. 36E

【 図 3 7 】

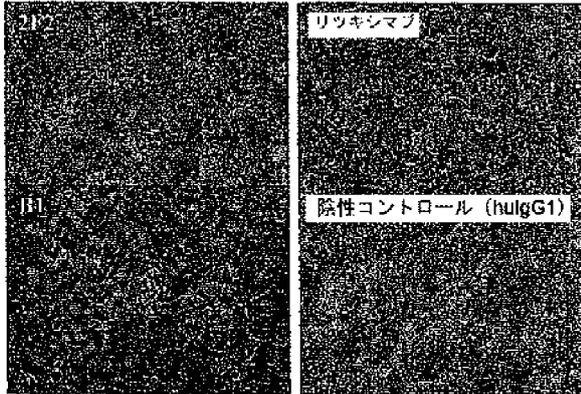


Fig. 37

【 図 3 8 】

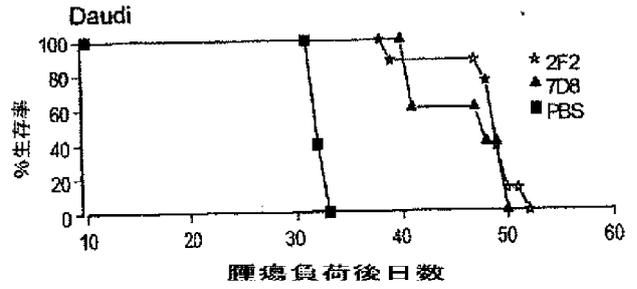


Fig. 38

【 図 3 9 】

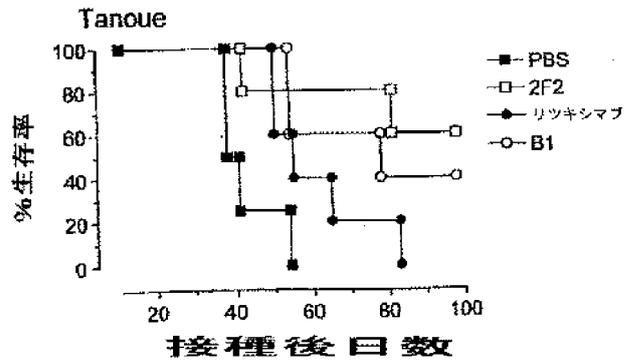


Fig. 39

【 図 4 0 】

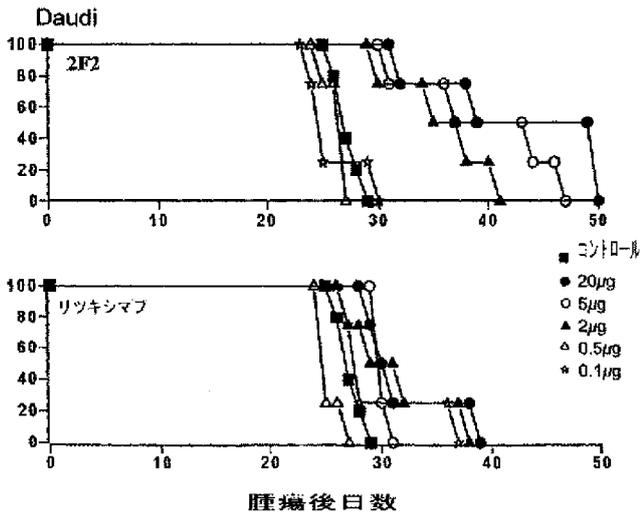


Fig. 40

【 図 4 1 】

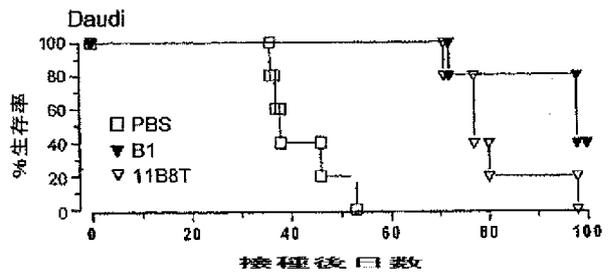


Fig. 41

【 図 4 2 】

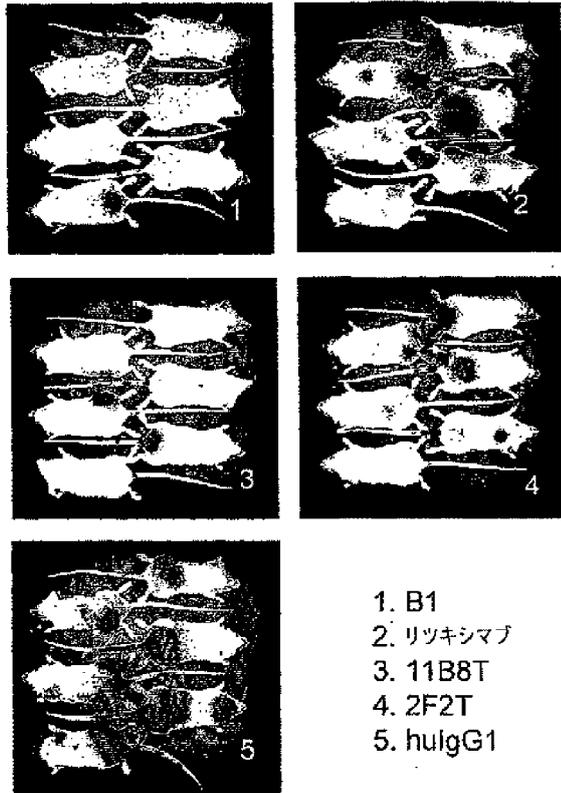


Fig. 42

【 図 4 3 】

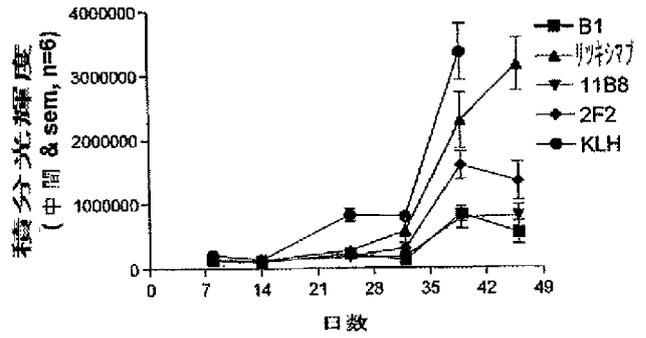


Fig. 43

【 図 4 4 】

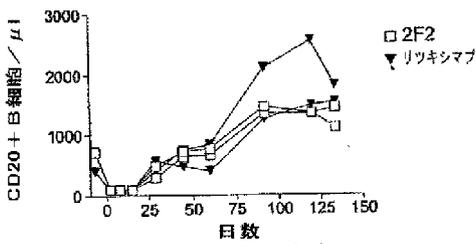


Fig. 44A

【 図 4 5 】

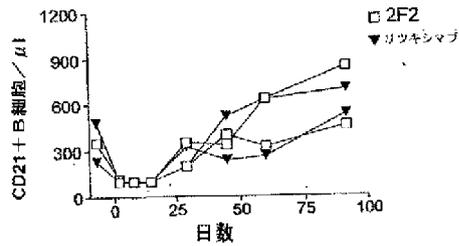


Fig. 45A

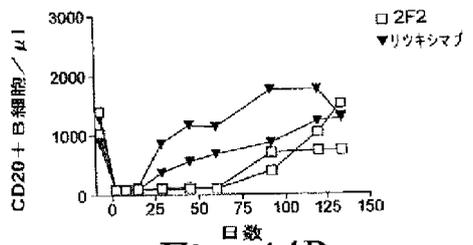


Fig. 44B

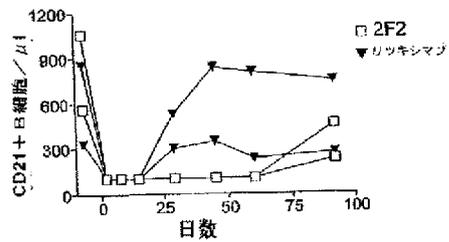


Fig. 45B

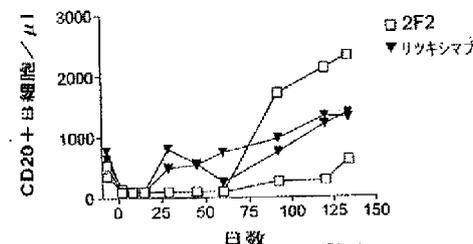


Fig. 44C

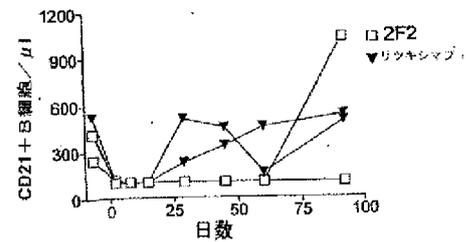


Fig. 45C

【 図 4 6 】

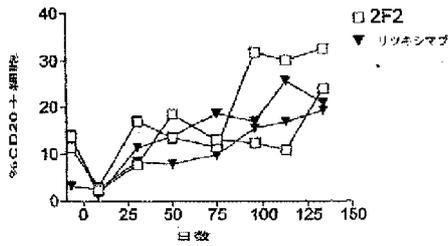


Fig. 46A

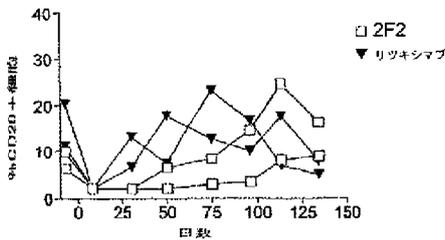


Fig. 46B

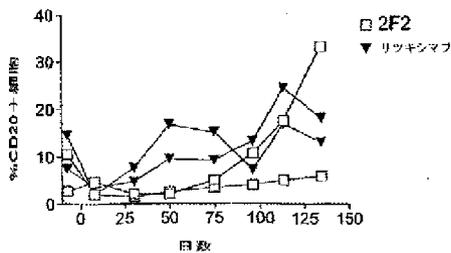


Fig. 46C

【 図 4 7 】

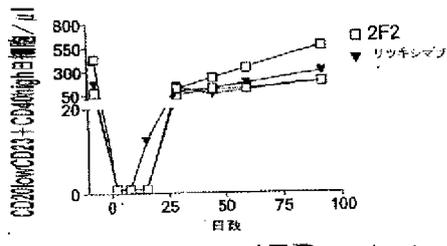


Fig. 47B (A)

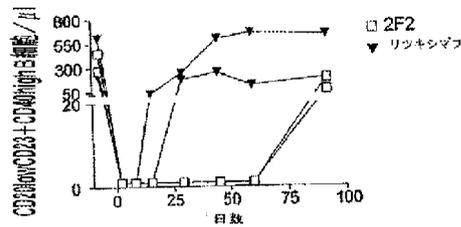


Fig. 47B

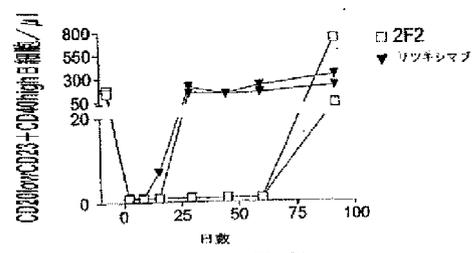


Fig. 47C

【 図 4 8 A 】

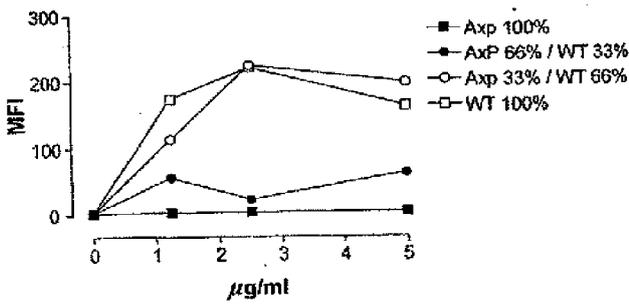


Fig. 48A

【 図 4 8 C 】

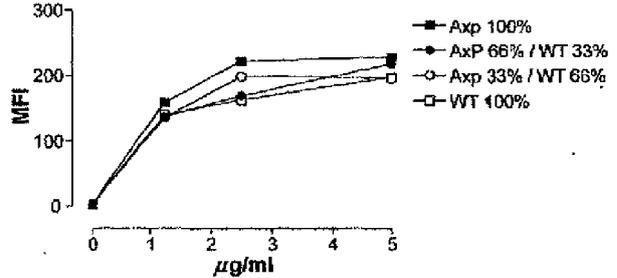


Fig. 48C

【 図 4 8 B 】

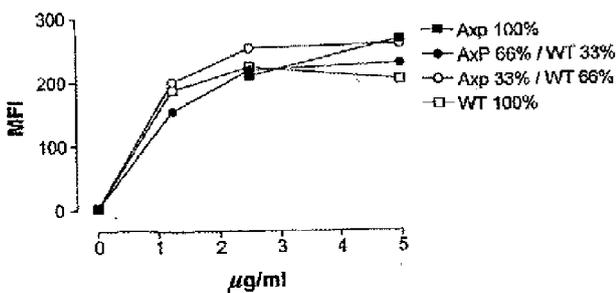


Fig. 48B

【 図 4 8 D 】

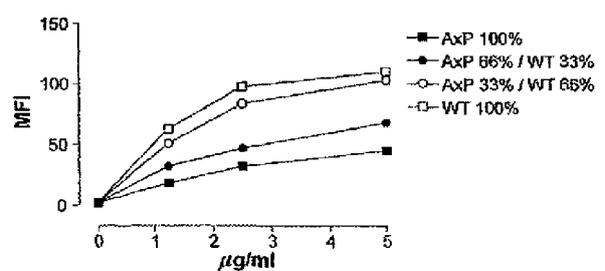


Fig. 48D

【 図 4 8 E 】

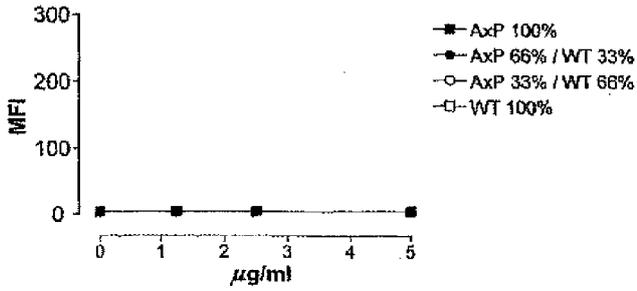


Fig. 48E

【 図 4 9 B 】

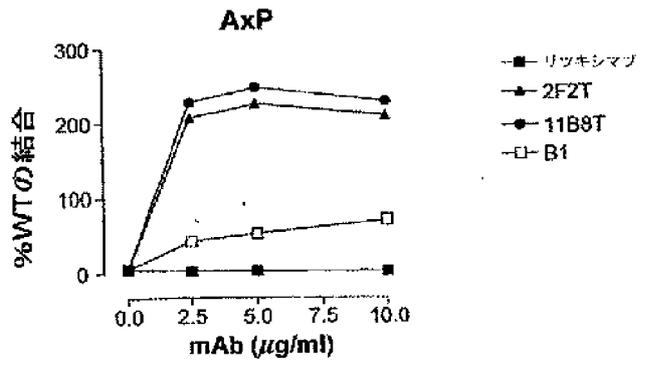


Fig. 49B

【 図 4 9 A 】

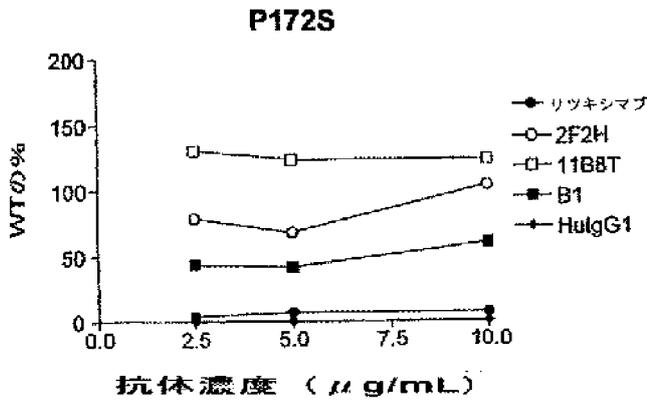


Fig. 49A

【 図 4 9 C 】

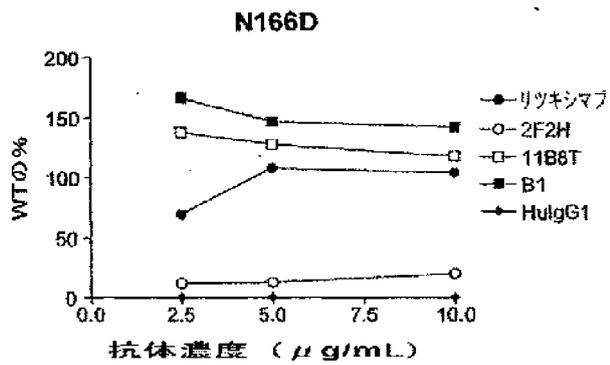


Fig. 49C

【 図 4 9 D 】

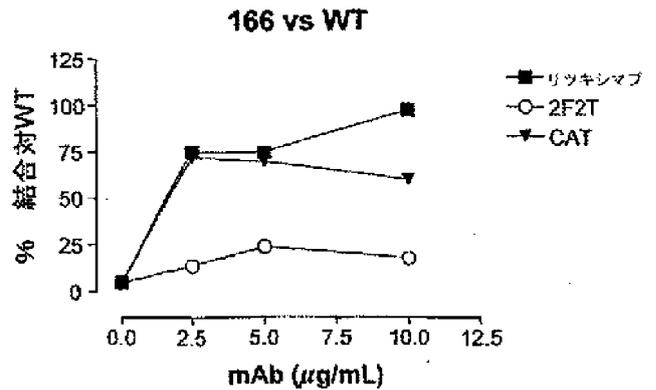


Fig. 49D

【 図 4 9 E 】

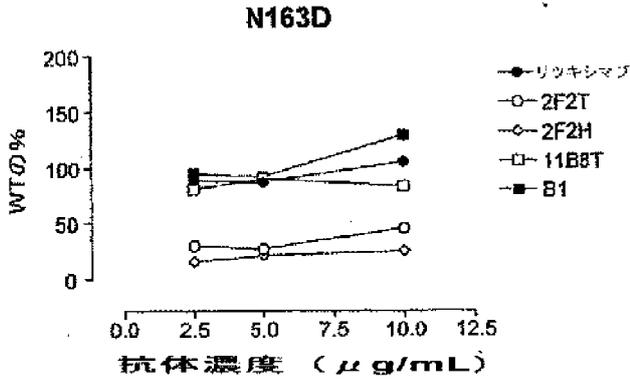


Fig. 49E

【 図 4 9 F 】

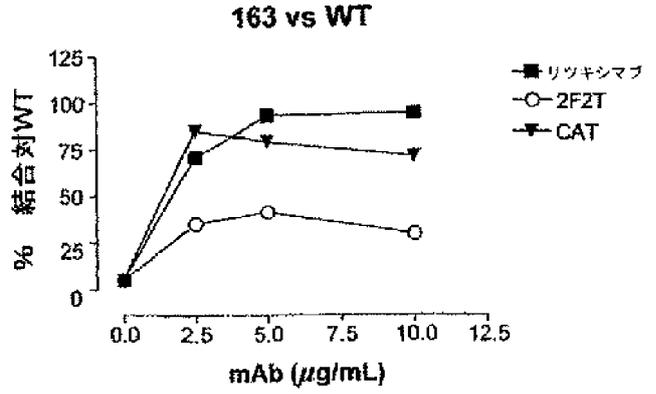


Fig. 49F

【 図 5 0 】

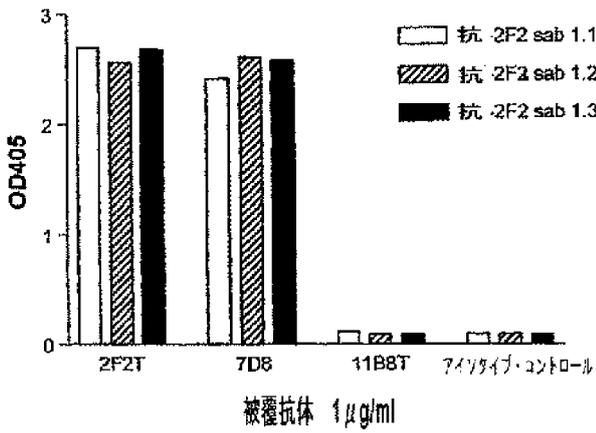


Fig. 50

【 図 5 1 】

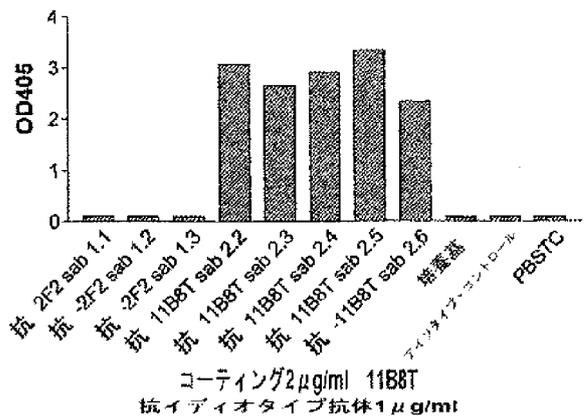


Fig. 51

【 5 2 】

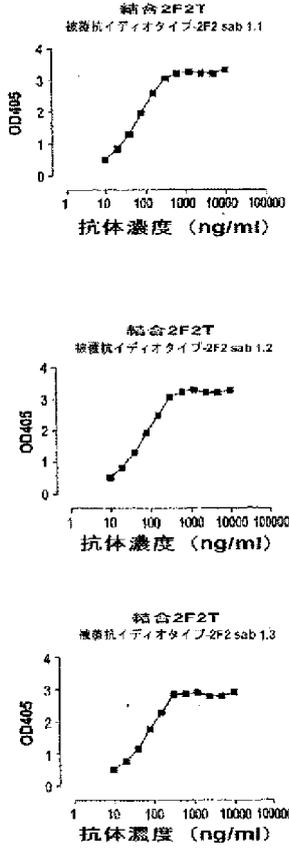


Fig. 52

【 5 3 】

2F2 VHの翻訳

1 MFLGLSWIFL LALKKGVOCE VOLVESGGGL VQPCRSLRLS CAASGFTTFD
 51 YAMWYRQAP GRGLEWVSTI SMNSGIGYA DSVKRFETIS RDNAKKSLYL
 101 QMNSLRADT ALYYCAKDIQ YGMYVYGMVY WGQGITTVIVS S

2F2 VLの翻訳

1 MEAPAQLLFL LLLWLEDTTG EIVLQSPAT ISLSPGERAT LSCDAASQVYS
 51 SYLAWYQKPE GOAPRLLIYD ASNRAIPIA RFSGSGSGTD FTITISLLEP
 101 EDFAVYVYCOO RSNWPTTFGQ GTRLEIK

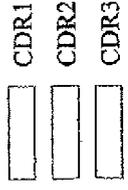


Fig. 53

【 5 4 】

2F2 VH

1 ATGGAG TTGGGA CTGAGC TGGATT TTCCCT TTGGCT AATTTA AAAGCT GTCGAG
 55 TGTGAA GTGCGT GTGGTG GAGTGT GGGGGA GCGTTS GTACAG CCTGGC AGGCTCC
 109 CTGAGA CTCCTC TGTTGA GCGTCT GCAATC ACCCTT AATGAT TATGCC ATGCAC
 163 TGGTTC CGGEMM GCTCCA GGGGAG GSCCTTS GAGHGC CTCGCA ACGTAT AGTISG
 217 AATAGT GGTTCG ATAGCG TATGGG GAGCTC GTGAGG GGCQGA TFCACC ATCTCC
 271 AGAGAC AACGCC AAGBAG TCCCTG TATGTC CABATG AACAGT CTGACA GCTGAG
 325 GACAGG GCGTTS TATAC TGTCCA AAGAT ATACAG TACGGC AACACG TACTAC
 379 GGTATG GAGCTC TGGGCG CAAGGG ACCACG GTACCC GTCTCC TCAG

2F2 VL

1 ATGGAA GCCCGA GCGCAG CTTCTC TTCCTC CTGCTA CTCCTG CTCGCA GATACC
 55 ACCCGA GAAATT CTGTG ACBAGS TCTGCR GCGRCC CTGCTT TTGTCI CCGAGG
 109 GAAAGA GCCACC CTCCTC TGCAGS SCCGAT CAGATG GTTACG AGTTAC TTAGCC
 163 TSETRC CAAGAG AAACCT GGGCAG GCTTCC AGGCTC CTCATC TGTGAT GCAATC
 217 AACDGG GTCAGT GGCATC GCAAGC CCAAGC AGGATC GGTGGC AGTGGG TCTGGG ACAGAC
 271 TTCACT CTCACC ATCAGC AGCCTA GAGCTT GAAGAT TTTCCA GTTAT TACTGT
 325 GAGDAG GGTAGC AACDGG GCGATC ACCCTG GCGGAA GAGACA GAGCTG GAGATT
 379 AAAC

Fig. 54

【 5 5 】

7D8VHの翻訳

1 MELGLSWIFL LALKKGVOCE VOLVESGGGL VQPCRSLRLS CAASGFTTFD
 51 YAMWYRQAP GRGLEWVSTI SMNSGIGYA DSVKRFETIS RDNAKKSLYL
 101 QMNSLRADT ALYYCAKDIQ YGMYVYGMVY WGQGITTVIVS S

7D8VLの翻訳

1 MEAPAQLLFL LLLWLEDTTG EIVLQSPAT ISLSPGERAT LSCDAASQVYS
 51 SYLAWYQKPE GOAPRLLIYD ASNRAIPIA RFSGSGSGTD FTITISLLEP
 101 EDFAVYVYCOO RSNWPTTFGQ GTRLEIK

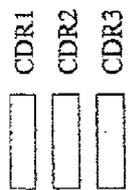


Fig. 55

【 ☒ 5 6 】

7D8VH

```

1  ATGGAG TTGGGA CTGGAG TGGATT TTCCTT TTSCTT ATTITA AAGAGT GTCCAG
55  TGTGAA GTGAG CTGGTG GAGTCT GGGGGA GGCTTG GTACAG CCGAC AGGTC
109  CTGAGA CTCCTC TGTACA GGCCTC GGATTC ACCATT CATGAT TATCC ACCAC
163  TGGGTC CGGTAA GTTCCA GGGAG TGGCTG GAGTGG GCTTCA ACTAAT AGTTGG
217  AATAGT GGTACC ATAGGC TATGGG GACTCT GIGAG GCGCGA TTACCC ATCTCC
271  AGAGAC AAGCC AGAAGC TCCCTG TACTCG CAAATG AACACT CTGAGA GTGAG
325  GACAGG GCGCTG TATTAC TGTGCA AAGAT ATAGC TACGGT PACAC TACTAG
379  GGTATG GACTTC TGGGGC CAGGGG ACCAAG GTCACC GATCCC TCG

```

【 ☒ 5 8 】

VHCD2011B8

```

1  ATGGAG TTGGGG CTGAGC TGGGTT TTCCTT TTTGCT ATATTA AAGAGT GTCCAG
55  TGTGAG GTTCAG CTGCTG CAGTCT GGGGGA GCGTTC GTACAT CCGTGG GGTCC
109  CTGAGA CTCCTC TGTACA GGCCTC GGATTC ACCCTC AGTAC CAGCT ATCCAT
163  TGGGTT GCGGAG GTTCCA GGTAAA GGTCTG GATGGG GTATCA ATATT TGGACT
217  GGGGTT GTGCA TACTAT GCAGAC TCCCTG AAGGGC GGTATC ACCATC TCCAGA
271  GACTAT GTTAG AGTCC TGTGTA TTTCDA AGAAGC AGCTTG AGAGCC GAGGBC
325  ATGGCT GGTAT TACTCT CCAAGA GATPAC TATGGT GCGGGG AGTTT TATGAC
379  GCGCTC TACGGT ATGAGC GTGGG GCGGAA GAGACC ACCCTC ACCCTC TCCCTC
433  G

```

7D8VH

VLCD2011B8

```

1  ATGGAA GCGCCA GGCAG CTTCCTC TTCCTC CTGCTA CTCVGG CTCCCA GATACC
55  ACCCGA GAATTT GGTTC ACACAG TCTCCA GGCACC CTGTCT TTGCT CAGGG
109  GAAAGA GCGACC CTCCTC TGGAG GCGAGT CAGAGT GTTAG AGCTAC TTAGCC
163  TGGTAC GCGAG AACCTT GCGGAG GCTCCG AGGCTC CTCATC TATGAT GCATCC
217  AACAGG GCAACT GGCATC CCGACC AGGCTC AGTCC AGTGG ICTGG ACAGAC
271  TTCCTC CTCACC ATCAGC AGCTTA GACCTT GAAAT TTTCGA GTTTT TACTCT
325  CAGCAG CATTGC AACTGG CCGATC ACCCTC GGCCTA GGGACA CGACTG GAGATT
379  AATC

```

Fig. 58

【 ☒ 5 7 】

VHCD2011B8の翻訳

```

1  MELGISWVEI VALKGVQCE VQLVQSGGL VHPGCSRLRS CTGSGFTPEX
51  RAMFVROAF GKLEWVSTI GTGGWVYAD SVKGFTRSR DMVNSLILO
101  MNSLRAEDMA VYCARPYAG AGSFFIDLAG MDVWNGGTTV TVSS

```

VLCD2011B8の翻訳

```

1  MEAPAQLFL LLLWLDDTG EIVLTQSPAT LISLSPERRT LSCASGQVY
51  SYLAWYQKP GQAPRLLIYD ASNRATGIPA RESGSGGTD FLLTISLSP
101  EDFAVYCCG RSDWFLIFGG GTKVEIK

```

CDR1
 CDR2
 CDR3

Fig. 57

【配列表】

2010042002000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	4 C 0 8 4
A 0 1 H 5/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	4 C 0 8 5
A 0 1 K 67/027 (2006.01)	A 0 1 H 5/00 A	4 H 0 4 5
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 0 1 K 67/027	
C 1 2 Q 1/02 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	C 1 2 Q 1/02	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 17/08 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 17/08	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 31/20 (2006.01)	A 6 1 P 37/08	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 31/20	
A 6 1 P 31/18 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 7/04 (2006.01)	A 6 1 P 31/18	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/04	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 K 48/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
	A 6 1 K 48/00	
	G 0 1 N 33/53 K	
	G 0 1 N 33/53 D	
	G 0 1 N 33/53 N	

(74)代理人 100142929

弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(72)発明者 テーリング, イェシカ

オランダ エヌエヌ エヌエル 1 5 6 2 クロメニ リスドデラーン 7 0

(72)発明者 ルールス, シグリッツ

オランダ イェーヒュー エヌエル 3 7 3 1 デ ビルツ ヘッセンウェッヒ 1 2 1 ベー

(72)発明者 グレニー, マーティン

イギリス エスオー 1 6 7 エーユー サウサンプトン ソーンヒル ロード 1

(72)発明者 ファン デ ウィンケル, ヤン, ヘー., イエイ.

オランダ セーカー エヌエル 3 7 0 7 ザイスツ ウェルレングデ スロツツラーン 8 0

(72)発明者 バレン, パウル

オランダ ペーエル エヌエル 3 9 8 4 オーダイク ウェルドルペルワールツ 1 7
 (72)発明者 ペターセン, ヨーン
 デンマーク ソールコーウェン 6 デーケー 2 9 6 0 ウンステッド クスト
 (72)発明者 パーズゴン, オレ, ディー., エム., エスシー
 スウェーデン シュルコガータン 3 エス 2 1 1 2 2 マルメ
 (72)発明者 ファン, ハイチュン
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 5 3 9 フリーモント スエノ ウェイ 2 4 2 5
 Fターム(参考) 2B030 AD08 CA14
 4B024 AA01 AA15 BA53 BA54 CA02 DA02 EA04 HA01 HA15
 4B063 QA18 QA19 QQ08 QQ79 QR48 QR55 QS33
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA05 DA13 DA14
 4B065 AA90X AA90Y AB01 AB02 AC14 BA02 CA44 CA46
 4C084 AA13 AA19 MA02 NA05 NA14 ZB072 ZB082 ZB271 ZC511 ZC512
 4C085 AA14 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 CC02 CC23 DD62 EE01
 GG08 GG10
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA22 EA54 FA72 FA74