

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6890581号  
(P6890581)

(45) 発行日 令和3年6月18日(2021.6.18)

(24) 登録日 令和3年5月27日(2021.5.27)

|                                  |                |       |
|----------------------------------|----------------|-------|
| (51) Int.Cl.                     | F I            |       |
| <b>C 0 7 K 16/28 (2006.01)</b>   | C 0 7 K 16/28  | Z N A |
| <b>C 1 2 N 5/10 (2006.01)</b>    | C 1 2 N 5/10   |       |
| <b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>   | C 1 2 P 21/08  |       |
| <b>A 6 1 K 39/395 (2006.01)</b>  | A 6 1 K 39/395 | N     |
| <b>A 6 1 K 31/5365 (2006.01)</b> | A 6 1 K 39/395 | L     |
| 請求項の数 78 (全 75 頁) 最終頁に続く         |                |       |

(21) 出願番号 特願2018-510734 (P2018-510734)  
 (86) (22) 出願日 平成28年8月26日 (2016. 8. 26)  
 (65) 公表番号 特表2018-532699 (P2018-532699A)  
 (43) 公表日 平成30年11月8日 (2018. 11. 8)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/048887  
 (87) 国際公開番号 W02017/040247  
 (87) 国際公開日 平成29年3月9日 (2017. 3. 9)  
 審査請求日 令和1年8月23日 (2019. 8. 23)  
 (31) 優先権主張番号 62/211, 455  
 (32) 優先日 平成27年8月28日 (2015. 8. 28)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 62/212, 183  
 (32) 優先日 平成27年8月31日 (2015. 8. 31)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 517301966  
 デビオファーム インターナショナル,  
 エス. アー.  
 スイス国 ツェーハー 1002 ローザ  
 ンヌ, シュマン メシドール 5-7,  
 フォルム “アプレードゥマン”, カ  
 ス ポスタル 5911  
 (74) 代理人 100078282  
 弁理士 山本 秀策  
 (74) 代理人 100113413  
 弁理士 森下 夏樹  
 (74) 代理人 100181674  
 弁理士 飯田 貴敏  
 (74) 代理人 100181641  
 弁理士 石川 大輔  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD37の検出のための抗体およびアクセシ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号9のポリペプチドおよび配列番号10のポリペプチドを含む抗体と同じCD37エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であって、それぞれ配列番号3~5の重鎖可変領域(VH)CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびにそれぞれ配列番号6~8の軽鎖可変領域(VL)CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項2】

配列番号9のポリペプチドおよび配列番号10のポリペプチドを含む抗体のCD37に対する結合を競合的に阻害する、CD37に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片であって、それぞれ配列番号3~5の重鎖可変領域(VH)CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびにそれぞれ配列番号6~8の軽鎖可変領域(VL)CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項3】

それぞれ配列番号3~5のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびに配列番号6~8のVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、CD37に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

【請求項4】

配列番号9および10のポリペプチド配列と少なくとも90%同一であるポリペプチド配列を含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 5】

前記ポリペプチド配列が、配列番号 9 および 10 のポリペプチド配列と少なくとも 95% 同一である、請求項 4 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 6】

前記ポリペプチド配列が、配列番号 9 および 10 のポリペプチド配列と少なくとも 99% 同一である、請求項 5 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 7】

配列番号 9 および 10 の配列のアミノ酸を含むポリペプチド配列を含む、請求項 6 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 8】

配列番号 9 を含む重鎖可変領域および配列番号 10 を含む軽鎖可変領域を含む、CD37 に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 9】

前記抗体が、組換えにより作製される、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 10】

マウス、非ヒト、ヒト化、キメラ、またはヒトのものである、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 11】

前記ヒト化抗体が、表面再構成されたものである、請求項 10 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 12】

全長抗体である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 13】

抗原結合性断片である、請求項 1 から 11 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 14】

Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、一本鎖FvもしくはscFv、ジスルフィド連結されたFv、V-NARDメイン、IgNar、細胞内抗体、IgG CH<sub>2</sub>、ミニボディ、F(ab')<sub>3</sub>、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、単一ドメイン抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub>またはscFv-Fcを含む、請求項 13 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 15】

Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖FvもしくはscFv、ジスルフィド連結されたFv、細胞内抗体、IgG CH<sub>2</sub>、ミニボディ、F(ab')<sub>3</sub>、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、DVD-Ig、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub>またはscFv-Fcを含む、請求項 13 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 16】

約 0.5 ~ 約 10 nM の K<sub>d</sub> でヒト CD37 に結合する、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 17】

約 1.0 nM またはより良い K<sub>d</sub> でヒト CD37 に結合する、請求項 1 から 15 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 18】

CD37 のアミノ酸 107 ~ 242 (配列番号 20) を含むポリペプチドに結合する、請求項 2 から 17 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 19】

CD37 のアミノ酸 107 ~ 235 (配列番号 19) を含むポリペプチドに結合する、請求項 2 から 18 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

20

30

40

50

## 【請求項 20】

配列番号 15 に示す配列に結合する、請求項 2 から 19 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 21】

配列番号 16 に示す配列に結合する、請求項 2 から 20 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 22】

配列番号 17 に示す配列に結合する、請求項 2 から 21 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 23】

CD37 のアミノ酸 107 ~ 242 (配列番号 20) を含むポリペプチドに結合するが、CD37 のアミノ酸 138 ~ 235 からなるポリペプチドに結合しない、請求項 2 から 22 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 24】

CD37 のアミノ酸 107 ~ 235 (配列番号 19) を含むポリペプチドに結合するが、CD37 のアミノ酸 138 ~ 235 からなるポリペプチドに結合しない、請求項 2 から 23 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 25】

配列番号 15 のポリペプチドに結合するが、配列番号 18 のポリペプチドに結合しない、請求項 2 から 24 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 26】

配列番号 16 のポリペプチドに結合するが、配列番号 18 のポリペプチドに結合しない、請求項 2 から 25 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 27】

配列番号 17 のポリペプチドに結合するが、配列番号 18 のポリペプチドに結合しない、請求項 2 から 26 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 28】

CD37 のアミノ酸 110 ~ 137 中の少なくとも 1 つのアミノ酸に結合する、請求項 2 から 27 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 29】

結合親和性が、フローサイトメトリー、Biacore、ELISA またはラジオイムノアッセイによって測定される、請求項 16 から 28 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 30】

検出可能に標識されている、請求項 1 から 29 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

## 【請求項 31】

請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を産生する細胞。

## 【請求項 32】

単離されている、請求項 31 に記載の細胞。

## 【請求項 33】

請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を作製する方法であって、(a) 請求項 31 または 32 に記載の細胞を培養するステップと；(b) 前記培養細胞から前記抗体またはその抗原結合性断片を単離するステップとを含む方法。

## 【請求項 34】

請求項 1 から 30 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片ならびに IHC 緩衝液、ELISA 緩衝液および FACS 緩衝液からなる群から選択される緩衝液を含む組成物。

## 【請求項 35】

10

20

30

40

50

サンプル中のCD37発現を検出する方法であって、前記サンプルを請求項1から30のいずれかに記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または請求項34に記載の組成物と接触させるステップを含む、方法。

【請求項36】

前記抗体またはその抗原結合性断片が、検出可能に標識されている、請求項35に記載の方法。

【請求項37】

前記標識が、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素標識、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁気粒子からなる群から選択される、請求項36に記載の方法。

10

【請求項38】

前記標識が、酵素標識である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】

CD37発現が、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、細胞数測定、免疫蛍光アッセイ、酵素イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、化学発光アッセイまたは免疫組織化学アッセイによって決定される、請求項35から38のいずれか一項に記載の方法。

【請求項40】

CD37発現が、免疫組織化学(IHC)アッセイによって決定される、請求項39に記載の方法。

20

【請求項41】

抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を含む、がん治療の有効性を増大させるための組成物であって、前記組成物が、がんを有する対象に投与されることを特徴とし、前記対象由来のがん性サンプルにおいてCD37の発現の増大が、請求項1から30のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または請求項34に記載の組成物を使用して検出されている、組成物。

【請求項42】

CD37に対する請求項1から30のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片の結合を、抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤に応答する可能性が高いがんを同定するための指標とする方法であって、

30

a. 前記がん由来細胞を含む生体サンプルを請求項1から30のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または請求項34に記載の組成物と接触させるステップと；

b. (a)の前記生体サンプルにおける、CD37に対する前記抗体またはその抗原結合性断片の前記結合を検出するステップと；

c. ステップ(b)の前記結合にスコアを割り当てるステップであって、前記スコアが1つまたは複数の参照サンプルとの比較に基づいて割り当てられる、ステップと；

d. ステップ(c)における前記スコアを参照組織または細胞のスコアと比較するステップと

を含み、正常もしくは低CD37発現参照サンプルのスコアより大きい前記がんCD37レベルのスコアまたは高CD37発現参照サンプルのスコアと等しいもしくはより大きい前記がんCD37レベルのスコアが、前記がんが、抗CD37抗体に応答する可能性が高いことを示す、方法。

40

【請求項43】

抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を含む、がんを有する患者を処置するための組成物であって、前記組成物は、CD37発現スコアが、前記患者が前記組成物の投与から利益を得ることになることを示す場合に、前記患者に投与されることを特徴とし、前記CD37発現スコアは、前記患者から得たがん性サンプル中のCD37発現の検出から決定され、前記検出が、請求項1から30のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または請求項34に記載の組成物を使用して実施される、組成

50

物。

【請求項 4 4】

C D 3 7 発現のレベルを、がんが、抗 C D 3 7 活性がある薬剤による処置に感受性があると同定するための指標とする方法であって、

a . 請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または請求項 3 4 に記載の組成物を使用して前記がん由来がん性サンプル中の C D 3 7 発現のレベルを検出するステップであって、前記検出が、1 つまたは複数の参照サンプルにおける染色強度または染色均一性と比較して C D 3 7 発現がん性サンプルにおける染色強度または染色均一性を区別する方法の使用を含むステップと；

b . 前記がん性サンプルの C D 3 7 染色強度または染色均一性スコアを決定するステップと；

c . ステップ ( b ) において決定した前記 C D 3 7 染色強度または染色均一性スコアを、少なくとも 1 つの参照サンプルにおいて C D 3 7 タンパク質発現を測定することによって決定した相対値と比較するステップと

を含み、前記少なくとも 1 つの参照サンプルが、抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性がない組織、細胞もしくは細胞ペレットサンプルであり、前記相対値より高い、ステップ ( b ) において決定した前記がん性サンプルの C D 3 7 染色強度スコアが、前記がんが、前記治療活性剤による処置に感受性があることを示す、方法。

【請求項 4 5】

C D 3 7 発現のレベルを、がんが、抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性があると同定するための指標とする方法であって、

a . 請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または請求項 3 4 に記載の組成物を使用して前記がん由来がん性サンプル中の C D 3 7 発現のレベルを検出するステップであって、前記検出が、1 つまたは複数の参照サンプルにおける染色強度または染色均一性と比較して C D 3 7 発現がん性サンプルにおける染色強度または染色均一性を区別する方法の使用を含むステップと；

b . 前記がん性サンプルの C D 3 7 染色強度または染色均一性スコアを決定するステップと；

c . ステップ ( b ) において決定した前記 C D 3 7 染色強度または染色均一性スコアを、少なくとも 1 つの参照サンプルにおいて C D 3 7 タンパク質発現を測定することによって決定した相対値と比較するステップと

を含み、前記少なくとも 1 つの参照サンプルが、抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性がある組織、細胞もしくは細胞ペレットサンプルであり、前記相対値より大きいまたは等しい、ステップ ( b ) において決定した前記がん性サンプルの C D 3 7 染色強度スコアが、前記がんが、記治療活性剤による処置に感受性があることを示す、方法。

【請求項 4 6】

前記がん性サンプルまたは生体サンプルを得た前記対象に抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤が投与される、請求項 4 2、4 4 および 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 7】

前記患者の C D 3 7 レベルが、前記患者から得たがん性サンプルまたは生体サンプルにおいて検出される、請求項 4 2 および 4 4 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 8】

前記がん性サンプルまたは生体サンプルが、体液抽出物、血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液または脾臓調製物である、請求項 4 2 および 4 4 から 4 7 のいずれかに記載の方法。

【請求項 4 9】

前記検出するステップが、免疫組織化学 ( I H C ) による、請求項 4 2 および 4 4 から

10

20

30

40

50

4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記 I H C が、C D 3 7 発現の異なるレベルを区別することができる較正された I H C である、請求項 4 0 または 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記 I H C によって、低 C D 3 7 発現、中 C D 3 7 発現または高 C D 3 7 発現を有するサンプルについての染色強度の範囲が得られる、請求項 4 0、4 9 および 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 2】

前記 I H C が、参照サンプルと比較して C D 3 7 発現がん性サンプルまたは生体サンプルにおける染色強度および染色均一性を区別する、請求項 4 0 および 4 9 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

10

【請求項 5 3】

前記 I H C が、手作業で実施される、請求項 4 0 および 4 9 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記 I H C が、自動システムを使用して実施される、請求項 4 0 および 4 9 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 5】

C D 3 7 スコアが、前記 I H C から決定される、請求項 4 0 および 4 9 から 5 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 5 6】

前記検出するステップが、酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) による、請求項 4 2 および 4 4 から 4 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 7】

前記参照サンプルが、陽性参照サンプルまたは陰性参照サンプルである、請求項 4 2、4 4 および 4 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5 8】

前記参照サンプルが、細胞、細胞ペレットまたは組織を含む、請求項 4 2 および 4 4 から 4 6 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 5 9】

請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片が、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素、放射性標識、アビジン / ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁気粒子からなる群から選択される検出試薬をさらに含む、請求項 4 2 および 4 4 から 5 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 0】

前記検出試薬が、酵素である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

前記がんが、C D 3 7 陽性がんである、請求項 4 2 および 4 4 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 6 2】

前記がんが、白血病またはリンパ腫である、請求項 4 2 および 4 4 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 3】

前記がんが、B 細胞リンパ腫、N H L、前駆体 B 細胞リンパ芽球性白血病 / リンパ腫、および成熟 B 細胞新生物、B 細胞慢性リンパ球性白血病 ( C L L ) / 小リンパ球性リンパ腫 ( S L L )、B 細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫 ( M C L )、濾胞性リンパ腫 ( F L )、低悪性度、中悪性度および高悪性度 ( F L )、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯 B 細胞リンパ腫、M A L T 型辺縁帯 B 細胞リンパ腫、節性辺縁帯 B 細胞リンパ腫、脾型辺縁帯 B 細胞リンパ腫、毛様細胞性白血病、びまん性大

50

細胞型 B 細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髄腫、移植後リンパ増殖性疾患、ワルデンストレームマクログロブリン血症ならびに未分化大細胞リンパ腫 (ALCL) からなる群から選択される、請求項 4 2 および 4 4 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 6 4】

前記 CD 3 7 発現が、少なくとも 1 つの追加の抗 CD 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を使用して検出される、請求項 3 5 から 4 0、4 2 および 4 4 から 6 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6 5】

前記 CD 3 7 発現が、2 つの抗 CD 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を使用して測定される、請求項 6 4 に記載の方法。

10

【請求項 6 6】

前記少なくとも 1 つの追加の抗体またはその抗原結合性断片が、検出薬剤を含む、請求項 6 4 または 6 5 に記載の方法。

【請求項 6 7】

前記検出薬剤が、発色性検出薬剤、発蛍光性検出薬剤、酵素的検出薬剤または電気化学発光検出薬剤である、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

前記検出薬剤が、ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) である、請求項 6 6 または 6 7 に記載の方法。

20

【請求項 6 9】

前記少なくとも 1 つの追加の抗体またはその抗原結合性断片が、固体支持体に結合している、請求項 6 5 から 6 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7 0】

前記少なくとも 1 つの追加の抗体またはその抗原結合性断片が、マイクロタイタープレートに結合している、請求項 6 9 に記載の方法。

【請求項 7 1】

前記 ELISA が、サンドイッチ ELISA である、請求項 3 9 または 5 6 に記載の方法。

【請求項 7 2】

前記治療活性剤が、CD 3 7 抗体 h u CD 3 7 - 3 を含む、請求項 4 2 および 4 4 から 7 1 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 7 3】

前記治療活性剤が、CD 3 7 抗体 h u CD 3 7 - 3、マイタンシノイド DM 1 および切断不能な SMCC リンカー (IMG N 5 2 9) を含む抗体マイタンシノイドコンジュゲートである、請求項 7 2 に記載の方法。

【請求項 7 4】

診断に使用するための、請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または請求項 3 4 に記載の組成物および治療に使用するための抗 CD 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を含む組合せ診断および医薬品キット。

40

【請求項 7 5】

前記検出抗体が、IHC によって CD 3 7 発現を検出することができる、請求項 7 4 に記載の組合せ診断および医薬品キット。

【請求項 7 6】

前記検出抗体が、ELISA によって CD 3 7 発現を検出することができる、請求項 7 4 または 7 5 に記載の組合せ診断および医薬品キット。

【請求項 7 7】

前記治療活性剤中の前記抗 CD 3 7 抗体が、細胞毒素にコンジュゲートされている、請求項 7 4 から 7 6 のいずれか一項に記載の組合せ診断および医薬品キット。

【請求項 7 8】

50

請求項 1 から 3 0 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片、IHC用の試薬および 1 つまたは複数の標準化された参照サンプルを含む診断キットであって、前記標準化された参照サンプルが、細胞、細胞ペレットまたはホルマリン固定したパラフィン包埋組織サンプルを含み、前記 1 つまたは複数の標準化され参照されたサンプルが、CD 3 7 を発現しない、低 CD 3 7 発現、または高 CD 3 7 発現細胞、細胞ペレットまたは組織由来である、診断キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本出願は、2015年8月28日に提出された米国仮出願第62/211,455号および2015年8月31日に提出された米国仮出願第62/212,183号の優先権の利益を請求し、それぞれ、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

本発明の分野

本発明の分野は、一般に、CD 3 7 に基づく治療法のための診断アッセイおよびキットならびにヒト CD 3 7 に結合する抗体に関する。

【背景技術】

【0002】

がんは、先進国世界における主要な死亡原因の1つであり、米国だけで1年に1000000人よりも多くの人々ががんと診断され、500,000人が死亡する。全体として、3人に1人よりも多くが、その生涯の間に何らかの形態のがんを発症することになると推定される。

【0003】

GP52-40とも呼ばれる、白血球抗原CD 3 7 (「CD 3 7」)、テトラスパニン-26またはTSPAN26は、テトラスパニンスーパーファミリーの膜貫通タンパク質である (Maeckerら、1997年、FASEB J.、11巻:428~442頁)。それは、プレBから末梢成熟B細胞期の際にB細胞において発現されるが、形質細胞への最終分化においては存在しない、4つの膜貫通ドメインを有する高度にグリコシル化されたタンパク質である。(Linkら、1987年、J Pathol.、152巻:12~21頁)。CD 3 7 抗原は、T細胞、骨髄細胞および顆粒球においてわずかしが発現されない (Schwartz-Albiezら、1988年、J. Immunol.、140巻(3号)905~914頁)。しかしながら、CD 3 7 は、非ホジキンリンパ腫 (NHL) および慢性リンパ性白血病 (CLL) を起こす悪性B細胞などにおいても発現される (Mooreら、1986年、J Immunol.、137巻(9号):3013~8頁)。この発現プロファイルは、CD 3 7 が、CD 3 7 を発現するB細胞悪性腫瘍に対する有望な治療標的となることを示唆している。しかし、これらの治療法を最大限有効にするには、感度および特異性をもって、あるダイナミックレンジのCD 3 7 を検出できることが必要である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0004】

【非特許文献1】Maeckerら、1997年、FASEB J.、11巻:428~442頁 40

【非特許文献2】Linkら、1987年、J Pathol.、152巻:12~21頁

【非特許文献3】Schwartz-Albiezら、1988年、J. Immunol.、140巻(3号)905~914頁

【非特許文献4】Mooreら、1986年、J Immunol.、137巻(9号):3013~8頁

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

抗CD 3 7 抗体およびその抗原結合性断片、ならびにCD 3 7 を検出し、CD 3 7 によって媒介される疾患および障害 (例えばがん) を診断し、抗CD 3 7 治療の有効性をモニ



ターし、患者を層別化するための方法が、全て本明細書に提供される。抗CD37抗体およびその抗原結合性断片は、それらが、より特異的かつはっきりとした染色および核バックグラウンドがない染色を可能にするという点で特に有利である。CD37抗体およびその抗原結合性断片は、CD37のアミノ酸110～137の1つまたは複数を含むエピートープに結合することができる。CD37抗体およびその抗原結合性断片は、CD37のアミノ酸107～242(配列番号20)を含むポリペプチドおよび/またはCD37のアミノ酸107～235(配列番号19)を含むポリペプチドに結合することもできるが、CD37のアミノ酸138～235からなるポリペプチドに結合しない。

【0006】

一実施形態では、本明細書に提供される抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号9のポリペプチドおよび配列番号10のポリペプチドを含む抗体と同じCD37エピートープに特異的に結合する。

10

【0007】

別の実施形態では、本明細書に提供される抗体またはその抗原結合性断片は、CD37に特異的に結合し、配列番号9のポリペプチドおよび配列番号10のポリペプチドを含む抗体のCD37に対する結合を競合的に阻害する。

【0008】

別の実施形態では、本明細書に提供される抗体またはその抗原結合性断片は、それぞれ配列番号3～5の重鎖可変領域CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびにそれぞれ配列番号6～8の軽鎖可変領域CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む。

20

【0009】

別の実施形態では、本明細書に提供される抗体またはその抗原結合性断片は、CD37に特異的に結合し、抗体またはその断片は、それぞれ配列番号3～5の重鎖可変領域CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびに配列番号6～8の軽鎖可変領域CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む。

【0010】

別の実施形態では、本明細書に提供される抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号9および10のポリペプチド配列と少なくとも90%同一であるポリペプチド配列を含む。別の実施形態では、ポリペプチド配列は、配列番号9および10のポリペプチド配列と少なくとも95%同一である。別の実施形態では、ポリペプチド配列は、配列番号9および10のポリペプチド配列と少なくとも99%同一である。別の実施形態では、ポリペプチド配列は、配列番号9および10の配列のアミノ酸を含む。

30

【0011】

別の態様において、本明細書に提供される抗体またはその抗原結合性断片は、CD37に特異的に結合し、抗体またはその断片は、配列番号9を含む重鎖可変領域を含む。

【0012】

別の態様において、本明細書に提供される抗体またはその抗原結合性断片は、CD37に特異的に結合し、抗体またはその断片は、配列番号10を含む重鎖可変領域を含む。

【0013】

別の実施形態では、本明細書に提供される抗体またはその抗原結合性断片は、組換えにより作製される。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、マウス、非ヒト、ヒト化、キメラ、またはヒトのものである。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、表面再構成される。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、全長抗体である。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、抗原結合性断片である。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、一本鎖FvもしくはscFv、ジスルフィド連結されたFv、V-NARドメイン、IgNar、細胞内抗体、IgG<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>、ミニボディ、F(ab')<sub>3</sub>、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、単ドメイン抗体、DVD-Ig、Fcab、mAb<sub>2</sub>、(scFv)<sub>2</sub>またはscFv-Fcを含む。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、一本鎖Fvもしくはは

40

50

s c F v、ジスルフィド連結されたF v、細胞内抗体、I g G C H 2、ミニボディ、F ( a b ' ) 3、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、D V D - I g、m A b 2、( s c F v ) 2またはs c F v - F cを含む。

【 0 0 1 4 】

別の実施形態では、抗体または抗原結合性断片は、細胞によって作製される。別の実施形態では、細胞は単離される。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片を作製する方法であって、( a ) 細胞を培養するステップと；( b ) 培養細胞から抗体またはその抗原結合性断片を単離するステップとを含む方法が本明細書に提供される。

【 0 0 1 5 】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約 0 . 5 ~ 約 1 0 n M の K d でヒト C D 3 7 に結合する。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約 1 . 0 n M またはより良い K d でヒト C D 3 7 に結合する。

【 0 0 1 6 】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、C D 3 7 のアミノ酸 1 0 7 ~ 2 4 2 ( 配列番号 2 0 ) を含む、それから本質的になるまたはそれからなるポリペプチドに結合する。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、C D 3 7 のアミノ酸 1 0 7 ~ 2 3 5 ( 配列番号 1 9 ) を含む、それから本質的になるまたはそれからなるポリペプチドに結合する。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 5 に示す配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 6 に示す配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 7 に示す配列に結合する。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、C D 3 7 のアミノ酸 1 0 7 ~ 2 4 2 ( 配列番号 2 0 ) を含むポリペプチドに結合するが、C D 3 7 のアミノ酸 1 3 8 ~ 2 3 5 からなるポリペプチドに結合しない。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、C D 3 7 のアミノ酸 1 0 7 ~ 2 3 5 ( 配列番号 1 9 ) を含むポリペプチドに結合するが、C D 3 7 のアミノ酸 1 3 8 ~ 2 3 5 からなるポリペプチドに結合しない。

【 0 0 1 7 】

別の実施形態では、本明細書に提供される抗体または抗原結合性断片は、配列番号 1 5 のポリペプチドに結合するが、配列番号 1 8 のポリペプチドに結合しない。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 6 のポリペプチドに結合するが、配列番号 1 8 のポリペプチドに結合しない。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、配列番号 1 7 のポリペプチドに結合するが、配列番号 1 8 のポリペプチドに結合しない。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、C D 3 7 のアミノ酸 1 1 0 ~ 1 3 7 中の少なくとも 1 つのアミノ酸に結合する。

【 0 0 1 8 】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片の結合親和性は、フローサイトメトリー、B i a c o r e、E L I S A またはラジオイムノアッセイによって測定される。

【 0 0 1 9 】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、検出可能に標識されている。別の実施形態では、標識は、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素標識、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁気粒子からなる群から選択される。

【 0 0 2 0 】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片ならびに I H C 緩衝液、E L I S A 緩衝液および F A C S 緩衝液からなる群から選択される緩衝液を含む組成物が本明細書に提供される。

【 0 0 2 1 】

別の実施形態では、サンプルを本明細書に提供される抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物と接触させるステップを含む、サンプル中の C D 3 7 発現を検出する方法が本明細書に提供される。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、検出可能

10

20

30

40

50

に標識されている。別の実施形態では、標識は、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素標識、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁気粒子からなる群から選択される。別の実施形態では、標識は、酵素標識である。

【 0 0 2 2 】

別の実施形態では、C D 3 7 発現は、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、細胞数測定、免疫蛍光アッセイ、酵素イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、化学発光アッセイまたは免疫組織化学アッセイによって決定される。別の実施形態では、C D 3 7 発現は、免疫組織化学アッセイによって決定される。

【 0 0 2 3 】

別の実施形態では、抗C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤によるがん治療の有効性を増大させるための方法であって、前記方法が、がんを有する対象に治療活性剤を投与するステップを含み、対象由来のがん性サンプルにおいてC D 3 7 の発現の増大が、本明細書に提供される抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物を使用して検出されている、方法が本明細書に提供される。

10

【 0 0 2 4 】

別の実施形態では、抗C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤に応答する可能性が高いがんを同定するための方法であって、( a ) がん由来細胞を含む生体サンプルを抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物と接触させるステップと；( b ) ( a ) の生体サンプルにおける、C D 3 7 に対する抗体またはその抗原結合性断片の結合を検出するステップと；( c ) ステップ( b ) の結合にスコアを割り当てるステップであって、スコアが1つまたは複数の参照サンプルとの比較に基づいて割り当てられる、ステップと；( d ) ステップ( c ) におけるスコアを参照組織または細胞のスコアと比較するステップであって、正常もしくは低C D 3 7 発現参照サンプルのスコアより大きいがんC D 3 7 レベルのスコアまたは高C D 3 7 発現参照サンプルのスコアと等しいもしくはより大きいがんC D 3 7 レベルのスコアが、がんを抗C D 3 7 抗体に応答する可能性が高いと同定する、ステップとを含む方法が本明細書に提供される。

20

【 0 0 2 5 】

別の実施形態では、がんを有する患者を処置する方法であって、( a ) 患者から得たがん性サンプル中のC D 3 7 発現の検出からC D 3 7 発現スコアを決定するステップであって、検出が、抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物を使用して実施される、ステップと；( b ) スコアが、患者が、治療活性剤の投与から利益を得ることになることを示す場合に、患者に抗C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を投与するステップとを含む方法が本明細書に提供される。

30

【 0 0 2 6 】

別の実施形態では、がんを有する患者を処置する方法は、( a ) 患者から得たがん性サンプル中のC D 3 7 発現の検出からC D 3 7 発現スコアを決定するステップであって、検出が、抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物を使用して実施される、ステップと；( b ) スコアが、患者が、治療活性剤の投与から利益を得ることになることを示す場合に、患者に抗C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を投与するように保健医療提供者に指示するステップとを含む。

40

【 0 0 2 7 】

別の実施形態では、がんを有する患者を処置する方法は、( a ) がんを有する患者から採取したがん性サンプルを提出して、抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物を使用するC D 3 7 発現の検出からC D 3 7 発現スコアを決定するステップと；( b ) スコアが、患者が、治療活性剤の投与から利益を得ることになることを示す場合に、患者に抗C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を投与するステップとを含む。

【 0 0 2 8 】

別の実施形態では、がんを有する患者を処置する方法は、( a ) 患者から得たがん性サンプル中のC D 3 7 発現を検出するステップであって、検出が、抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物を使用して実施される、ステップと；( b ) がん性サンプルのC D

50

37発現スコアを決定するステップと；(c)スコアが、患者が、治療活性剤の投与から利益を得ることになることを示す場合に、患者に抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を投与するステップとを含む。

【0029】

別の実施形態では、がんを抗CD37活性がある薬剤による処置に感受性があると同定する方法は、(a)抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物を使用してがん由来がん性サンプル中のCD37発現のレベルを検出するステップであって、検出が、1つまたは複数の参照サンプルにおける染色強度または染色均一性と比較してCD37発現がん性サンプルにおける染色強度または染色均一性を区別する方法の使用を含むステップと；(b)がん性サンプルのCD37染色強度または染色均一性スコアを決定するステップと；(c)ステップ(b)において決定したCD37染色強度または染色均一性スコアを、少なくとも1つの参照サンプルにおいてCD37タンパク質発現を測定することによって決定した相対値と比較するステップであって、少なくとも1つの参照サンプルが、抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性がない組織、細胞もしくは細胞ペレットサンプルであり、相対値より高い、ステップ(b)において決定したがん性サンプルのCD37染色強度スコアが、がんを治療活性剤による処置に感受性があると同定する、ステップとを含む。

10

【0030】

別の実施形態では、がんを抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性があると同定する方法は、(a)抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物を使用してがん由来がん性サンプル中のCD37発現のレベルを検出するステップであって、検出が、1つまたは複数の参照サンプルにおける染色強度または染色均一性と比較してCD37発現がん性サンプルにおける染色強度または染色均一性を区別する方法の使用を含むステップと；(b)がん性サンプルのCD37染色強度または染色均一性スコアを決定するステップと；(c)ステップ(b)において決定したCD37染色強度または染色均一性スコアを、少なくとも1つの参照サンプルにおいてCD37タンパク質発現を測定することによって決定した相対値と比較するステップであって、少なくとも1つの参照サンプルが、抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性がある組織、細胞もしくは細胞ペレットサンプルであり、相対値より大きいまたは等しい、ステップ(b)において決定したがん性サンプルのCD37染色強度スコアが、がんを治療活性剤による処置に感受性があると同定する、ステップとを含む。

20

30

【0031】

別の実施形態では、方法は、がん性サンプルまたは生体サンプルを得た対象に抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を投与するステップをさらに含む。別の実施形態では、患者のCD37レベルは、患者から得たがん性サンプルまたは生体サンプルにおいて検出される。別の実施形態では、がん性サンプルまたは生体サンプルは、体液抽出物、血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液または脾臓調製物である。別の実施形態では、検出するステップは、免疫組織化学(IHC)による。別の実施形態では、IHCは、CD37発現の異なるレベルを区別することができる較正されたIHCである。別の実施形態では、IHCによって、低CD37発現、中CD37発現または高CD37発現を有するサンプルについての染色強度の範囲が得られる。別の実施形態では、IHCは、参照サンプルと比較してCD37発現がん性サンプルまたは生体サンプルにおける染色強度および染色均一性を区別する。別の実施形態では、IHCは、手作業で実施される。別の実施形態では、IHCは、自動システムを使用して実施される。別の実施形態では、CD37スコアは、IHCから決定される。別の実施形態では、検出するステップは、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)による。別の実施形態では、参照サンプルは、陽性参照サンプルまたは陰性参照サンプルである。別の実施形態では、参照サンプルは、細胞、細胞ペレットまたは組織を含む。

40

【0032】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、免疫蛍光標識、化学発光標識、

50

リン光標識、酵素、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁気粒子からなる群から選択される検出試薬をさらに含む。別の実施形態では、検出試薬は、酵素である。

【0033】

別の実施形態では、がんは、CD37陽性がんである。別の実施形態では、がんは、白血球またはリンパ腫である。別の実施形態では、がんは、B細胞リンパ腫、NHL、前駆体B細胞リンパ芽球性白血病/リンパ腫、および成熟B細胞新生物、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細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マンテル細胞リンパ腫(MCL)、濾胞性リンパ腫(FL)、低悪性度、中悪性度および高悪性度(FL)、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、MALT型辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾型辺縁帯B細胞リンパ腫、毛様細胞性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、パーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髄腫、移植後リンパ増殖性疾患、ワルデンストレームマクログロブリン血症ならびに未分化大細胞リンパ腫(ALCL)からなる群から選択される。別の実施形態では、CD37陽性がんは、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫またはマンテル細胞リンパ腫である。

10

【0034】

別の実施形態では、CD37発現は、少なくとも1つの追加の抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を使用して検出される。別の実施形態では、CD37発現は、2つの抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を使用して測定される。別の実施形態では、少なくとも1つの追加の抗体またはその抗原結合性断片は、検出薬剤を含む。別の実施形態では、検出薬剤は、発色性検出薬剤、発蛍光性検出薬剤、酵素的検出薬剤または電気化学発光検出薬剤である。別の実施形態では、検出薬剤は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)である。

20

【0035】

別の実施形態では、少なくとも1つの追加の抗体またはその抗原結合性断片は、固体支持体に結合している。別の実施形態では、少なくとも1つの追加の抗体またはその抗原結合性断片は、マイクロタイタープレートに結合している。

【0036】

別の実施形態では、ELISAは、サンドイッチELISAである。

30

【0037】

別の実施形態では、治療活性剤は、CD37抗体huCD37-3を含む。別の実施形態では、治療活性剤は、CD37抗体huCD37-3、マイタンシノイドDM1および切断不能なSMCCリンカー(IMG529)を含む抗体マイタンシノイドコンジュゲートである。

【0038】

別の実施形態では、キットは、診断に使用するための、本明細書に提供される抗体もしくはその抗原結合性断片または組成物および治療に使用するための抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を含む組合せ診断および医薬品キットが本明細書に提供される。

40

【0039】

別の実施形態では、検出抗体は、IHCによってCD37発現を検出することができる。別の実施形態では、検出抗体は、ELISAによってCD37発現を検出することができる。

【0040】

別の実施形態では、治療活性剤中の抗CD37抗体は、細胞毒素にコンジュゲートされている。

【0041】

別の実施形態では、本明細書に提供される診断キットは、本明細書に提供される抗体、その抗原結合性断片、IHC用の試薬および1つまたは複数の標準化された参照サンプル

50

を含み、標準化された参照サンプルは、細胞、細胞ペレットまたはホルマリン固定したパラフィン包埋組織サンプルを含み、1つまたは複数の標準化され参照されたサンプルは、CD37を発現しない、低CD37発現、または高CD37発現細胞、細胞ペレットまたは組織由来である。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

配列番号9のポリペプチドおよび配列番号10のポリペプチドを含む抗体と同じCD37エピトープに特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

(項目2)

配列番号9のポリペプチドおよび配列番号10のポリペプチドを含む抗体のCD37に対する結合を競合的に阻害する、CD37に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

10

(項目3)

それぞれ配列番号3~5の重鎖可変領域(VH)CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびにそれぞれ配列番号6~8の軽鎖可変領域(VL)CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、項目1または2に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目4)

それぞれ配列番号3~5のVH CDR1、CDR2およびCDR3配列ならびに配列番号6~8のVL CDR1、CDR2およびCDR3配列を含む、CD37に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

20

(項目5)

配列番号9および10のポリペプチド配列と少なくとも90%同一であるポリペプチド配列を含む、項目1から4のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目6)

前記ポリペプチド配列が、配列番号9および10のポリペプチド配列と少なくとも95%同一である、項目5に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目7)

前記ポリペプチド配列が、配列番号9および10のポリペプチド配列と少なくとも99%同一である、項目6に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目8)

配列番号9および10の配列のアミノ酸を含むポリペプチド配列を含む、項目7に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

30

(項目9)

配列番号9を含む重鎖可変領域を含む、CD37に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

(項目10)

配列番号10を含む重鎖可変領域を含む、CD37に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片。

(項目11)

前記抗体が、組換えにより作製される、項目1から10のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

40

(項目12)

マウス、非ヒト、ヒト化、キメラ、またはヒトのものである、項目1から11のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目13)

前記ヒト化抗体が、表面再構成されたものである、項目12に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目14)

全長抗体である、項目1から13のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目15)

50

抗原結合性断片である、項目 1 から 13 のいずれかに記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 16)

F a b、F a b'、F ( a b' ) 2、F d、一本鎖 F v もしくは s c F v、ジスルフィド連結された F v、V - N A R ドメイン、I g N a r、細胞内抗体、I g G C H 2、ミニボディ、F ( a b' ) 3、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、単ドメイン抗体、D V D - I g、F c a b、m A b 2、( s c F v ) 2 または s c F v - F c を含む、項目 15 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 17)

F a b、F a b'、F ( a b' ) 2、一本鎖 F v もしくは s c F v、ジスルフィド連結された F v、細胞内抗体、I g G C H 2、ミニボディ、F ( a b' ) 3、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、D V D - I g、m A b 2、( s c F v ) 2 または s c F v - F c を含む、項目 15 に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

(項目 18)

約 0.5 ~ 約 10 n M の K d でヒト C D 37 に結合する、項目 1 から 17 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 19)

約 1.0 n M またはより良い K d でヒト C D 37 に結合する、項目 1 から 17 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 20)

C D 37 のアミノ酸 107 ~ 242 ( 配列番号 20 ) を含むポリペプチドに結合する、項目 2 から 19 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

20

(項目 21)

C D 37 のアミノ酸 107 ~ 235 ( 配列番号 19 ) を含むポリペプチドに結合する、項目 2 から 20 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 22)

配列番号 15 に示す配列に結合する、項目 2 から 21 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 23)

配列番号 16 に示す配列に結合する、項目 2 から 22 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

30

(項目 24)

配列番号 17 に示す配列に結合する、項目 2 から 23 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 25)

C D 37 のアミノ酸 107 ~ 242 ( 配列番号 20 ) を含むポリペプチドに結合するが、C D 37 のアミノ酸 138 ~ 235 からなるポリペプチドに結合しない、項目 2 から 24 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 26)

C D 37 のアミノ酸 107 ~ 235 ( 配列番号 19 ) を含むポリペプチドに結合するが、C D 37 のアミノ酸 138 ~ 235 からなるポリペプチドに結合しない、項目 2 から 25 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

40

(項目 27)

配列番号 15 のポリペプチドに結合するが、配列番号 18 のポリペプチドに結合しない、項目 2 から 26 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 28)

配列番号 16 のポリペプチドに結合するが、配列番号 18 のポリペプチドに結合しない、項目 2 から 27 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 29)

配列番号 17 のポリペプチドに結合するが、配列番号 18 のポリペプチドに結合しない

50

、項目 2 から 2 8 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 3 0)

C D 3 7 のアミノ酸 1 1 0 ~ 1 3 7 中の少なくとも 1 つのアミノ酸に結合する、項目 2 から 2 9 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 3 1)

結合親和性が、フローサイトメトリー、B i a c o r e、E L I S A またはラジオイムノアッセイによって測定される、項目 1 8 から 3 0 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 3 2)

検出可能に標識されている、項目 1 から 3 1 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片。

10

(項目 3 3)

項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を産生する細胞。

(項目 3 4)

単離されている、項目 3 3 に記載の細胞。

(項目 3 5)

項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片を作製する方法であって、( a ) 項目 3 3 または 3 4 に記載の細胞を培養するステップと；( b ) 前記培養細胞から前記抗体またはその抗原結合性断片を単離するステップとを含む方法。

20

(項目 3 6)

項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片ならびに I H C 緩衝液、E L I S A 緩衝液および F A C S 緩衝液からなる群から選択される緩衝液を含む組成物。

(項目 3 7)

サンプル中の C D 3 7 発現を検出する方法であって、前記サンプルを項目 1 から 3 2 のいずれかに記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6 に記載の組成物と接触させるステップを含む、方法。

(項目 3 8)

前記抗体またはその抗原結合性断片が、検出可能に標識されている、項目 3 7 に記載の方法。

30

(項目 3 9)

前記標識が、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素標識、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁気粒子からなる群から選択される、項目 3 8 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記標識が、酵素標識である、項目 3 9 に記載の方法。

(項目 4 1)

C D 3 7 発現が、ラジオイムノアッセイ、ウェスタンブロットアッセイ、細胞数測定、免疫蛍光アッセイ、酵素イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、化学発光アッセイまたは免疫組織化学アッセイによって決定される、項目 3 7 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

40

(項目 4 2)

C D 3 7 発現が、免疫組織化学 ( I H C ) アッセイによって決定される、項目 4 1 に記載の方法。

(項目 4 3)

抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤によるがん治療の有効性を増大させるための方法であって、前記方法が、がんを有する対象に前記治療活性剤を投与するステップを含み、前記対象由来のがん性サンプルにおいて C D 3 7 の発現の増大が、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6

50



に記載の組成物を使用して検出されている、方法。

(項目 4 4)

抗 CD 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤に応答する可能性が高いがんを同定するための方法であって、

a . 前記がん由来細胞を含む生体サンプルを項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6 に記載の組成物と接触させるステップと ;

b . ( a ) の前記生体サンプルにおける、CD 3 7 に対する前記抗体またはその抗原結合性断片の結合を検出するステップと ;

c . ステップ ( b ) の前記結合にスコアを割り当てるステップであって、前記スコアが 1 つまたは複数の参照サンプルとの比較に基づいて割り当てられる、ステップと ;

d . ステップ ( c ) における前記スコアを参照組織または細胞のスコアと比較するステップであって、正常もしくは低 CD 3 7 発現参照サンプルのスコアより大きい前記がん CD 3 7 レベルのスコアまたは高 CD 3 7 発現参照サンプルのスコアと等しいもしくはより大きい前記がん CD 3 7 レベルのスコアが、前記がんを抗 CD 3 7 抗体に応答する可能性が高いと同定する、ステップと

を含む方法。

(項目 4 5)

がんを有する患者を処置する方法であって、

a . 前記患者から得たがん性サンプル中の CD 3 7 発現の検出から CD 3 7 発現スコアを決定するステップであって、前記検出が、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6 に記載の組成物を使用して実施される、ステップと ;

b . 前記スコアが、前記患者が、治療活性剤の投与から利益を得ることになることを示す場合に、前記患者に抗 CD 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む前記治療活性剤を投与するステップと

を含む方法。

(項目 4 6)

がんを有する患者を処置する方法であって、

a . 前記患者から得たがん性サンプル中の CD 3 7 発現の検出から CD 3 7 発現スコアを決定するステップであって、前記検出が、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6 に記載の組成物を使用して実施される、ステップと ;

b . 前記スコアが、前記患者が、治療活性剤の投与から利益を得ることになることを示す場合に、前記患者に抗 CD 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む前記治療活性剤を投与するように保健医療提供者に指示するステップと

を含む方法。

(項目 4 7)

がんを有する患者を処置する方法であって、

a . がんを有する患者から採取したがん性サンプルを提出して、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6 に記載の組成物を使用する CD 3 7 発現の検出から CD 3 7 発現スコアを決定するステップと ;

b . 前記スコアが、前記患者が、治療活性剤の投与から利益を得ることになることを示す場合に、前記患者に抗 CD 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む前記治療活性剤を投与するステップと

を含む方法。

(項目 4 8)

がんを有する患者を処置する方法であって、

a . 前記患者から得たがん性サンプル中の CD 3 7 発現を検出するステップであって、前記検出が、項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6 に記載の組成物を使用して実施される、ステップと ;

を含む方法。

10

20

30

40

50

b . 前記がん性サンプルの C D 3 7 発現スコアを決定するステップと ;

c . 前記スコアが、前記患者が、治療活性剤の投与から利益を得ることになることを示す場合に、前記患者に抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む前記治療活性剤を投与するステップと

を含む方法。

( 項目 4 9 )

がんを抗 C D 3 7 活性がある薬剤による処置に感受性があると同定する方法であって、

a . 項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6 に記載の組成物を使用して前記がん由来がん性サンプル中の C D 3 7 発現のレベルを検出するステップであって、前記検出が、1つまたは複数の参照サンプルにおける染色強度または染色均一性と比較して C D 3 7 発現がん性サンプルにおける染色強度または染色均一性を区別する方法の使用を含むステップと ;

b . 前記がん性サンプルの C D 3 7 染色強度または染色均一性スコアを決定するステップと ;

c . ステップ ( b ) において決定した前記 C D 3 7 染色強度または染色均一性スコアを、少なくとも1つの参照サンプルにおいて C D 3 7 タンパク質発現を測定することによって決定した相対値と比較するステップであって、前記少なくとも1つの参照サンプルが、抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性がない組織、細胞もしくは細胞ペレットサンプルであり、前記相対値より高い、ステップ ( b ) において決定した前記がん性サンプルの C D 3 7 染色強度スコアが、前記がんを前記治療活性剤による処置に感受性があると同定する、ステップと

を含む方法。

( 項目 5 0 )

がんを抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性があると同定する方法であって、

a . 項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目 3 6 に記載の組成物を使用して前記がん由来がん性サンプル中の C D 3 7 発現のレベルを検出するステップであって、前記検出が、1つまたは複数の参照サンプルにおける染色強度または染色均一性と比較して C D 3 7 発現がん性サンプルにおける染色強度または染色均一性を区別する方法の使用を含むステップと ;

b . 前記がん性サンプルの C D 3 7 染色強度または染色均一性スコアを決定するステップと ;

c . ステップ ( b ) において決定した前記 C D 3 7 染色強度または染色均一性スコアを、少なくとも1つの参照サンプルにおいて C D 3 7 タンパク質発現を測定することによって決定した相対値と比較するステップであって、前記少なくとも1つの参照サンプルが、抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤による処置に感受性がある組織、細胞もしくは細胞ペレットサンプルであり、前記相対値より大きいまたは等しい、ステップ ( b ) において決定した前記がん性サンプルの C D 3 7 染色強度スコアが、前記がんを前記治療活性剤による処置に感受性があると同定する、ステップと

を含む方法。

( 項目 5 1 )

前記がん性サンプルまたは生体サンプルを得た前記対象に抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を投与するステップをさらに含む、項目 4 3 から 5 0 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 2 )

前記患者の C D 3 7 レベルが、前記患者から得たがん性サンプルまたは生体サンプルにおいて検出される、項目 4 3 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

( 項目 5 3 )

前記がん性サンプルまたは生体サンプルが、体液抽出物、血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液または脾臓調製物である、項目 4 3 から 5 2 のいずれかに記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目54)

前記検出するステップが、免疫組織化学（IHC）による、項目44から53のいずれか一項に記載の方法。

(項目55)

前記IHCが、CD37発現の異なるレベルを区別することができる校正されたIHCである、項目42または54に記載の方法。

(項目56)

前記IHCによって、低CD37発現、中CD37発現または高CD37発現を有するサンプルについての染色強度の範囲が得られる、項目42、54または55のいずれか一項に記載の方法。

(項目57)

前記IHCが、参照サンプルと比較してCD37発現がん性サンプルまたは生体サンプルにおける染色強度および染色均一性を区別する、項目42または54から56のいずれか一項に記載の方法。

(項目58)

前記IHCが、手作業で実施される、項目42または54から57のいずれか一項に記載の方法。

(項目59)

前記IHCが、自動システムを使用して実施される、項目42または54から57のいずれか一項に記載の方法。

(項目60)

CD37スコアが、前記IHCから決定される、項目42または54から59のいずれか一項に記載の方法。

(項目61)

前記検出するステップが、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）による、項目44から53のいずれか一項に記載の方法。

(項目62)

前記参照サンプルが、陽性参照サンプルまたは陰性参照サンプルである、項目44、49または50のいずれか一項に記載の方法。

(項目63)

前記参照サンプルが、細胞、細胞ペレットまたは組織を含む、項目44、49、50または51のいずれか一項に記載の方法。

(項目64)

項目1から32のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片が、免疫蛍光標識、化学発光標識、リン光標識、酵素、放射性標識、アビジン/ビオチン、コロイド金粒子、着色粒子および磁気粒子からなる群から選択される検出試薬をさらに含む、項目43から63のいずれか一項に記載の方法。

(項目65)

前記検出試薬が、酵素である、項目64に記載の方法。

(項目66)

前記がんが、CD37陽性がんである、項目43から65のいずれか一項に記載の方法。

(項目67)

前記がんが、白血病またはリンパ腫である、項目43から66のいずれか一項に記載の方法。

(項目68)

前記がんが、B細胞リンパ腫、NHL、前駆体B細胞リンパ芽球性白血病/リンパ腫、および成熟B細胞新生物、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細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）、濾胞性リンパ腫（FL）、低悪性度、中悪性度および高悪性度（FL

10

20

30

40

50

)、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫、MALT型辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、脾型辺縁帯B細胞リンパ腫、毛様細胞性白血病、びまん性大細胞型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、移植後リンパ増殖性疾患、ワルデンストレームマクログロブリン血症ならびに未分化大細胞リンパ腫(A L C L)からなる群から選択される、項目43から66のいずれか一項に記載の方法。

(項目69)

前記CD37発現が、少なくとも1つの追加の抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を使用して検出される、項目37から68のいずれかに記載の方法。

(項目70)

前記CD37発現が、2つの抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を使用して測定される、項目69に記載の方法。

(項目71)

前記少なくとも1つの追加の抗体またはその抗原結合性断片が、検出薬剤を含む、項目69または70のいずれか一項に記載の方法。

(項目72)

前記検出薬剤が、発色性検出薬剤、発蛍光性検出薬剤、酵素的検出薬剤または電気化学発光検出薬剤である、項目71に記載の方法。

(項目73)

前記検出薬剤が、ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)である、項目71または72に記載の方法。

(項目74)

前記少なくとも1つの追加の抗体またはその抗原結合性断片が、固体支持体に結合している、項目70から73のいずれか一項に記載の方法。

(項目75)

前記少なくとも1つの追加の抗体またはその抗原結合性断片が、マイクロタイタープレートに結合している、項目74に記載の方法。

(項目76)

前記ELISAが、サンドイッチELISAである、項目41または61に記載の方法。

(項目77)

前記治療活性剤が、CD37抗体h u C D 3 7 - 3を含む、項目43から76のいずれかに記載の方法。

(項目78)

前記治療活性剤が、CD37抗体h u C D 3 7 - 3、マイタンシノイドDM1および切断不能なSMCCリンカー(IMGN529)を含む抗体マイタンシノイドコンジュゲートである、項目77に記載の方法。

(項目79)

診断に使用するための、項目1から32のいずれか一項に記載の抗体もしくはその抗原結合性断片または項目36に記載の組成物および治療に使用するための抗CD37抗体またはその抗原結合性断片を含む治療活性剤を含む組合せ診断および医薬品キット。

(項目80)

前記検出抗体が、IHCによってCD37発現を検出することができる、項目79に記載の組合せ診断および医薬品キット。

(項目81)

前記検出抗体が、ELISAによってCD37発現を検出することができる、項目79または80に記載の組合せ診断および医薬品キット。

(項目82)

前記治療活性剤中の前記抗CD37抗体が、細胞毒素にコンジュゲートされている、項目79から81のいずれか一項に記載の組合せ診断および医薬品キット。

10

20

30

40

50

## (項目 83)

項目 1 から 3 2 のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合性断片、IHC用の試薬および1つまたは複数の標準化された参照サンプルを含む診断キットであって、前記標準化された参照サンプルが、細胞、細胞ペレットまたはホルマリン固定したパラフィン包埋組織サンプルを含み、前記1つまたは複数の標準化され参照されたサンプルが、CD37を発現しない、低CD37発現、または高CD37発現細胞、細胞ペレットまたは組織由来である、診断キット。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0042】

【図1A】図1Aおよび1Bは、Hisタグに融合したヒトCD37のアミノ酸107～242を含有するhCD37-LEL（大きな細胞外ループ）タンパク質（配列番号15）での、マウスの免疫化により作製した抗体についてのELISAスクリーニング結果を示す。図1Aは、ハイブリドーマクローン1B11からの上清は、未変性および変性条件下の両方で、CD37抗原の多数の変形、hCD37-LEL、hCD37-Fc-LAGA（LAGAは、Fc突然変異G236AおよびP238Aを指す；配列番号17；ヒトIgG1 Fcドメインに融合したヒトCD37のアミノ酸107～235を含有する）、およびhCD37-ECD-Fc（細胞外ドメイン；配列番号16；マウスIgG2a Fcドメインに融合したヒトCD37のアミノ酸107～235を含有する）に結合することを示す。図1Bは、2つのハイブリドーマサブクローン、1B11-2および1B11-20からの上清は、未変性および変性条件下の両方で、hCD37-Fc-LAGAおよびhCD37-LELに結合することを示す。

10

【図1B】図1Aおよび1Bは、Hisタグに融合したヒトCD37のアミノ酸107～242を含有するhCD37-LEL（大きな細胞外ループ）タンパク質（配列番号15）での、マウスの免疫化により作製した抗体についてのELISAスクリーニング結果を示す。図1Aは、ハイブリドーマクローン1B11からの上清は、未変性および変性条件下の両方で、CD37抗原の多数の変形、hCD37-LEL、hCD37-Fc-LAGA（LAGAは、Fc突然変異G236AおよびP238Aを指す；配列番号17；ヒトIgG1 Fcドメインに融合したヒトCD37のアミノ酸107～235を含有する）、およびhCD37-ECD-Fc（細胞外ドメイン；配列番号16；マウスIgG2a Fcドメインに融合したヒトCD37のアミノ酸107～235を含有する）に結合することを示す。図1Bは、2つのハイブリドーマサブクローン、1B11-2および1B11-20からの上清は、未変性および変性条件下の両方で、hCD37-Fc-LAGAおよびhCD37-LELに結合することを示す。

20

30

## 【0043】

【図2】図2は、抗体1B11-2は、参照抗CD37抗体、NCL-CD37（クローンCT1、Leica Biosystems）と比較して、未変性hCD37-Fc-LAGAおよびhCD37-LELタンパク質の両方に対して大いに改善された親和性で結合することを示す。

## 【0044】

【図3】図3は、抗体1B11-2は、NCL-CD37と比較して、変性hCD37-LELタンパク質に対して大いに改善された親和性で結合することを示す。

40

## 【0045】

【図4】図4は、抗体1B11-2は、短縮型hCD37-ECD-S2-Fcタンパク質（S2は、CD37の大きな細胞外ドメインの第2のセグメントを指す；アミノ酸138～176を含有する；配列番号18）に結合しないが、NCL-CD37は、このCD37タンパク質への結合を保持することを示す。

## 【0046】

【図5】図5は、NCL-CD37マウスmAb（左）またはCD37 1B11-2マウスmAb（右）のいずれかで染色した、ヒト正常扁桃の免疫組織化学画像を示す。矢印は、それぞれ、胚中心、外套帯（これらの両方がCD37陽性である）、および分子間領

50

域 (intermolecular regions) (CD37 陰性) を示す。黒色矢印は、胚中心を；灰色矢印は、外套帯を示し (これらの両方が CD37 陽性である)；ならびに白色矢印は、濾胞間領域 (CD37 について陰性である) を示す。NCL-CD37 抗体を使用すると、胚中心および外套帯 (mantel zone) の両方で核染色が存在する。1B11-2 抗体を使用すると、核染色は存在しない。

【0047】

【図6】図6は、NCL-CD37 マウスモノクローナル抗体 (mAb) (左パネル) または 1B11-2 マウス mAb (右パネル) のいずれかを使用した、ヒト正常小腸 (上部パネル) およびヒト正常膵臓 (下部パネル) の免疫組織化学画像を示す。左パネル内の矢印は、NCL-CD37 マウス mAb を使用して得られた、パネート細胞 (上部パネル、黒色矢印で示される) および膵島細胞 (下部パネル、白色矢印で示される) における細胞質の赤みを示す。右パネル内の矢印は、この染色は、1B11-2 抗体を使用すると、対応する位置で観察されないことを示す。

10

【0048】

【図7】図7は、NCL-CD37 マウス mAb (左パネル) または 1B11-2 マウス mAb (右パネル) のいずれかで染色した、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫患者組織 (上部パネル) および濾胞性リンパ腫患者組織 (下部パネル) の免疫組織化学画像を示す。1B11-2 マウス mAb を使用すると、両方のがんタイプにおいて、より強く、より簡明な染色が見える。

【0049】

【図8】図8は、1B11-2 マウスモノクローナル抗体を、市販されているマウスモノクローナル抗 CD37 抗体 (Leica) と比較した、CD37 細胞外ドメイン (ECD) 抗原への Fc 融合体の変性 SDS-PAGE ウェスタンブロットを示す。キロダルトン (kD) での分子量マーカーを、一次データとして、および右側模式図として示す。

20

【0050】

【図9】図9は、1B11-2 マウスモノクローナル抗体により検出された、CD37 細胞外ドメイン (ECD) 抗原への Fc 融合体の未変性 PAGE ウェスタンブロットを示す。

【発明を実施するための形態】

【0051】

本開示は、ヒト CD37 を検出する方法を提供する。これらの方法は、CD37 の発現によって特徴付けられるがんの同定を可能にして、抗 CD37 治療薬による処置の有効性を改善する。検出方法を使用して、患者を層別化し、治療有効性をモニターもしくは決定し、またはがんが抗 CD37 治療にตอบสนองする可能性を決定することができる。検出方法は、臨床的に意味があるダイナミックレンジの CD37 を検出することができる。CD37 検出方法 (例えば、CD37 に対する免疫組織化学 (IHC)) に有用な、抗体およびその抗原結合性断片など新規の CD37 結合性ポリペプチドも開示される。本明細書に提供される CD37 結合剤 (例えば、抗体またはその抗原結合性断片) は、より特異的かつはっきりとした核バックグラウンドがない染色を可能にする。CD37 結合剤は、CD37 のアミノ酸 110 ~ 137 の 1 つまたは複数を含むエピトープに結合する。CD37 結合剤は、CD37 のアミノ酸 107 ~ 242 (配列番号 20) を含むポリペプチドまたは CD37 のアミノ酸 107 ~ 235 (配列番号 19) を含むポリペプチドにも結合するが、CD37 のアミノ酸 138 ~ 235 からなるポリペプチドに結合しない。関連ポリペプチドおよびポリヌクレオチド、CD37 結合剤を含む組成物ならびに CD37 結合剤を作製する方法も提供される。

30

40

I. 定義

【0052】

本発明の理解を容易にするために、いくつかの用語および表現が、以下で定義される。

【0053】

特に明記しない限り、本明細書では、用語「CD37」とは、任意の天然の CD37 の

50

ことを指す。CD37は、GP52-40、白血球抗原CD37およびテトラスパニン-26とも呼ばれる。用語「CD37」は、「全長」、プロセシングされていないCD37および細胞内でのプロセシングの結果得られる任意の形態のCD37を包含する。用語は、CD37の天然に存在するバリエーション、例えば、スプライスバリエーション、対立遺伝子バリエーションおよびアイソフォームも包含する。本明細書に記述されるCD37ポリペプチドは、ヒト生体サンプルなど様々な供給源もしくは別の供給源から単離することができ、または組換えもしくは合成方法によって調製することができる。

#### 【0054】

用語、CD37の「発現の増大」または「過剰発現」とは、上昇したレベルのCD37発現を含有するサンプルのことを指す。CD37は、陰性もしくは低参照対照と比較してまたは同じ組織もしくは細胞型の健康もしくは無疾患サンプルと比較して、増大または過剰発現し得る。そのような発現の増大または過剰発現は、例えば、突然変異、遺伝子増幅、転写の増大、翻訳の増大、またはタンパク質安定性の増大によって引き起こされ得る。

#### 【0055】

一例において、CD37発現は、免疫組織化学(IHC)によって測定され、定義されたスコアを呈する較正された対照との比較によって染色強度スコアまたは染色均一性スコアが与えられる(例えば、強度が較正された対照のレベル3と同程度である場合に、強度スコア3が試験サンプルに与えられ、または強度が較正された対照のレベル2と同程度である場合に、強度2が試験サンプルに与えられる)。不均一または均一である染色均一性も、CD37発現の増大の指標となる。染色強度および染色均一性スコアは、単独または併用して使用することができる(例えば、2ホモ、2ヘテロ、3ホモ、3ヘテロなど)。別の例において、CD37発現の増大は、対照値(例えば、がんでないまたはCD37値の上昇がないがんである対象由来の生体サンプル、組織または細胞における発現レベル)と比較して少なくとも2倍、少なくとも3倍または少なくとも5倍の増大の検出によって決定することができる。別の例において、CD37発現は、H-スコアを与えられる。H-スコアは、本明細書に提供される計算を使用して染色強度スコアを均一性スコアと組み合わせる。別の例において、CD37発現は、少なくとも特定レベルの染色を有する細胞のパーセンテージを決定することによって測定される(例えば、少なくとも25%の細胞が、少なくとも2のスコアを有し、または少なくとも75%の細胞が、少なくとも2のスコアを有する)。

#### 【0056】

「参照サンプル」を使用して、本明細書に提供される方法で得られた結果を試験サンプルと関連させ、比較することができる。参照サンプルは、細胞(例えば、細胞株、細胞ペレット)または組織であることができる。「参照サンプル」中のCD37レベルは、CD37の絶対もしくは相対量、量の範囲、最小および/もしくは最大量、平均量ならびに/または量の中央値であることができる。本明細書に提供される診断方法は、試験サンプル中のCD37の発現レベルと「参照値」との比較を含む。一部の実施形態では、参照値は、参照サンプル中のCD37の発現レベルである。参照値は、既定の値であることができ、試験サンプルと並列で検査される参照サンプル(例えば、対照生体サンプルまたは参照サンプル)から決定することもできる。参照値は、中央値もしくは平均のような単一のカットオフ値または信頼区間など値の範囲であることができる。参照値は、がんの素因がある個体、初期もしくは末期がんを有する個体、男性および/もしくは女性個体、またはがん治療を受けている個体など様々なサブグループの個体に対して確立することができる。陰性参照サンプルまたは値および陽性参照サンプルまたは値の例が、本明細書に記述される。

#### 【0057】

一部の実施形態では、参照サンプルは、健康な組織、特に、がん罹患していない対応する組織またはCD37を過剰発現するがん罹患していない対応する組織由来のサンプルである。この型の参照サンプルは、陰性対照サンプルまたは参照サンプルと呼ばれる。他の実施形態では、参照サンプルは、CD37を発現する腫瘍由来のサンプルである。こ

10

20

30

40

50

の型の参照サンプルは、陽性対照サンプルと呼ばれる。陽性対照サンプルは、CD37発現のレベルと相関する型（ヘテロ対ホモ）、染色強度の度合（0、1、2、3）、H-スコア、および/または少なくとも特定のレベルの染色がある細胞のパーセントの比較指標として使用され得る。陽性対照比較サンプルは、校正された参照サンプルとも呼ばれる。低または非CD37参照は、実施例において本明細書に記述され、脾臓の赤脾髄（例えば、単球および赤血球）、T細胞、およびヒト扁桃の濾胞間領域も含む。CD37を発現している参照が、実施例において本明細書に記述され、脾臓の白脾髄（例えば、Bリンパ球および脾臓の辺縁帯）、ヒト扁桃の胚中心およびヒト扁桃の外帯も含む。細胞株の場合、例示的な非発現細胞には、300-19細胞があり、発現細胞には、Dauidi、Ramoss、NamalwaおよびRL非ホジキンリンパ腫B細胞がある。別の陽性高CD37参照は、CD37で安定または一過性にトランスフェクトされた細胞株である（例えば、米国特許出願公開第2015/0093397号およびPCT公開WO2013/149171に記載の300.19/CD37、そのそれぞれは参照により本明細書に組み込まれる）。特定のガンに対するCD37の適当な陽性および陰性参照レベルは、1人または複数人の適当な対象におけるCD37のレベルを測定することによって決定することができ、そのような参照レベルは、対象の特定の集団に合うように調整されてもよい（例えば、比較が、ある特定の年齢の対象由来のサンプルにおけるCD37レベルとある特定の年齢群における特定の疾患状況、表現型またはその欠如に対する参照レベルの間で行われてもよいように、参照レベルは同年齢であることができる）。

10

## 【0058】

20

本明細書では、「免疫組織化学」とは、例えば、細胞または組織を分析するために使用される組織化学的および免疫学的方法のことを指す。したがって、用語「免疫組織化学」、「免疫細胞化学」および「免疫化学」は、互換的に使用される。

## 【0059】

本発明の「サンプル」または「生体サンプル」は、特定の実施形態では、真核生物由来など生物起源である。一部の実施形態では、サンプルはヒトサンプルであるが、動物サンプルを本発明の実施に使用することもできる。本発明に使用するためのサンプルの非限定的な供給源には、例えば固形組織、生検吸引物、体液抽出物、血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、表皮の外側切片、呼吸器、腸および尿生殖器管、涙、唾液、乳、腫瘍、器官、細胞培養物ならびに/または細胞培養構成要素がある。「がん性サンプル」は、がん性細胞を含有するサンプルである。本明細書に提供される方法は、利用可能な材料の量が少ない固形組織サンプルに有用であり得る。異なる型の細胞または組織を比較するステップと、疾患の存在および/もしくは型もしくは異常性を検出または決定するステップとを含むがこれに限定されない本明細書に提供される方法を使用して、CD37の発現の態様またはサンプルの状況を調べることができる。

30

## 【0060】

本明細書の目的の場合、組織サンプルの「切片」とは、組織サンプルの単一部または一片、例えば、組織サンプルから切り取った組織または細胞の薄片のことを指す。組織サンプルの複数の切片を採取し、本発明による分析に供してもよいと理解される。一部の場において、組織の選択された部分または切片は、細胞の均一な集団を含む。他の場合におい 40 て、選択された部分は、組織の領域、例えば、非限定的な例として内腔を含む。選択された部分は、例えば、1個の細胞もしくは2個の細胞と同程度に小さいことができ、または数千個もの細胞を表す可能性もある。ほとんどの場合において、細胞の採取は重要であり、本発明は、細胞成分の検出における使用について記述してきたが、本方法を使用して生物の非細胞成分（例えば、非限定的な例として血液中の可溶性成分）を検出することもできる。

## 【0061】

本明細書では、用語「捕捉試薬」とは、適切な条件下で捕捉試薬-標的分子複合体をサンプルの残りから分離できるような、サンプル中の標的分子を結合し、捕捉することができる試薬のことを指す。一実施形態では、捕捉試薬は固定されている。一実施形態では、 50



サンドイッチイムノアッセイにおける捕捉試薬は、標的抗原に対する抗体もしくはその抗原結合性断片または様々な抗体もしくはその抗原結合性断片の混合物である。

【0062】

本明細書では、用語「検出可能な」抗体もしくはその抗原結合性断片とは、検出手段によって増幅される標識によって直接、または例えば、標識される別の抗体もしくはその抗原結合性断片によって間接的に検出できる抗体もしくはその抗原結合性断片のことを指す。直接標識の場合、抗体またはその抗原結合性断片は、一般に、いくつかの手段によって検出可能な部分にコンジュゲートされる。一実施形態では、検出可能な抗体またはその抗原結合性断片は、ビオチン化抗体またはその抗原結合性断片である。

【0063】

本明細書では、用語「検出手段」とは、検出可能な抗体もしくはその抗原結合性断片の存在を検出するために使用される部分または技術のことを指し、マイクロタイタープレート上に捕捉された標識など固定された標識を増幅する検出薬剤を含む。一実施形態では、検出手段は、アビジンまたはストレプトアビジンなどの蛍光定量的検出薬剤である。

【0064】

一般に、「サンドイッチELISA」は、以下のステップを利用する：(1)マイクロタイタープレートを、捕捉抗体またはその抗原結合性断片でコーティングする；(2)サンプルを添加し、存在する任意の抗原を、捕捉抗体またはその抗原結合性断片に結合させる；(3)検出抗体またはその抗原結合性断片を添加し、抗原に結合させる；(4)酵素結合二次抗体またはその抗原結合性断片を添加し、検出抗体またはその抗原結合性断片に結合させる；および(5)基質を添加し、酵素によって検出可能な形態に変換する。

【0065】

本明細書において使用される場合、単語「標識」とは、「標識」抗体を生成するように直接または間接的に抗体にコンジュゲートされる検出可能な化合物もしくは組成物のことを指す。標識は、それ自体によって検出可能であることができ(例えば放射性同位元素標識または蛍光標識)、または酵素的標識の場合、検出可能な基質化合物もしくは組成物の化学変化を触媒することができる。

【0066】

「相関する」または「相関している」は、何らかの方法で、第1の分析の成績および/または結果を第2の分析の成績および/または結果と比較することを意味する。例えば、第1の分析の結果を、第2の分析を遂行する際に使用してもよく、および/または、第1の分析の結果を使用して、第2の分析を実施すべきかどうか決定してもよく、および/または第1の分析の結果を第2の分析の結果と比較してもよい。一実施形態では、CD37の発現の増大は、CD37標的化抗がん治療の有効度の可能性の増大と相関する。

【0067】

用語「抗体」とは、免疫グロブリン分子の可変領域にある少なくとも1つの抗原認識部位によってタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質または前述の組合せなどの標的を認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書では、用語「抗体」は、インタクテナポリクローナル抗体、インタクテナモノクローナル抗体、少なくとも2つのインタクテナ抗体から生成される二重特異性抗体などの多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体を含む融合タンパク質、および抗体が所望の生物活性を呈する限り、他の任意の修飾免疫グロブリン分子を包含する。抗体は、5つの主要なクラスの免疫グロブリン：それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる重鎖定常ドメインの同一性に基づいて、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgM、またはそのサブクラス(アイソタイプ)(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2)のいずれでもあり得る。異なるクラスの免疫グロブリンは、異なる周知のサブユニット構造および三次元構成を有する。抗体は、そのままであることも、または毒素、放射性同位元素など他の分子にコンジュゲートすることもできる。

【0068】

10

20

30

40

50

用語「抗体断片」とは、インタクトな抗体の部分のことを指す。「抗原結合性断片」とは、抗原に結合するインタクトな抗体の部分のことを指す。抗原結合性断片は、インタクトな抗体の抗原性決定可変領域を含有することができる。抗体断片の例には、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、およびF v断片、直鎖状抗体、および一本鎖抗体があるが、これに限定されない。用語、抗体の「抗原結合性断片」に包含される抗体断片の例には、(それだけには限らないが)：( i ) F a b断片、V L、V H、C LおよびC H 1ドメインからなる一価断片(例えば、パパインによって消化された抗体は、3つの断片：2つの抗原結合F a b断片および抗原を結合しない1つのF c断片を生じる)；( i i ) F ( a b' )<sub>2</sub>断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結されている2つのF a b断片を含む二価断片(例えば、ペプシンによって消化された抗体は、2つの断片：二価の抗原結合F ( a b' )<sub>2</sub>断片および抗原を結合しないp F c'断片を生じる)、および関連するF ( a b' )一価単位；( i i i ) V HおよびC H 1ドメインからなるF d断片(すなわち、F a bに含まれる重鎖の部分)；( i v ) 抗体の単一アームのV LおよびV HドメインからなるF v断片ならびに関連するジスルフィド連結されたF v；および( v ) V Hドメインからなるd A b (ドメイン抗体)またはs d A b (単一ドメイン抗体)断片(Wardら、Nature 341巻：544～546頁、1989年)がある。

10

## 【0069】

一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、天然に存在しない抗体である。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、天然の成分から精製される。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、組換えにより作製される。一部の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、ハイブリドーマによって作製される。

20

## 【0070】

「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合するC D 3 7などの抗原の生物活性を阻害もしくは減少させるものである。ある特定の実施形態では、遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的もしくは完全に阻害する。望ましくは、生物活性は、10%、20%、30%、50%、70%、80%、90%、95%、またはさらに100%減少する。

## 【0071】

用語「抗C D 3 7抗体」または「C D 3 7に結合する抗体」とは、抗体が、C D 3 7を標的とする診断および/または治療剤として有用であるような十分な親和性でC D 3 7を結合できる抗体のことを指す。無関係な、C D 3 7ではないタンパク質に対する抗C D 3 7抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ(R I A)により測定されるC D 3 7に対する抗体の結合の約10%未満である。ある特定の実施形態では、C D 3 7に結合する抗体は、1 μM、100 nM、10 nM、1 nM、または0.1 nMの解離定数(K d)を有する。抗C D 3 7抗体の例は、当技術分野において公知であり、例えば、米国特許出願公開第2011/0256153号に開示されており、参照により本明細書に組み込まれる。

30

## 【0072】

「モノクローナル」抗体またはその抗原結合性断片とは、単一の抗原決定基もしくはエピトープの特異性の高い認識および結合に関係している均質な抗体または抗原結合性断片の集団のことを指す。これは、異なる抗原決定基を対象とする様々な抗体を一般に含むポリクローナル抗体とは対照的である。用語「モノクローナル」抗体またはその抗原結合性断片は、インタクトな全長モノクローナル抗体および抗体断片(F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F vなど)、一本鎖(s c F v)変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、および抗原認識部位を含む他の任意の修飾免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル」抗体またはその抗原結合性断片とは、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、およびトランスジェニック動物があるが、これに限定されない多くの様式によって作製されるそのような抗体およびその抗原結合性断片のことを指す。

40

## 【0073】

50

用語「ヒト化」抗体またはその抗原結合性断片とは、特異的免疫グロブリン鎖、キメラ免疫グロブリン、または最小限の非ヒト（例えば、マウス）配列を含有するその断片である非ヒト（例えば、マウス）抗体または抗原結合性断片の形態のことを指す。一般に、ヒト化抗体またはその抗原結合性断片は、相補性決定領域（CDR）の残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター）のCDRの残基によって置き換えられているヒト免疫グロブリンである（Jonesら、1986年、Nature、321巻：522～525頁；Riechmannら、1988年、Nature、332巻：323～327頁；Verhoeyenら、1988年、Science、239巻：1534～1536頁）。一部の例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域（FR）残基が、所望の特異性、親和性および能力を有する非ヒト種の抗体または断片中の対応する残基と置き換えられる。ヒト化抗体またはその抗原結合性断片を、Fvフレームワーク領域および/または置き換えられた非ヒト残基内のいずれかにおける追加の残基の置換によってさらに修飾して、抗体またはその抗原結合性断片の特異性、親和性および/もしくは能力を洗練し、最適化することができる。一般に、ヒト化抗体またはその抗原結合性断片は、非ヒト免疫グロブリンに対応するCDR領域の全てまたは実質的に全てを含有する可変ドメインの少なくとも1つ、一般には2つもしくは3つのうちの実質的に全てを含むことになるが、FR領域の全てまたは実質的に全ては、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体またはその抗原結合性断片は、免疫グロブリン定常領域またはドメイン（Fc）の少なくとも部分、一般にヒト免疫グロブリンのそれを含むこともできる。ヒト化抗体を生成するために使用される方法の例は、米国特許第5,225,539号または第5,639,641号に記述されている。

#### 【0074】

本明細書において用語「一次」抗体またはその抗原結合性断片とは、サンプル中の標的タンパク質抗原に特異的に結合する抗体またはその抗原結合性断片のことを指す。一次抗体またはその抗原結合性断片は、一般に、免疫組織化学手順において使用される第1抗体またはその抗原結合性断片である。一実施形態では、一次抗体またはその抗原結合性断片は、免疫組織化学手順において使用される唯一の抗体またはその抗原結合性断片である。本明細書において用語「二次」抗体またはその抗原結合性断片とは、一次抗体またはその抗原結合性断片に特異的に結合し、それによって、もしその後には試薬を用いるならば、一次抗体またはその抗原結合性断片とその試薬との間にブリッジを形成する抗体またはその抗原結合性断片のことを指す。二次抗体またはその抗原結合性断片は、一般に、免疫組織化学手順において使用される第2抗体またはその抗原結合性断片である。本明細書において用語「三次」抗体とは、二次抗体またはその抗原結合性断片に特異的に結合し、それによって、もしその後には試薬を用いるならば、二次抗体またはその抗原結合性断片とその試薬との間にブリッジを形成する抗体またはその抗原結合性断片のことを指す。

#### 【0075】

抗体またはその抗原結合性断片の「可変領域」とは、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域のいずれか単独もしくは組合せのことを指す。重鎖および軽鎖の各可変領域は、超可変領域とも呼ばれる、3つの相補性決定領域（CDR）によって接続される4つのフレームワーク領域（FR）からなる。各鎖にあるCDRは、FRによって極近傍に保持されており、他の鎖由来のCDRと共に抗体の抗原結合部位の形成に参与する。CDRを決定するための技術は少なくとも2つある：（1）異種間配列変動に基づく手法（すなわち、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、（第5版、1991年、National Institutes of Health, Bethesda Md.））；および（2）抗原-抗体複合体の結晶学的研究に基づく手法（Al-lazikaniら（1997年）J. Molec. Biol.、273巻：927～948頁）。加えて、これらの2つの手法の組合せを、当技術分野において時には使用して、CDRを決定する。

#### 【0076】

可変ドメイン（およそ、軽鎖の残基1～107および重鎖の残基1～113）中の残基を指す場合、Kabat番号付け方式が一般に使用される（例えば、Kabatら、Sequences

10

20

30

40

50

of Immunological Interest.、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.(1991年)。

【0077】

Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、Md.(1991年)において、Kabatのようなアミノ酸位置の番号付けとは、抗体の編集の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに使用される番号付け方式のことを指す。この番号付け方式を使用して、実際の直線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRまたはCDRの短縮もしくはそれへの挿入に対応してより少ないもしくは追加のアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に1つのアミノ酸挿入(Kabatによる残基52a)および重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えば、Kabatによる残基82a、82bおよび82cなど)を含むことができる。残基のKabat番号付けは、抗体の配列の相同性の領域で「標準的な」Kabat番号付け配列と整列化することによって所与の抗体に対して決定することができる。Chothiaは、その代わりに構造ループの位置について言及している(ChothiaおよびLesk、J. Mol. Biol.、196巻:901~917頁(1987年))。Chothia CDR-H1ループの末端は、Kabat番号付け規則を使用して番号付けした場合、ループの長さに応じてH32~H34の間で変動する(これは、Kabat番号付けスキームが、H35AおよびH35Bに挿入を配置し;35Aも35Bも存在しない場合、ループは32で終了し;35Aだけが存在する場合、ループは33で終了し;35Aと35Bの両方が存在する場合、ループは34で終了するからである)。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループの折衷案を表し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアによって使用される。

【表A】

| ループ | Kabat    | AbM                       | Chothia    |
|-----|----------|---------------------------|------------|
| L1  | L24-L34  | L24-L34                   | L24-L34    |
| L2  | L50-L56  | L50-L56                   | L50-L56    |
| L3  | L89-L97  | L89-L97                   | L89-L97    |
| H1  | H31-H35B | H26-H35B<br>(Kabat 番号付け)  | H26-H32,34 |
| H1  | H31-H35  | H26-H35<br>(Chothia 番号付け) | H26-H32    |
| H2  | H50-H65  | H50-H58                   | H52-H56    |
| H3  | H95-H102 | H95-H102                  | H95-H102   |

【0078】

用語「ヒト」抗体またはその抗原結合性断片とは、ヒトによって産生される抗体もしくはその抗原結合性断片、または当技術分野において公知の任意の技術を使用して作製される、ヒトによって産生される抗体もしくはその抗原結合性断片に対応するアミノ酸配列を有する抗体もしくはその抗原結合性断片を意味する。ヒト抗体またはその抗原結合性断片のこの定義は、インタクトなまたは全長抗体、その断片を含む。

【0079】

用語「キメラ」抗体またはその抗原結合性断片とは、アミノ酸配列が2つまたはそれよりも多くの種から得られる抗体またはその抗原結合性断片のことを指す。一般に、軽ならびに重鎖両方の可変領域は、所望の特異性、親和性および能力を有する1つの種の哺乳動物(例えば、マウス、ラット、ウサギなど)から得られる抗体またはその抗原結合性断片の可変領域に対応し、一方で定常領域は、その種において免疫応答を誘発することを回避するために別の種(通常、ヒト)から得られる抗体またはその抗原結合性断片の配列と相

同である。

【0080】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」は、本明細書において互換的に使用され、特定の抗体またはその抗原結合性断片によって認識され、特異的にその結合を受け得る抗原の部分のことを指す。抗原がポリペプチドである場合、エピトープは、隣接するアミノ酸とタンパク質の三次フォールディングによって並置される隣接しないアミノ酸の両方から形成され得る。隣接するアミノ酸から形成されるエピトープは、タンパク質変性を受けても一般に保持されるが、三次フォールディングによって形成されるエピトープは、タンパク質変性により一般に失われる。エピトープは、固有の空間的コンフォメーションに少なくとも3個、より通常には、少なくとも5個または8～10個のアミノ酸を一般に含む。

10

【0081】

「結合親和性」とは、分子（例えば、抗体）の単一結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との非共有結合性相互作用の総計の強さのことを一般に指す。特に明記しない限り、本明細書では、「結合親和性」とは、結合ペアのメンバー（例えば、抗体および抗原）間の1：1の相互作用を反映する固有結合親和性のことを指す。分子Xの、そのパートナーYに対する親和性は、解離定数（ $K_d$ ）によって一般に表示することができる。親和性は、本明細書に記述されるものを含めた当技術分野において公知の一般的な方法によって測定することができる。低親和性抗体は、一般にゆっくりと抗原を結合し、容易に解離する傾向があるが、高親和性抗体は、一般により速く抗原を結合し、より長く結合し続ける傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が、当技術分野において公知であり、そのいずれも、本発明の目的に使用することができる。特定の例示的な実施形態が、次に記述される。

20

【0082】

結合親和性のことを指すために本明細書において使用される場合「または、より良い」は、分子とその結合パートナーの間のより強い結合のことを指す。より強い結合を指すために本明細書において使用される場合「または、より良い」は、より小さい $K_d$ 値を表した。例えば、抗原に対して「0.6 nMまたはより良い」親和性を有する抗体では、抗原に対する抗体の親和性は、 $< 0.6$  nM、すなわち、0.59 nM、0.58 nM、0.57 nMなど、または0.6 nM未満の任意の値である。

【0083】

前記値によって測定される生物学的特性（例えば、 $K_d$ 値）の文脈の中で、本明細書では、フレーズ「実質的に類似」または「実質的に同じ」とは、当業者が、2値間の差異に生物学的および/または統計的有意性がほとんどもしくはまったくないとみなすこととなるような2つの数値間（一般に、一方は本発明の抗体と関連し、他方は参照/比較抗体と関連する）での十分高い度合の類似性を意味する。前記2値間の差異は、参照/比較抗体に対する値に応じて約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満または約10%未満である。

30

【0084】

「単離された」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、天然には見られない形態のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、もはや天然において見られる形態ではない度合に精製されたそれらを含む。一部の実施形態では、単離された抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞または組成物は、実質的に純粋である。

40

【0085】

本明細書では、「実質的に純粋」とは、少なくとも50%純粋（すなわち、汚染物質を含まない）、少なくとも90%純粋、少なくとも95%純粋、少なくとも98%純粋、または少なくとも99%純粋である材料のことを指す。

【0086】

本明細書では、用語「イムノコンジュゲート」または「コンジュゲート」とは、細胞結

50

合剤（すなわち、抗CD37抗体またはその抗原結合性断片）に連結され、一般式：C-L-Aにより定義される化合物またはその誘導体のことを指し、C=細胞毒素、L=リンカーおよびA=細胞結合剤または抗CD37抗体もしくはその抗原結合性断片である。イムノコンジュゲートは、逆順の一般式：A-L-Cにより定義することもできる。

【0087】

「リンカー」は、安定な共有結合性様式で、化合物、通常には、マイタンシノイドなどの薬物を抗CD37抗体またはその断片などの細胞結合剤に連結することができる任意の化学的部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性であり続ける条件で酸誘導切断、光誘導切断、ペプチダーゼ誘導切断、エステラーゼ誘導切断およびジスルフィド結合切断に対して感受性もしくは実質的に抵抗性であり得る。適切なリンカーは当技術分野において周知であり、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸解離性基、光解離性基、ペプチダーゼ解離性基およびエステラーゼ解離性基がある。リンカーには、本明細書に記載され、当技術分野において公知の荷電しているリンカーおよびその親水性形態もある。

10

【0088】

用語「がん」および「がん性」とは、細胞の集団が、制御されていない細胞成長によって特徴付けられる、哺乳動物における生理的状态のことを指すまたは記述する。がんの例には、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫および白血病があるが、これに限定されない。「がん」または「腫瘍形成性」疾患のより具体的な例には、NHL、前駆体B細胞リンパ芽球形白血病/リンパ腫、およびB細胞慢性リンパ球形白血病（CLL）/小リンパ球形リンパ腫（SLL）などの成熟B細胞新生物、B細胞前リンパ球形白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（MCL）、低悪性度、中悪性度、高悪性度FLを含めた濾胞性リンパ腫（FL）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫（MALT型、節性および脾型）、毛様細胞性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、パーキットリンパ腫（BL）、形質細胞腫、形質細胞骨髓腫、移植後リンパ増殖性疾患、ならびに未分化大細胞リンパ腫（ALCL）を含めたB細胞リンパ腫がある。一部の実施形態では、がんは白血病またはリンパ腫である。

20

【0089】

「腫瘍」および「新生物」とは、前がん性病変を含めた良性（非がん性）もしくは悪性（がん性）のいずれかの過剰な細胞成長または増殖の結果得られる任意の塊のことを指す。

30

【0090】

用語「がん細胞」、「腫瘍細胞」および文法的に同等の物は、腫瘍細胞集団の大部分を含む非腫瘍形成性細胞と腫瘍形成性幹細胞（がん幹細胞）の両方を含む腫瘍または前がん性病変から得られる細胞の全集団のことを指す。本明細書では、用語「腫瘍細胞」は、新生および分化する能力を欠いている腫瘍細胞のことを単に指す場合、腫瘍細胞をがん幹細胞と区別するために用語「非腫瘍形成性」によって修飾されることになる。

【0091】

用語「対象」とは、ヒト、非ヒト霊長類、齧歯動物などを含むがそれには限らない、任意の動物（例えば、哺乳動物）のことを指し、特定の処置のレシピエントになる。一般に、ヒト対象に関して用語「対象」および「患者」は、本明細書において互換的に使用される。

40

【0092】

「化学療法剤」は、作用機序にかかわらずがんの処置に有用な化学化合物である。化学療法剤のクラスには、アルキル化剤、代謝拮抗物質、紡錘体毒植物アルカロイド、細胞傷害性/抗腫瘍性抗生物質、トポイソメラーゼ阻害剤、抗体、感光性物質およびキナーゼ阻害剤があるが、これに限定されない。化学療法剤には、「標的療法」および従来通りの化学療法に使用される化合物がある。

【0093】

1つまたは複数のさらなる治療剤「と併用する」投与には、任意の順序での同時（並列）および連続投与がある。

50

## 【 0 0 9 4 】

用語「医薬製剤」とは、活性成分の生物活性を有効にするような形態の調製物のことを指し、その製剤は、製剤が投与されることになる対象にとって許容できないほど有毒ないかなる追加成分も含有しない。そのような製剤は無菌であり得る。

## 【 0 0 9 5 】

本明細書に開示する抗体、その抗原結合性断片またはイムノコンジュゲートの「有効量」は、特別に記載される目的を遂行するのに十分な量である。「有効量」は、記載される目的と関連して、経験的および日常の様式で決定することができる。

## 【 0 0 9 6 】

用語「治療有効量」とは、対象もしくは哺乳動物において疾患もしくは障害を「処置」するのに有効な抗体、その抗原結合性断片または他の薬物の量のことを指す。がんの場合、薬物の治療有効量は、がん細胞の数を減少させ；腫瘍サイズを減少させ；末梢器官へのがん細胞浸潤を阻害し（すなわち、ある程度減速させ、ある特定の実施形態において停止させる）；腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度減速させ、ある特定の実施形態では、停止させる）；腫瘍成長をある程度阻害し；がんに関連する症状の1つまたは複数がある程度軽減し；および/または無増悪生存率（PFS）、無疾患生存率（DFS）もしくは総生存率（OS）の増大、完全応答（CR）、部分応答（PR）、もしくは一部の場において、安定疾患（SD）、進行性疾患（PD）の低下、無増悪期間（TTP）の減少、またはその任意の組合せなどの好ましい応答をもたらすことができる。本明細書における「処置」の定義を参照のこと。薬物が、存在するがん細胞の成長を防止するおよび/または死滅させ得る範囲で、それは細胞抑制性および/または細胞傷害性であり得る。ある特定の実施形態では、CD37レベルの増大を同定することにより、低下させた量のCD37標的治療薬を投与して、より高い投与量で見られるのと同じ治療効果を達成することが可能になる。「予防的有効量」とは、必要な投与量および期間で、所望の予防結果を達成するのに有効な量のことを指す。一般に、必ずしもそうではないが、予防用量は、疾患の初期より前またはその時点で対象に使用されるので、予防的有効量は、治療有効量より少なくなる。

## 【 0 0 9 7 】

用語「好ましく応答する」とは、対象において有益な状況を引き起こすことを一般に指す。がん処置に関しては、その用語は、対象に治療効果を提供することを指す。がんにおける陽性の治療効果は、いくつかの方法で測定することができる（W.A. Weber, J. Nucl. Med., 50巻：15～105頁（2009年）を参照のこと）。例えば、腫瘍成長阻害、分子マーカー発現、血清マーカー発現および分子画像技術は全て、抗がん治療薬の治療有効性を評価するために使用することができる。腫瘍成長阻害に関しては、NCI標準に従い、T/C 42%が、抗腫瘍活性の最小レベルである。T/C < 10%は、高抗腫瘍活性レベルとみなされ、 $T/C(\%) = \text{処置した腫瘍体積の中央値} / \text{対照の腫瘍体積の中央値} \times 100$ である。好ましい応答は、例えば、無増悪生存率（PFS）、無疾患生存率（DFS）もしくは総生存率（OS）の増大、完全応答（CR）、部分応答（PR）、もしくは一部の場において、安定疾患（SD）、進行性疾患（PD）の低下、無増悪期間（TTP）の減少、またはその任意の組合せによって評価することができる。

## 【 0 0 9 8 】

PFS、DFSおよびOSは、新薬の認可のために国立がん研究所および米国食品医薬品局による標準設定によって測定できる。Johnsonら、（2003年）J. Clin. Oncol., 21巻（7号）：1404～1411頁を参照のこと。

## 【 0 0 9 9 】

「無増悪生存率」（PFS）とは、登録から疾患の増悪または死亡までの期間のことを指す。NHL患者の場合、PFSは、悪性リンパ腫に関する国際統一化プロジェクトの改定応答基準に提供される標準を使用して測定することができる（Chesonら、J Clin Oncol., 25巻：579～86頁（2007年）、その全体が参照により本明細書に組み込まれる）。CLL患者の場合、PFSは、CLL応答基準に関する国立がん研究所（NC

10

20

30

40

50

I) 国際ワークショップに提供される標準を使用して測定することができる (Haliekら、Blood、111巻: 5446~56頁(2008年)、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫患者の場合、PFSはLugano分類標準を使用して測定することができる (Chesonら、J Clin Oncol.、32巻: 3059~68頁(2014年))。一般に、無増悪生存率とは、がんが悪化することなく患者が生存し続ける状況のことを指す。

【0100】

「腫瘍増悪までの期間」(TTP)は、登録から疾患の増悪までの期間と定義される。NHL患者の場合、TTPは、悪性リンパ腫に関する国際統一化プロジェクトの改定応答基準に提供される標準を使用して測定することができる (Chesonら、J Clin Oncol.、25巻: 579~86頁(2007年)、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。CLL患者の場合、TTPは、CLL応答基準に関する国立がん研究所(NCI)国際ワークショップに提供される標準を使用して測定することができる (Haliekら、Blood、111巻: 5446~56頁(2008年)、その全体が参照により本明細書に組み込まれる)。ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫患者の場合、TTPはLugano分類標準を使用して測定することができる (Chesonら、J Clin Oncol.、32巻: 3059~68頁(2014年))。

10

【0101】

「完全応答」または「完全寛解」または「CR」は、処置に応じた腫瘍またはがんの全ての徴候の消滅を示す。これは、がんが治癒されたことを必ずしも意味しない。

20

【0102】

「部分応答」または「PR」とは、処置に応じた、1つまたは複数の腫瘍もしくは病変のサイズまたは体積または身体におけるがんの程度の低下のことを指す。

【0103】

「安定疾患」とは、増悪または再発がない疾患のことを指す。安定疾患では、部分応答とみなすのに十分な腫瘍収縮も進行性疾患とみなすのに十分な腫瘍増加もない。

【0104】

「進行性疾患」とは、さらに1つ新たな病変もしくは腫瘍が出現すること、および/または既存の標的ではない病変の明白な増悪のことを指す。進行性疾患とは、腫瘍の塊または拡大のいずれかの増加による、処置が始まって以降20パーセントより大きい腫瘍成長のことを指すこともできる。

30

【0105】

「無疾患生存率」(DFS)とは、患者が疾患なくあり続ける処置中および後の期間の長さのことを指す。

【0106】

「総生存率」(OS)とは、患者登録から死亡または生存が知られている最終日に削除されるまでの期間のことを指す。OSは、無投薬または無処置の個体もしくは患者と比較した寿命の延長を含む。総生存率とは、患者が、例えば、診断または処置の時点から1年、5年など、定められた期間に生存し続ける状況のことを指す。

【0107】

「処置している」もしくは「処置」もしくは「処置する」または「軽減している」もしくは「軽減する」などの用語は、診断された病態もしくは障害を治癒する、減速する、症状を軽くする、および/または増悪を停止させる治療措置のことを指す。したがって、処置を必要とする者は、障害を有するとすでに診断されているまたは疑われる者を含む。ある特定の実施形態では、患者が、がん細胞の数の減少または完全な非存在；腫瘍サイズの減少；例えば、軟組織および骨へのがんの拡大を含めた末梢器官へのがん細胞浸潤の阻害または非存在；腫瘍転移の阻害または非存在；腫瘍成長の阻害または非存在；特定のがんに関連する1つまたは複数の症状の軽減；罹患率および死亡率の減少；生活の質の改善；腫瘍の腫瘍形成性、腫瘍形成性頻度または腫瘍形成性能力の減少；腫瘍におけるがん幹細胞の数または頻度の減少；非腫瘍形成性状況への腫瘍形成性細胞の分化；無増悪生存率(P

40

50



F S )、無疾患生存率 ( D F S ) もしくは総生存率 ( O S ) の増大、完全応答 ( C R )、部分応答 ( P R )、安定疾患 ( S D )、進行性疾患 ( P D ) の低下、無増悪期間 ( T T P ) の減少またはその任意の組合せのうち 1 つまたは複数を示す場合に、対象は本発明の方法によりがんを成功裏に「処置される」。

【 0 1 0 8 】

予防的もしくは防止的措置とは、標的とした病態もしくは障害の発症を防止および/または遅らせる治療措置のことを指す。したがって、予防的または防止的措置を必要とする者は、障害を有する傾向がある者および障害を防止すべき者を含む。

【 0 1 0 9 】

本明細書では、用語「保健医療提供者」とは、生きている対象、例えば、ヒト患者に直接接し、投与する個体または機関のことを指す。保健医療提供者の非限定的な例には、医師、看護師、技師、療法士、薬剤師、カウンセラー、代替医療開業医、医療施設、医院、病院、緊急治療室、クリニック、救急センター、代替医療クリニック/施設、ならびに総合医療、専門的な内科、外科および/または他の任意の型の処置、評価、維持、治療、投薬および/もしくは助言を含むがこれに限定されない、総合および/もしくは専門的な処置、評価、維持、治療、投薬、および/もしくは患者の健康状況の全てもしくは任意の部分に関して助言を提供する他の任意の実体がある。

【 0 1 1 0 】

一部の態様において、保健医療提供者は治療を施し、または治療を施すように別の保健医療提供者に指示し、それによってがんを処置することができる。治療の「施術」は、本明細書では、対象に治療を処方することおよび対象に治療を届け、適用しまたは与えることを含む。保健医療提供者は、別の保健医療提供者または患者に実施もしくは指示して、以下の行為を実施することができる：サンプルを得る、サンプルを処理する、サンプルを提出する、サンプルを受け取る、サンプルを移す、サンプルを分析もしくは測定する、サンプルを定量化する、サンプルを分析/測定/定量化した後に得られる結果を提供する、サンプルを分析/測定/定量化した後に得られる結果を受け取る、1つまたは複数のサンプルを分析/測定/定量化した後に得られる結果を比較/スコア化する、1つまたは複数のサンプルからの比較/スコアを提供する、1つまたは複数のサンプルからの比較/スコアを得る、治療もしくは治療剤（例えば、CD37結合剤）を投与する、治療の施術を開始する、治療の施術を中止する、治療の施術を継続する、治療の施術を一時的に中断する、投与される治療剤の量を増大させる、投与される治療剤の量を低下させる、治療剤の投与の量を継続する、治療剤の投与の頻度を増大させる、治療剤の投与の頻度を低下させる、治療剤について同じ服薬頻度を維持する、治療もしくは治療剤を少なくとも別の治療もしくは治療剤で置き換える、治療もしくは治療剤を少なくとも別の治療もしくは追加の治療剤と併用する。これらの行為は、コンピュータ実施される方法（例えば、ウェブサービスまたは独立型コンピュータシステムによる）を使用して保健医療提供者によって機械的に実施され得る。

【 0 1 1 1 】

本明細書において互換的に使用される「ポリヌクレオチド」または「核酸」とは、任意の長さのヌクレオチドのポリマーのことを指し、DNAおよびRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基および/もしくはそのアナログ、またはDNAもしくはRNAポリメラーゼによってポリマーに組み込まれ得る任意の基質であることができる。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドおよびそのアナログなどの修飾ヌクレオチドを含むことができる。存在する場合、ヌクレオチド構造への修飾は、ポリマーの組立て前後に加え得る。ヌクレオチドの配列は、非ヌクレオチド成分によって中断することができる。ポリヌクレオチドは、標識成分とのコンジュゲーションによるなど、ポリメラーゼ反応後にさらに修飾することができる。他の型の修飾には、例えば、「キャップ」、アナログによる1つまたは複数の天然に存在するヌクレオチドの置換、ヌクレオチド間の修飾、例えば、荷電していない連結（例えば、メチルホスホネート、ホスホトリエステル、ホスホロアミデート（phosphoamidates

10

20

30

40

50

)、カルバメート (cabamates) など) および荷電している連結 (例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエートなど) によるヌクレオチド間の修飾、例えばタンパク質 (例えば、ヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、ポリ-L-リシン (poly-L-lysine) など) などペンダント部分を含むヌクレオチド間の修飾、インターカレーター (例えば、アクリジン、ソラレンなど) によるヌクレオチド間の修飾、キレート剤 (例えば、金属、放射性金属、ホウ素、酸化力がある金属など) を含むヌクレオチド間の修飾、アルキル化剤を含むヌクレオチド間の修飾、修飾連結 (例えば、アルファ-アノマー核酸など) によるヌクレオチド間の修飾など、ならびに無修飾形態のポリヌクレオチドがある。さらに、糖に通常存在する任意のヒドロキシル基を、例えば、ホスホネート基、リン酸基によって置き換え、標準的な保護基によって保護し、または活性化して追加のヌクレオチドに追加の連結を調製することができ、または固体支持体にコンジュゲートすることができる。5' および 3' 末端 OH は、リン酸化またはアミンもしくは炭素原子 1 ~ 20 個の有機キャッピング基部分で置換することができる。他のヒドロキシルは、標準的な保護基に誘導体化することもできる。ポリヌクレオチドは、例えば、2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロもしくは 2'-アジド-リボース、炭素環式糖アナログ、アルファ-アノマー糖、アラビノース、キシロースもしくはリキソースなどのエピマー糖、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式アナログおよびメチルリボシドなどの無塩基ヌクレオシドアナログを含めた当技術分野において一般に公知であるリボースまたはデオキシリボース糖の類似形態を含むこともできる。1つまたは複数のリン酸ジエステル連結は、代替の連結基によって置き換えることができる。これらの代替の連結基には、リン酸が、P(O)S(「チオエート」)、P(S)S(「ジチオエート」)、(O)NR<sub>2</sub>(「アミデート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO または CH<sub>2</sub>(「ホルムアセタール」)によって置き換えられ、各 R または R' が、それぞれ独立に H または任意選択でエーテル(-O-)連結を含む置換もしくは無置換アルキル(1~20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニルまたはアラキル(araldyl)である実施形態があるが、これに限定されない。ポリヌクレオチド中の全ての連結が、同一になる必要があるとは限らない。前の説明を、RNA および DNA を含め本明細書において言及されるポリヌクレオチド全てに適用する。

10

20

#### 【0112】

用語「ベクター」とは、宿主細胞において1つまたは複数の、目的の遺伝子もしくは配列を送達し、発現できる構築物を意味する。ベクターの例には、ウイルスベクター、ネイキッドDNAもしくはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、陽イオン縮合剤と会合されたDNAもしくはRNA発現ベクター、リボソームに封入されているDNAもしくはRNA発現ベクター、およびプロデューサー細胞などある特定の真核細胞があるが、これに限定されない。

30

#### 【0113】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指すために、本明細書において互換的に使用される。ポリマーは、直鎖状または分枝状であることができ、修飾アミノ酸を含むことができ、非アミノ酸によって中断され得る。用語は、天然のまたは介入によって修飾アミノ酸ポリマー；例えば、ジスルフィド結合形成、糖鎖形成、脂質化、アセチル化、リン酸化、もしくは他の任意の操作または標識成分とのコンジュゲーションなどの修飾も包含する。例えば、アミノ酸の1つまたは複数のアナログ(例えば、非天然のアミノ酸などを含む)、および当技術分野において公知の他の修飾を含むポリペプチドも定義に含める。本発明のポリペプチドは抗体に基づくので、ある特定の実施形態では、ポリペプチドは一本鎖または関連鎖として存在し得ると理解される。一部の実施形態では、ポリペプチド、ペプチドまたはタンパク質は、天然に存在しない。一部の実施形態では、ポリペプチド、ペプチドまたはタンパク質は、他の天然に存在する成分から精製される。一部の実施形態では、ポリペプチド、ペプチドまたはタンパク質は、組換えにより作製される。

40

#### 【0114】

50

2つまたはそれよりも多くの核酸もしくはポリペプチドの文脈において用語「同一」またはパーセント「同一性」とは、最大の一一致のために比較、整列（必要に応じて、ギャップを導入する）した際に、同じまたは指定されたパーセンテージのヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する2つまたはそれよりも多くの同じ配列もしくは部分配列のことを指し、配列同一性の一部としてどんな保存的アミノ酸置換も考慮しない。パーセント同一性は、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用してまたは目視検査によって測定することができる。アミノ酸またはヌクレオチド配列の整列化を得るために使用できる様々なアルゴリズムおよびソフトウェアが当技術分野において公知である。配列整列化アルゴリズムのそのような非限定的な一例は、Karlinら、1990年、Proc. Natl. Acad.

Sci., 87巻: 2264~2268頁に記述され、Karlinら、1993年、Proc. Natl. Acad. Sci., 90巻: 5873~5877頁において改変された、NBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれているアルゴリズムである(Altschulら、1991年、Nucleic Acids Res., 25巻: 3389~3402頁)。ある特定の実施形態では、Gapped BLASTを、Altschulら、1997年、Nucleic Acids Res., 25巻: 3389~3402頁に記載の通り使用することができる。BLAST-2、WU-BLAST-2(Altschulら、1996年、Methods in Enzymology, 266巻: 460~480頁)、ALIGN、ALIGN-2(Genentech, South San Francisco, California)またはMegalign(DNA STAR)は、配列を整列するのに使用できる別の一般公開されているソフトウェアプログラムである。ある特定の実施形態では、2つのヌクレオチド配列間のパーセント同一性は、GCGソフトウェアのGAPプログラムを使用して(例えばNWSgapdna.CMPマトリックスおよびギャップ加重40、50、60、70または90および長さ加重1、2、3、4、5または6を使用して)決定される。ある特定の代替の実施形態では、NeedlemanおよびWunsch(J. Mol. Biol. (48巻): 444~453頁(1970年))のアルゴリズムを組み込んだGCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを使用して、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性を決定することができる(例えば、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれか、およびギャップ加重16、14、12、10、8、6または4、および長さ加重1、2、3、4、5を使用する)。あるいは、ある特定の実施形態では、ヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のパーセント同一性は、MyersおよびMiller(CABIOS, 4巻: 11~17頁(1989年))のアルゴリズムを使用して決定される。例えば、パーセント同一性は、ALIGNプログラム(バージョン2.0)を使用し、残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を用いてPAM120を使用して決定され得る。特定の整列化ソフトウェアによる最大の整列化のための適当なパラメータは、当業者によって決定され得る。ある特定の実施形態では、整列化ソフトウェアの初期設定パラメータが使用される。ある特定の実施形態では、第2の配列アミノ酸に対する第1のアミノ酸配列のパーセンテージでの同一性「X」は、 $100 \times (Y/Z)$ として算出され、式中、Yは、第1および第2の配列の整列化において同一の一一致としてスコア化されるアミノ酸残基の数であり(目視検査または特定の配列整列化プログラムによって整列される)、Zは、第2の配列における残基の総数である。第1の配列の長さが第2の配列より長い場合、第2の配列に対する第1の配列のパーセント同一性は、第1の配列に対する第2の配列のパーセント同一性より長いことになる。

#### 【0115】

非限定的な例として、任意の特定のポリヌクレオチドが、参照配列に対してある特定の、パーセンテージでの配列同一性(例えば、少なくとも80%同一、少なくとも85%同一、少なくとも90%同一、および一部の実施形態では、少なくとも95%、96%、97%、98%、または99%同一である)を有するかどうかは、ある特定の実施形態では、Bestfitプログラムを使用して決定することができる(Wisconsin Sequence Analysis Package, Unix(登録商標)用のバージョン8、Genetics Computer Group, University R

10

20

30

40

50

research Park、575 Science Drive、Madison、WI 53711)。Bestfitは、SmithおよびWaterman、Advances in Applied Mathematics 2巻：482～489頁(1981年)の局所的相同性アルゴリズムを使用して、2つの配列間の相同性で最善の区分を見出す。Bestfitまたは他の任意の配列整列化プログラムを使用して、特定の配列が、本発明による参照配列と例えば95%同一かどうか決定する場合、同一性のパーセンテージが参照ヌクレオチド配列の全長にわたって算出され、参照配列におけるヌクレオチドの総数の最大5%の相同性のギャップが許容されるように、パラメータが設定される。

【0116】

一部の実施形態では、本発明の2つの核酸またはポリペプチドが、実質的に同一であるということは、最大的一致について比較し、整列した場合に、配列比較アルゴリズムを使用してまたは目視検査によって測定してそれらが少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、一部の実施形態において少なくとも95%、96%、97%、98%、99%のヌクレオチドまたはアミノ酸残基同一性を有することを意味する。ある特定の実施形態では、同一性は、長さが少なくとも約10、約20、約40～60残基もしくはその間の任意の整数値である配列の領域にわたって、または60～80残基より長い領域、少なくとも約90～100残基にわたって存在し、あるいは配列は、例えばヌクレオチド配列のコード領域など比較される配列の全長にわたって実質的に同一である。

【0117】

「保存的アミノ酸置換」は、あるアミノ酸残基が、類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基で置き換えられるものである。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されており、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、荷電していない極性側鎖(例えば、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン)、非極性側鎖(例えば、グリシン、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、トリプトファン)、ベータ分枝状側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(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。例えば、チロシンに対するフェニルアラニンの置換は、保存的置換である。ある特定の実施形態では、本発明のポリペプチドおよび抗体の配列における保存的置換は、抗原、すなわちポリペプチドまたは抗体が結合するCD37に対するアミノ酸配列を含有するポリペプチドまたは抗体の結合を無効にしない。抗原結合性を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当技術分野において周知である(Brummellら、Biochem、32巻：1180～1187頁(1993年)；Kobayashiら、Protein Eng.、12巻(10号)：879～884頁(1999年)；およびBurksら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94巻：412～417頁(1997年)を参照のこと。)

【0118】

本開示および請求項で使用される、単数形「a」、「an」および「the」は、文脈に別段の明確な指図がない限り、複数形を含む。

【0119】

実施形態が、言葉「含む(comprising)」により本明細書に記述される場合はいつでも、別の用語「からなる(consisting of)」および/または「から本質的になる(consisting essentially of)」で記述される類似の実施形態も提供されるものと理解される。

【0120】

本明細書において「Aおよび/またはB」などのフレーズで使用される用語「および/または」は、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」および「B」両方を含むことを意図する。同様に、「A、Bおよび/またはC」などのフレーズで使用される用語「および/または」は、以下の実施形態のそれぞれを包含することを意図する：A、BおよびC；

10

20

30

40

50

A、BまたはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A（単独）；B（単独）；ならびにC（単独）。

II. CD37結合剤

【0121】

本開示は、ヒトCD37を特異的に結合する薬剤を提供する。これらの薬剤は、本明細書において、「CD37結合剤」と称される。ある特定の実施形態では、CD37結合剤は、抗体、その抗原結合性断片、イムノコンジュゲートまたはポリペプチドである。ヒトCD37の全長アミノ酸配列は、当技術分野において公知であり、また配列番号1によって表されるように本明細書にそれぞれ提供される。

【0122】

ヒトCD37：

MSAQESCLSLIKYFLVFNLFVFLGSLIFCFGIWILIDKTSFVSVFVGLAFVPLQIWSKVLASGIFTMGIALLGCVGAL  
KELRCLLGLYFGMLLLLIFATQITLGIILISTQRAQLERSLRDVEKTIKQYGTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHPYQD  
WFQVLIILRNGSEAHVRPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRSADICAVPAESHIYREGCAQGLQKWLHN  
NLISIVGICLGVGLLELGFMTLSIFLCRNLDHVYNRLARYR（配列番号1）

【0123】

ヒトCD37核酸配列：

atgtcagcccaggagagctgcctcagcctcatcaagtacttctcttcgttttcaacctctcttcttcttctcgtcctcggcag  
cctgatcttctgcttcggcatctggatcctcatcgacaagaccagcttcgtgtcctttgtgggcttggccttcgtgcctc  
tgcagatctggccaaagtctggccatctcaggaatctcaccatgggcatcgccctcctgggttgtgtgggggcccctc  
aaggagctccgctgcctcctgggctgtatftgggatgctgctgctcctgtttgccacacagatcacctgggaatcct  
catctccactcagcgggcccagctggagcgaagcttcggggacgtcgtagagaaaacatccaaaagtacggcaccaacc  
ccgaggagaccgcgccgaggagagctgggactatgtgcagttccagctgcgctgctgcggctggcactaccgcaggac  
tgggtccaagtctcatcctgagaggtaacgggtcggaggcgcaccgctgccctgctcctgctacaacttgtcggcgac  
caacgactccacaatcctagataaggatgcttgccccagctcagcaggcttggacacctggcgcggtccagacacagtg  
cagacatctgcgctgtccctgcagagagccacatctaccgagggctgcgagcagggcctccagaagtggctgcacaac  
aaccttatftccatagtgggcatttgccctgggctcggcctactcgagctcgggttcattgacgctctcgatattcctgtg  
cagaacctggaccacgtctacaaccggctcgctcgataccgt（配列番号2）

【0124】

したがって、一部の実施形態では、CD37結合剤は、配列番号1のエピトープまたは配列番号2によってコードされるポリペプチドのエピトープに特異的に結合することができる。

【0125】

CD37結合剤は、以下に提供される1B11-2抗体の配列を有するCD37結合剤も含む。

muCD37-1B11-2 VH-CDR1

GYFMN（配列番号3）

muCD37-1B11-2 VH-CDR2（Kabatt）

RINPYNGDTFYNQKFKG（配列番号4）

muCD37-1B11-2 VH-CDR2（AbM）

RINPYNGDTF（配列番号34）

muCD37-1B11-2 VH-CDR3

RGIVASSRFFDV（配列番号5）

muCD37-1B11-2 VL-CDR1

KASQGVSNVD（配列番号6）

muCD37-1B11-2 VL-CDR2

YASNRYT（配列番号7）

muCD37-1B11-2 VL-CDR3

CHQDYTSPT（配列番号8）

muCD37-1B11-2 重鎖可変領域（VH）

10

20

30

40

50

EVQLLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWV IQSHGKGLEWIGRINPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSTTAH  
MELLSLTSEDSAVYYCGSRGIVASSRFFDVGAGTSVIVSS (配列番号 9)

m u C D 3 7 - 1 B 1 1 - 2 軽鎖可変領域 ( V L )

SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQGVSNVDVDWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFSI  
EDLAVYFCHQDYTSPTFGGGTKLEIKR (配列番号 10)

m u C D 3 7 - 1 B 1 1 - 2 完全長重鎖 ( H C )

EVQLLQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTGYFMNWV IQSHGKGLEWIGRINPYNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSTTAH  
MELLSLTSEDSAVYYCGSRGIVASSRFFDVGAGTSVIVSSAKTTPPSVYPLAPGSAQAQNSMVTGLGLVKGYFPEPVTV  
TWNSGSLSSGVHTFPAVLES DLYTLSSSVTVPSRPRSETVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFI  
FPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRV  
NSAAFPAPEIKTISKTKGRPKAPQVYTPPPKEQMAKDKVSLTCMIDTFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPMINTNGS  
YFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (配列番号 11)

10

m u C D 3 7 - 1 B 1 1 - 2 完全長軽鎖

SIVMTQTPKFLVLSAGDRVTITCKASQGVSNVDVDWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTFSI  
EDLAVYFCHQDYTSPTFGGGTKLEIKRADAAPTVISFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSRQNGVLN  
SWTDQDQSKDSTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPVKSFNREK (配列番号 12)

【 0 1 2 6 】

C D 3 7 結合剤は、配列番号 3 ~ 8 に提供される 1 B 1 1 - 2 抗体の 6 つの C D R 配列  
を含む C D 3 7 結合剤 (例えば、抗体およびその抗原結合性断片) を含む。

【 0 1 2 7 】

C D 3 7 結合性分子は、C D R 1 つ当たり最大 4 つ (すなわち、0、1、2、3 または  
4 つ) の保存的アミノ酸置換がある抗体 1 B 1 1 - 2 の C D R (すなわち、配列番号 3 ~  
8) を含む C D 3 7 結合剤 (例えば、抗体およびその抗原結合性断片) であることができ  
る。C D 3 7 結合性分子は、最大 4 つ (すなわち、0、1、2、3 または 4 つ) の保存的  
アミノ酸置換がある抗体 1 B 1 1 - 2 の C D R (すなわち、配列番号 3 ~ 8) を含む C D  
3 7 結合剤 (例えば、抗体およびその抗原結合性断片) であることができる。C D 3 7 結  
合性分子は、( i ) C D R 1 つ当たり最大 4 つ (すなわち、0、1、2、3 または 4 つ)  
の保存的アミノ酸置換がある配列番号 3、4、6 および 7 の C D R ならびに ( i i ) 配列  
番号 5 および 8 の C D R を含む C D 3 7 結合剤 (例えば、抗体およびその抗原結合性断片  
) であることができる。C D 3 7 結合性分子は、( i ) 最大 4 つ (すなわち、0、1、2  
、3 または 4 つ) の保存的アミノ酸置換がある配列番号 3、4、6 および 7 の C D R なら  
びに ( i i ) 配列番号 5 および 8 の C D R を含む C D 3 7 結合剤 (例えば、抗体およびそ  
の抗原結合性断片) であることができる。C D 3 7 結合性分子は、( i ) C D R 1 つ当  
り最大 4 つ (すなわち、0、1、2、3 または 4 つ) の保存的アミノ酸置換がある配列番  
号 3、4 および 6 ~ 8 の C D R ならびに ( i i ) 配列番号 5 の C D R を含む C D 3 7 結  
合剤 (例えば、抗体およびその抗原結合性断片) であることができる。C D 3 7 結合性分子  
は、( i ) 最大 4 つ (すなわち、0、1、2、3 または 4 つ) の保存的アミノ酸置換があ  
る配列番号 3、4 および 6 ~ 8 の C D R ならびに ( i i ) 配列番号 5 の C D R を含む C D  
3 7 結合剤 (例えば、抗体およびその抗原結合性断片) であることができる。

20

30

【 0 1 2 8 】

ポリペプチド、抗体およびその抗原結合性断片は、1 B 1 1 - 2 抗体の可変軽鎖、可変  
重鎖または可変軽鎖と可変重鎖の両方を含むことができる。( a ) 配列番号 9 と少なくと  
も 9 0 % 配列同一性を有するポリペプチドおよび / または ( b ) 配列番号 1 0 と少なくと  
も 9 0 % 配列同一性を有するポリペプチドを含むポリペプチドも提供される。ある特定  
の実施形態では、ポリペプチドは、C D 3 7 を特異的に結合する抗体および / またはポリ  
ペプチドである。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、C D 3 7 を特異的に結合する  
マウス、キメラまたはヒト化抗体である。ある特定の実施形態では、配列番号 9 または 1  
0 とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、保存的アミノ酸置  
換だけが配列番号 9 または 1 0 と異なる。

40

【 0 1 2 9 】

50

ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 95% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 96% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 97% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 98% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 99% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、CD37 を特異的に結合する抗体および/またはポリペプチドである。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、CD37 を特異的に結合するマウス、キメラまたはヒト化抗体である。ある特定の実施形態では、配列番号 9 とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、保存的アミノ酸置換だけが配列番号 9 と異なる。ある特定の実施形態では、配列番号 9 とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、CDR の外側のアミノ酸だけが配列番号 9 と異なる。ある特定の実施形態では、配列番号 9 とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、CDR の外側の保存的アミノ酸置換だけが配列番号 9 と異なる。

#### 【0130】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 10 と少なくとも 95% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 10 と少なくとも 96% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 10 と少なくとも 97% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 10 と少なくとも 98% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 10 と少なくとも 99% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、CD37 を特異的に結合する抗体および/またはポリペプチドである。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、CD37 を特異的に結合するマウス、キメラまたはヒト化抗体である。ある特定の実施形態では、配列番号 10 とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、保存的アミノ酸置換だけが配列番号 10 と異なる。ある特定の実施形態では、配列番号 10 とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、CDR の外側のアミノ酸だけが配列番号 10 と異なる。ある特定の実施形態では、配列番号 10 とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、CDR の外側の保存的アミノ酸置換だけが配列番号 10 と異なる。

#### 【0131】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 95% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号 10 と少なくとも 95% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 96% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号 10 と少なくとも 96% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 97% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号 10 と少なくとも 97% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 98% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号 10 と少なくとも 98% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号 9 と少なくとも 99% 同一の配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号 10 と少なくとも 99% 同一の配列を含む可変軽鎖ドメインを含む

10

20

30

40

50

。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、CD37を特異的に結合する抗体および/またはポリペプチドである。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、CD37を特異的に結合するマウス、キメラまたはヒト化抗体である。ある特定の実施形態では、配列番号9および/または10とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、保存的アミノ酸置換だけが配列番号9および/または10と異なる。ある特定の実施形態では、配列番号9および/または10とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、CDRの外側のアミノ酸だけが配列番号9および/または10と異なる。ある特定の実施形態では、配列番号9および/または10とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、CDRの外側の保存的アミノ酸置換だけが配列番号9および/または10と異なる。

10

## 【0132】

ある特定の実施形態では、ポリペプチド、抗体、またはその抗原結合性断片は、配列番号9に示す配列を含む可変重鎖ドメインおよび配列番号10に示す配列を含む可変軽鎖ドメインを含む。

## 【0133】

ポリペプチドは、本明細書に記述される個々の軽鎖または重鎖のうち1つを含むことができる。抗体およびポリペプチドは、軽鎖と重鎖を両方含むこともできる。抗体1B11-2の軽鎖および重鎖配列は、配列番号11および12に提供される。

## 【0134】

(a) 配列番号11と少なくとも約90%配列同一性を有するポリペプチド; および/または (b) 配列番号12と少なくとも約90%配列同一性を有するポリペプチドを含むポリペプチドも提供される。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、配列番号11または12と少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%もしくは少なくとも約99%配列同一性を有するポリペプチドを含む。したがってある特定の実施形態では、ポリペプチドは、(a) 配列番号11と少なくとも約95%配列同一性を有するポリペプチド、および/または (b) 配列番号12と少なくとも約95%配列同一性を有するポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、(a) 配列番号11のアミノ酸配列を有するポリペプチド; および/または (b) 配列番号12のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、CD37を特異的に結合する抗体および/またはポリペプチドである。ある特定の実施形態では、ポリペプチドは、CD37を特異的に結合するマウス、キメラまたはヒト化抗体である。ある特定の実施形態では、配列番号11および/または12とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、保存的アミノ酸置換だけが配列番号11および/または12と異なる。ある特定の実施形態では、配列番号11および/または12とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、CDRの外側のアミノ酸だけが配列番号11および/または12と異なる。ある特定の実施形態では、配列番号11および/または12とある特定のパーセンテージの配列同一性を有するポリペプチドは、CDRの外側の保存的アミノ酸置換だけが配列番号11および/または12と異なる。

20

30

## 【0135】

ある特定の実施形態では、CD37結合剤(例えば、抗体またはその抗原結合性断片)は、配列番号9に示す配列を含む可変重鎖および配列番号10に示す配列を含む可変軽鎖を含む抗体またはその抗原結合性断片と同じエピトープに結合する。ある特定の実施形態では、CD37結合剤(例えば、抗体またはその抗原結合性断片)は、CD37に対する配列番号9に示す配列を含む可変重鎖および配列番号10に示す配列を含む可変軽鎖を含む抗体またはその抗原結合性断片の結合を競合的に阻害する。ある特定の実施形態では、CD37結合剤(例えば、抗体またはその抗原結合性断片)は、CD37に対する配列番号9に示す配列を含む可変重鎖および配列番号10に示す配列を含む可変軽鎖を含む抗体またはその抗原結合性断片の結合を競合的に阻害し、配列番号9に示す配列を含む可変重鎖および配列番号10に示す配列を含む可変軽鎖を含む抗体またはその抗原結合性断片が

40

50



結合するエピトープと重複するエピトープに結合する。

【 0 1 3 6 】

ある特定の実施形態では、C D 3 7 結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、本明細書に提供される以下のC D 3 7 抗原配列に結合するおよび/または結合しない。

C D 3 7 抗原配列

h C D 3 7 - L E L (下線を引いたC D 3 7 A A 1 0 7 ~ 2 4 2 )

TMELLISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI  
LRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESH  
IYREGCAQGLQKWLHNNLSFLEQKLI SEEDLNSAVDHH  
HHHH (配列番号 1 5 )

10

h C D 3 7 - E C D - F c (下線を引いたh C D 3 7 A A 1 0 7 ~ 2 3 5 )

GPEFLISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI  
LRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESH  
IYREGCAQGLQGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPS  
VFIFPPKIKDVLMI SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALP  
IQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPED  
IYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK  
(配列番号 1 6 )

h C D 3 7 - F c - L A G A (下線を引いたh C D 3 7 A A 1 0 7 ~ 2 3 5 )

GPEFLISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI  
LRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESH  
IYREGCAQGLQGS DKHTHTCPPCPAPELAGAPSVFLFPP  
KPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD  
WLNQKEYKCKVSN KALPAIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  
NGQPENNYKTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG  
(配列番号 1 7 )

20

h C D 3 7 - E C D - S 2 - F c (二重下線を引いたh C D 3 7 A A 1 0 7 ~ 1 0 9 およ  
び下線を引いたA A 1 3 8 ~ 2 3 5 )

GPEFLISAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI  
LRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARS  
RHSADICAVPAESH  
IYREGCAQGLQGSEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMI  
SLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALP  
IQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAIERTISKPKGSVRAPQ  
VYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPED  
IYVEWTNNGKTELNYKNTPEVLDSGYSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSV  
VHEGLHNHHTTKSFSRTPGK (配列番号 1 8 )

h C D 3 7 ( A A 1 0 7 - 2 3 5 )

30

LISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI  
LRNGNSEAHRVPCSCYNLSA  
TNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESH  
IYREGCAQGLQ (配列番号 1 9 )

h C D 3 7 ( A A 1 0 7 - 2 4 2 )

LISTQRAQLERSLRDVVEKTIQKYGTNPEETAEEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI  
LRNGNSEAHRVPCSCYNLSA  
TNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHSADICAVPAESH  
IYREGCAQGLQKWLHNNL (配列番号 2 0 )

h C D 3 7 ( A A 1 0 7 - 1 0 9 および 1 3 8 - 2 3 5 )

LISAAEESWDYVQFQLRCCGWHYPQDWFQVLI  
LRNGNSEAHRVPCSCYNLSATNDSTILDKVILPQLSRLGHLARSRHS  
ADICAVPAESH  
IYREGCAQGLQ (配列番号 2 1 )

【 0 1 3 7 】

一部の実施形態では、C D 3 7 結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）はC D 3 7 のアミノ酸 1 0 7 ~ 2 4 2 (配列番号 2 0 ) に結合する。一部の実施形態では、C D 3 7 結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）はC D 3 7 のアミノ酸 1 0 7 ~ 2 3 5 (配列番号 1 9 ) に結合する。

40

【 0 1 3 8 】

一部の実施形態では、C D 3 7 結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、配列番号 1 5 に示す配列に結合する。一部の実施形態では、C D 3 7 結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、配列番号 1 6 に示す配列に結合する。一部の実施形態では、C D 3 7 結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、配列番号 1 7 に示す配列に結合する。

【 0 1 3 9 】

50

一部の実施形態では、CD37結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、CD37のアミノ酸107～242（配列番号20）に結合するが、CD37のアミノ酸138～235に結合しない。一部の実施形態では、CD37結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、CD37のアミノ酸107～235（配列番号19）に結合するが、CD37のアミノ酸138～235に結合しない。

#### 【0140】

一部の実施形態では、CD37結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、配列番号15のポリペプチドに結合するが、配列番号18のポリペプチドに結合しない。一部の実施形態では、CD37結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、配列番号16のポリペプチドに結合するが、配列番号18のポリペプチドに結合しない。一部の実施形態では、CD37結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、配列番号17のポリペプチドに結合するが、配列番号18のポリペプチドに結合しない。

#### 【0141】

一部の実施形態では、CD37結合剤（例えば、抗体またはその抗原結合性断片）は、配列番号1の110～137中の少なくとも1つのアミノ酸を含むエピトープに結合する。アミノ酸110～137は、CD37の大きな細胞外ドメインの第1の区分（「S1」）である。

#### 【0142】

抗原に対する抗体の親和性または結合力は、当技術分野において周知の任意の適切な方法、例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）またはラジオイムノアッセイ（RIA）、または反応速度論（例えばBIACORE（登録商標）分析）を使用して実験的に決定され得る。直接結合アッセイおよび競合結合アッセイ形式が、容易に利用できる。（例えばFundamental Immunology、Paul, W. E.編、Raven Press: New York, N.Y.（1984年）中の、Berzofskyら、「Antibody-Antigen Interactions」；Kuby、Janis Immunology、W. H. FreemanおよびCompany: New York, N.Y.（1992年）；ならびに本明細書に記述される方法を参照のこと）。特定の抗体-抗原相互作用の測定される親和性は、異なる条件（例えば、塩濃度、pH、温度）下で測定される場合、変動し得る。したがって、親和性および他の抗原結合パラメータ（例えば、KDまたは $K_d$ 、 $K_{on}$ 、 $K_{off}$ ）の測定は、抗体および抗原の標準溶液ならびに当技術分野において公知の本明細書に記述される緩衝液など標準化した緩衝液で行われる。

#### 【0143】

一態様において、結合アッセイは、表面にCD37抗原を発現している細胞に対するフローサイトメトリーを使用して実施することができる。例えば、300-19細胞などのCD37陽性細胞を、FACS緩衝液（2%正常ヤギ血清で補充されたRPMI-1640培地）100 $\mu$ L中でサンプル当たり $1 \times 10^5$ 個細胞を使用して様々な濃度の抗CD37抗体とインキュベートすることができる。

#### 【0144】

次いで、細胞を、ペレット化し、洗浄し、FITCコンジュゲートしたヤギ抗マウスまたはヤギ抗ヒトIgG抗体（例えば、Jackson Laboratoryから入手できるものなど、FACS緩衝液中に6 $\mu$ g/mL）100 $\mu$ Lと1時間インキュベートすることができる。細胞を、次いで再ペレット化し、FACS緩衝液で洗浄し、1%ホルムアルデヒドを含有するPBS 200 $\mu$ Lに再懸濁する。サンプルを、例えば、FACS CaliburフローサイトメーターをHTSマルチウエルサンプラーと一緒に使用して取得し、CellQuest Proを使用して分析することができる（全てBD Biosciences、San Diego、US製である）。各サンプルに対して、FL1に対する平均蛍光強度（MFI）を出力し、抗体濃度に対して片対数プロットで描画して、結合曲線を生成することができる。シグモイド用量反応曲線を結合曲線に適合させ、EC50値をGraphPad Prism v4（GraphPad software、San Diego、CA）などのプログラムを初期設定パラメータで使用して算出する。EC50値は、各抗体に対する見かけの解離定数「 $K_d$ 」または「 $K_D$ 」の尺度

10

20

30

40

50

として使用できる。

【0145】

モノクローナル抗体は、KohlerおよびMilstein(1975年)Nature 256巻:495頁に記述されるものなどのハイブリドーマ法を使用して調製することができる。ハイブリドーマ法を使用して、マウス、ハムスターまたは他の適当な宿主動物を免疫して、リンパ球による免疫した抗原に特異的に結合することになる抗体の産生を誘発する。リンパ球は、*in vitro*で免疫することもできる。免疫化後に、リンパ球を単離し、例えば、ポリエチレングリコールを使用して適切な骨髓腫細胞株と融合し、それによってその後融合していないリンパ球および骨髓腫細胞から選択することができるハイブリドーマ細胞を得る。例えば、免疫沈降、免疫プロット法によって、または*in vitro*結合アッセイ(例えば、ラジオイムノアッセイ(RIA);酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA))によって決定される、選択した抗原を特異的対象とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、標準的な方法(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986年)を使用する*in vitro*培養でまたは動物において腹水腫瘍として*in vivo*でその後増殖させることができる。モノクローナル抗体は、培養培地または腹水からその後精製することができる。

10

【0146】

あるいは、モノクローナル抗体は、米国特許第4,816,567号に記載の組換えDNA方法を使用して作製することもできる。モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドは、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを使用するRT-PCRなどにより成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から単離され、それらの配列は、従来通りの手順を使用して決定される。重鎖および軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドは、適切な発現ベクターにその後クローニングされ、そのベクターは、E.coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、さもなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髓腫細胞などの宿主細胞にトランスフェクトされ、モノクローナル抗体が宿主細胞によって生成される。また、所望の種の組換えモノクローナル抗体またはその断片を、記述されている所望の種のCDRを発現しているファージディスプレイライブラリーから単離することができる(McCaffertyら、1990年、Nature、348巻:552~554頁;Clacksonら、1991年、Nature、352巻:624~628頁;およびMarksら、1991年、J. Mol. Biol.、222巻:581~597頁)。

20

30

【0147】

モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを組換えDNA技術を使用していくつかの異なる様式でさらに修飾して、別の抗体を生成することができる。一部の実施形態では、例えば、マウスモノクローナル抗体の軽および重鎖の定常ドメインを、1)例えば、ヒト抗体のその領域と置換してキメラ抗体を生成するまたは2)非免疫グロブリンポリペプチドと置換して融合抗体を生成することができる。一部の実施形態では、定常領域を短縮または除去して、モノクローナル抗体の所望の抗体断片を生成する。可変領域の部位指定または高密度突然変異誘発を使用して、モノクローナル抗体の特異性、親和性などを最適化することができる。

40

【0148】

一部の実施形態では、ヒトCD37に対するモノクローナル抗体は、ヒト化抗体である。ある特定の実施形態では、ヒト化抗体は、表面再構成された抗体(resurfaced antibody)である。

【0149】

ヒト抗体は、当技術分野において公知の様々な技術を使用して直接調製することができる。標的抗原を対象とする抗体を産生する*in vitro*で免疫したまたは免疫した個体から単離した不死化ヒトBリンパ球を生成することができる(例えば、Coleら、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, 77頁(1985年);Boemerら、1991年、J. Immunol.、147巻(1号):86~95頁;および米国特許

50

第5, 750, 373号を参照のこと)。また、例えば、Vaughanら、1996年、Nat. Biotech., 14巻: 309~314頁、Sheetsら、1998年、Proc. Nat'l. Acad. Sci., 95巻: 6157~6162頁、HoogenboomおよびWinter、1991年、J. Mol. Biol., 227巻: 381頁、およびMarksら、1991年、J. Mol. Biol., 222巻: 581頁)に記述されるように、ヒト抗体は、ファージライブラリーから選択することができ、そのファージライブラリーはヒト抗体を発現する。生成の技術および抗体ファージライブラリーの使用については、米国特許第5, 969, 108号、第6, 172, 197号、第5, 885, 793号、第6, 521, 404号;第6, 544, 731号;第6, 555, 313号;第6, 582, 915号;第6, 593, 081号;第6, 300, 064号;第6, 653, 068号;第6, 706, 484号;および第7, 264, 963号;およびRotheら、2007年、J. Mol. Bio., doi:10.1016/j.jmb.2007.12.018にも記述されている(そのそれぞれは、その全体が参照により組み込まれる)。親和性成熟戦略およびチェーンシャッフリング戦略(Marksら、1992年、Bio/Technology 10巻: 779~783頁、その全体が参照により組み込まれる)は当技術分野において公知であり、それを利用して高親和性ヒト抗体を生成することができる。

#### 【0150】

ヒト化抗体は、内在性免疫グロブリン産生がない場合に免疫化に応じてヒト抗体の完全なレパートリーを産生することができるヒト免疫グロブリン座を含有するトランスジェニックマウスにおいて作製することもできる。本手法は、米国特許第5, 545, 807号;第5, 545, 806号;第5, 569, 825号;第5, 625, 126号;第5, 633, 425号;および第5, 661, 016号に記述されている。

#### 【0151】

ある特定の実施形態では、例えば、腫瘍浸透を増大する抗体断片が提供される。抗体断片を産生するための様々な技術が公知である。伝統的に、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解性消化から得られる(例えばMorimotoら、1993年、Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24巻: 107~117頁;Brennanら、1985年、Science、229巻: 81頁)。ある特定の実施形態では、抗体断片は組換えにより作製される。Fab、FvおよびscFv抗体断片は全て、E.coliまたは他の宿主細胞中で発現させ、そこから分泌させることができ、したがって、これらの断片の大量産生が可能になる。そのような抗体断片を、上述の抗体ファージライブラリーから単離することもできる。抗体断片は、米国特許第5, 641, 870号に記載の通り直鎖状抗体であることもでき、例えば、単一特異的または二重特異的であることができる。抗体断片を産生するための他の技術は、熟練した技術者には明らかであろう。

#### 【0152】

本発明によると、技術を、CD37に特異的な一本鎖抗体の産生に適合させることができる(米国特許第4, 946, 778号を参照のこと)。加えて、本方法を、Fab発現ライブラリーの構築(Huseら、Science 246巻: 1275~1281頁(1989年))に適合させて、CD37に対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片、もしくは誘導体、断片、アナログまたはそのホモログの迅速で、有効な同定を可能にすることができる。(a)抗体分子のペプシン消化によって作製されるF(ab')<sub>2</sub>断片;(b)F(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することによって生成されるFab断片、(c)パインおよび還元剤による抗体分子の処理によって生成されるFab断片、(d)Fv断片を含むがそれだけには限らない抗体断片は、当技術分野における技術によって作製することができる。

#### 【0153】

本開示の目的の場合、修飾抗体は、抗体の、ヒトCD37のポリペプチドとの会合を提供する任意の型の可変領域を含み得ると理解されるべきである。この点で、可変領域は、任意の型の哺乳動物を含むまたはそれから得ることができる。したがって、修飾抗体の可変領域は、例えば、ヒト、マウス、非ヒト霊長類(例えばカニクイザル、マカクなど)またはルピナス起源であることができる。一部の実施形態では、修飾免疫グロブリンの可変

10

20

30

40

50

および定常領域の両方が、ヒトである。他の実施形態では、適合する抗体の可変領域（通常、非ヒト供給源から得られる）を操作または特別に調整して、分子の結合特性を改善することができる。この点で、本発明において有用な可変領域を、ヒト化する、さもなければ取り込んだアミノ酸配列を含めることによって改変することができる。一部の実施形態では、修飾抗体の可変領域は、非ヒト（例えば、マウス）であることができ、修飾抗体の定常領域は、ヒトであることができる。

【0154】

ある特定の実施形態では、重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインは、1つまたは複数のCDRの少なくとも部分的な置き換えによって、必要に応じてフレームワーク領域の部分的な置き換えおよび配列変化によって改変される。CDRは、フレームワーク領域が得られる抗体と同じクラスまたはさらにサブクラスの抗体から得ることができるが、CDRは、異なるクラスの抗体、おそらく異なる種由来の抗体から得ることになると想定される。必ずしも全てのCDRをドナー可変領域からの完全なCDRと置き換えて、一方の可変ドメインの抗原結合能を他方へ移す必要はない。むしろ、一部の場において、抗原結合部位の活性を維持するのに必要な残基を移すだけでよい。

【0155】

可変領域の変更にもかかわらず、当業者は、本発明の修飾抗体が、所望の生化学的特性を得るために1つまたは複数の定常領域ドメインの少なくとも一部分が削除、さもなければ改変されている抗体（例えば、全長抗体またはその免疫反応性断片）を含み得ると認識しているはずである。一部の実施形態では、修飾抗体の定常領域は、ヒト定常領域を含むことになる。定常領域に対する修飾は、1つまたは複数のドメインにおける1つまたは複数のアミノ酸の追加、欠失もしくは置換を含むことができる。すなわち、本明細書に開示される修飾抗体は、3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2またはCH3）の1つもしくは複数および/または軽鎖定常ドメイン（CL）に変更もしくは修飾を含むことができる。一部の実施形態では、1つまたは複数のドメインが、部分的または全体に削除されている修飾された定常領域が企図される。一部の実施形態では、修飾抗体は、ドメイン削除された構築物またはバリエーションを含むことになり、CH2ドメイン全体が除去されている（CH2構築物）。一部の実施形態では、省かれた定常領域ドメインは、通常はなくなった定常領域によって付与される分子柔軟性をいくらか与える短いアミノ酸スペーサー（例えば10残基）によって置き換えられることになる。

【0156】

ある特定の実施形態では、定常領域の修飾を使用して、ジスルフィド連結もしくはオリゴ糖部分を排除することができ、抗原特異性または抗体柔軟性の増大により局在性の向上が可能になる。定常領域に対する修飾は、十分に当業者の範囲にある周知の生化学または分子操作技術を使用して容易に作製することができる。

【0157】

ある特定の実施形態では、修飾抗体を操作して、それぞれの修飾抗体のヒンジ領域にCH3ドメインを直接融合させ得ることに留意されたい。他の構築物において、ヒンジ領域と修飾CH2および/またはCH3ドメインの間にペプチドスペーサーを提供することが望ましい場合がある。例えば、適合する構築物を発現させることもでき、CH2ドメインを削除し、残ったCH3ドメイン（修飾されているまたは無修飾）を、5～20アミノ酸のスペーサーでヒンジ領域に接続する。例えば、そのようなスペーサーを付加して、定常ドメインの調節エレメントが自由に接近可能なままであること、またはヒンジ領域が柔軟なままであることを確実にすることができる。

【0158】

本開示は、本明細書に示すマウス、キメラ、ヒト化、ヒト抗体またはその抗体断片に実質的に相同であるバリエーションおよび同等物をさらに包含する。これらは、例えば、保存的置換突然変異、すなわち類似のアミノ酸による1つまたは複数のアミノ酸の置換を含有することができる。例えば、保存的置換とは、例えば1つの酸性アミノ酸の別の酸性アミノ酸による、1つの塩基性アミノ酸の別の塩基性アミノ酸によるまたは1つの中性アミノ酸

10

20

30

40

50

の別の中性アミノ酸によるなど、あるアミノ酸の同じ一般クラスの別のアミノ酸による置換のことを指す。保存的アミノ酸置換によって意図されることは、当技術分野において周知である。

【0159】

本開示のポリペプチドは、ヒトCD37に対する抗体もしくはその断片を含む組換えポリペプチド、天然のポリペプチドまたは合成ポリペプチドであることができる。本発明のいくつかのアミノ酸配列が、タンパク質の構造または機能に著しい効果なしに変動され得ることは、当技術分野において認識されることになる。したがって、本発明は、実質的な活性を示す、またはCD37タンパク質に対する抗体もしくはその断片の領域を含むポリペプチドの変形をさらに含む。そのような変異体には、欠失、挿入、逆位、反復および型置換がある。

10

【0160】

本明細書に記述される単離されたポリペプチドは、当技術分野において公知の任意の適切な方法によって作製することができる。そのような方法は、タンパク質直接合成方法から単離されたポリペプチド配列をコードするDNA配列を構築し、適切な形質転換された宿主においてその配列を発現させることまで多岐にわたる。一部の実施形態では、DNA配列は、目的の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することによる組換え技術を使用して構築される。任意選択で、配列を部位特異的突然変異誘発によって突然変異させて、その機能的アナログを提供することができる。例えば、Zoellerら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81巻：5662～5066頁（1984年）および米国特許第4,588,585号を参照のこと。

20

【0161】

一部の実施形態では、目的のポリペプチドをコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチド合成装置を使用して化学合成によって構築されることになる。そのようなオリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づき、目的の組換えポリペプチドが産生されることになる宿主細胞において有利に働くコドンを選択して設計することができる。標準的な方法を適用して、目的の単離されたポリペプチドをコードする単離されたポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を使用して、逆翻訳された遺伝子を構築することができる。さらに、特定の単離されたポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有するDNAオリゴマーを、合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの部分をコードするいくつかの小さいオリゴヌクレオチドを合成し、その後ライゲートすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、相補的組立てのための5'または3'突出を一般に含有する。

30

【0162】

組立てられたら（合成、部位指定突然変異誘発または別の方法による）、目的の特定の単離されたポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、発現ベクターへと挿入され、所望の宿主におけるタンパク質の発現に適切な発現制御配列に作動的に連結されることになる。適当な組立ては、ヌクレオチド配列決定、制限酵素マッピングおよび適切な宿主における生物活性ポリペプチドの発現によって確認することができる。当技術分野において周知の通り、宿主においてトランスフェクトされた遺伝子の高い発現レベルを得るには、遺伝子は、選択された発現宿主において機能的である転写および翻訳発現制御配列に作動的に連結されなければならない。

40

【0163】

ある特定の実施形態では、組換え発現ベクターを使用して、ヒトCD37に対する抗体またはその断片をコードするDNAを増幅し、発現させる。組換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫遺伝子から得られる適切な転写もしくは翻訳調節エレメントに作動的に連結されており、抗CD37抗体またはその断片のポリペプチド鎖をコードする合成もしくはcDNA由来のDNA断片を有する複製可能なDNA構築物である。転写単位は、（1）遺伝的エレメントもしくは遺伝子発現において調節性の役割を有するエレメント、例えば、転写プロモーターまたはエンハンサー、（2）mRNAに転写さ

50

れ、タンパク質に翻訳される構造またはコード配列、(3)以下に詳細に記載される適切な転写および翻訳開始ならびに終結配列の組立てを一般に含む。そのような調節エレメントは、転写を制御するためのオペレーター配列を含むことができる。宿主内で複製する能力は、通常複製起点によってもたらされ、形質転換体の認識を容易にする選択遺伝子を追加で組み込むことができる。それらが互いに機能的に関係する場合、DNA領域は作動的に連結されている。例えば、ポリペプチドの分泌に關与する前駆体として発現される場合、シグナルペプチド(分泌リーダー)のためのDNAが、ポリペプチドのDNAに作動的に連結され;配列の転写を制御する場合、プロモーターが、コード配列に作動的に連結され;または翻訳できるように配置される場合、リボゾーム結合部位がコード配列に作動的に連結される。酵母発現系に使用するために意図される構造エレメントには、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列がある。あるいは、組換えタンパク質が、リーダーまたは輸送配列なしに発現される場合、N末端メチオニン残基を含むことができる。その後この残基を、発現された組換えタンパク質から任意選択で切断して、最終産物を得ることができる。

#### 【0164】

発現制御配列および発現ベクターの選択は、宿主の選択によって決まることになる。様々な発現宿主/ベクターの組合せを、利用することができる。真核生物宿主に有用な発現ベクターには、例えば、SV40、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルスおよびサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターがある。細菌宿主に有用な発現ベクターには、pCR1、pBR322、pMB9およびその誘導体を含めた*Escherichia coli*由来プラスミドなど、公知の細菌プラスミド、M13および線状一本鎖DNAファージなど、より広宿主域のプラスミドがある。

#### 【0165】

適当なプロモーターの制御下でCD37結合性ポリペプチドまたは抗体(または、抗原として使用するCD37タンパク質)の発現用として適切な宿主細胞には、原核生物、酵母、昆虫またはより高等な真核細胞がある。原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性生物、例えば*E. coli*または桿菌がある。より高等な真核細胞には、下記の哺乳動物起源の樹立細胞株がある。無細胞翻訳系を利用する可能性もある。細菌、真菌、酵母ならびに哺乳動物の細胞宿主で使用するための適当なクローニングおよび発現ベクターは、Po uwelsら(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985年)に記述されており、関連する開示は参照によりここで本明細書に組み込まれる。抗体産生を含めたタンパク質産生の方法に関する追加の情報は、例えば、米国特許出願公開第2008/0187954号、米国特許第6,413,746号および第6,660,501号ならびに国際特許出願公開WO 04009823号に見出すことができ、そのそれぞれは、その全体が参照によりここで本明細書に組み込まれる。

#### 【0166】

様々な哺乳動物または昆虫細胞培養系も、組換えタンパク質を発現するために有利に利用される。そのようなタンパク質は、一般に正しくフォールドされ、適切に修飾され、完全に機能的なので、哺乳動物細胞において組換えタンパク質の発現を実施することができる。適切な哺乳動物宿主細胞株の例には、Gluzman(Cell 23巻:175頁,1981年)によって記述されているサル腎臓細胞のCOS-7株、ならびに例えば、L細胞、C127、3T3、チャニーズハムスター卵巣(CHO)、HeLaおよびBHK細胞株を含め、適当なベクターを発現することができる他の細胞株がある。哺乳動物の発現ベクターは、複製起点、発現しようとする遺伝子に連結された適切なプロモーターおよびエンハンサーなどの非転写エレメント、および他の5'または3'隣接非転写配列、ならびに必要なリボゾーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナーおよびアクセプター部位および転写終結配列などの5'または3'非翻訳配列を含むことができる。昆虫細胞における異種タンパク質産生のためのバキュロウイルス系は、LuckowおよびSummers、Bio/Technology 6巻:47頁(1988年)に概説されている。

#### 【0167】

形質転換された宿主によって産生されるタンパク質は、任意の適切な方法によって精製され得る。そのような標準的な方法には、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性およびサイズカラムクロマトグラフィー）、遠心分離、分別溶解があり、またはタンパク質精製のための他の任意の標準的な技術による。タンパク質にヘキサヒスチジン、マルチース結合ドメイン、インフルエンザコート配列およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどの親和性タグを付けて、適当な親和性カラムを通すことによって簡単に精製できるようにすることができる。単離されたタンパク質は、タンパク質分解、核磁気共鳴およびX線結晶学などの技術を使用して物理的に特徴付けることもできる。

#### 【0168】

例えば、培養培地に組換えタンパク質を分泌する系からの上清は、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、AmiconまたはMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して初めに濃縮することができる。濃縮ステップ後、濃縮物を、適切な精製マトリックスに適用することができる。あるいは、陰イオン交換樹脂、例えば、ペンダントジエチルアミノエチル（DEAE）基を有するマトリックスまたは基質を利用することができる。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロースまたはタンパク質精製において一般的に利用される他の型であることができる。あるいは、陽イオン交換ステップを利用することができる。適切な陽イオン交換体には、スルホプロピルまたはカルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスがある。最終的に、疎水性RP-HPLC媒体、例えば、ペンダントメチルまたは他の脂肪族基を有するシリカゲルを利用する1つまたは複数の逆相高速液体クロマトグラフィー（RP-HPLC）ステップを利用して、CD37結合剤をさらに精製することができる。前述の精製ステップのいくつかまたは全てを様々な組合せで利用して、均質な組換えタンパク質を得ることもできる。

#### 【0169】

細菌培養において産生された組換えタンパク質は、例えば、細胞ペレットからの最初の抽出に続き、1回または複数回の濃縮、塩析、水溶性イオン交換またはサイズ排除クロマトグラフィーステップによって単離することができる。高速液体クロマトグラフィー（HPLC）を、最終精製ステップに利用することができる。組換えタンパク質の発現に利用される微生物細胞は、凍結融解サイクル、超音波処理、機械的破碎または細胞溶解剤の使用を含めた任意の簡便な方法によって破壊することができる。

#### 【0170】

抗体および他のタンパク質を精製するための当技術分野において公知の方法には、例えば、米国特許出願公開第2008/0312425号、第2008/0177048号および第2009/0187005号に記述されているものもあり、そのそれぞれは、その全体が参照によりここで本明細書に組み込まれる。

### III. ポリヌクレオチド

#### 【0171】

ある特定の実施形態では、本発明は、CD37に特異的に結合するポリペプチドまたはかかるポリペプチドの断片をコードするポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドを包含する。例えば、本発明は、ヒトCD37に対する抗体をコードするか、またはかかる抗体の断片をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本発明のポリヌクレオチドは、RNAの形態で、またはDNAの形態であってもよい。DNAは、cDNA、ゲノムDNA、および合成DNAを含み、二本鎖または一本鎖であってもよく、一本鎖である場合、コード鎖または非コード（アンチセンス）鎖であってもよい。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドは、cDNA、または1つもしくは複数の内在性イントロンを欠くDNAである。

#### 【0172】

ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、天然に存在しない。ある特定の実施形態では、本明細書で提供されるポリヌクレオチドは、組換えにより作製される。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、単離される。ある特定の实

10

20

30

40

50



施形態では、ポリヌクレオチドは、実質的に純粋である。

【0173】

本開示は、配列番号3～11からなる群から選択される配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを提供する。

【0174】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号3～5のポリペプチドをコードする配列を含む。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号6～8のポリペプチドをコードする配列を含む。ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、配列番号3～5および配列番号6～8のポリペプチドをコードする配列を含む。ある特定の実施形態では、ベクターは、配列番号3～8のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、組成物は、配列番号3～5のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および配列番号6～8のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、組成物は、配列番号3～5のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、および配列番号6～8のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む。

10

【0175】

ある特定の実施形態では、組成物は、配列番号9のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および配列番号10のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。ある特定の実施形態では、組成物は、配列番号9のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクター、および配列番号10のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを含む。ある特定の実施形態では、ベクターは、配列番号9のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド、および配列番号10のポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

20

【0176】

本開示はさらに、配列番号13および14で示される配列から選択される配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

m u C D 3 7 - 1 B 1 1 - 2 V H 核酸配列

gagggtcaactgctgcagctctggacctgagctgggtgaagcctggggccttcagtgagatatacctgcaaggcttctggttactcatctactggctactttatgaactgggtgatacagagccatggaaagggccttgagtggtggacgtattaatccttacaatgggtgataccttctacaaccagaagtccaaggccaagccacattgactgtagacaaaatcctctaccacagcccacatggagctcctgagcctgacatctgaggactctgccgtctatattgtggatcccgggggatagtggttctcttaggtcttcgatgtctggggcgaggacctcggtcatcgtctcctcagccaaaacgacac (配列番号13)

30

m u C D 3 7 - 1 B 1 1 - 2 V L 核酸配列

agtatgtgatgaccagactcccaaatcctgcttgtatcagcaggagacagggttaccataacctgcaaggccagtcagggtgtgagtaatgatgtagattggtaccaacagaagccagggcagctctcctaaactgctgatatactatgcatccaatcgtacactggagtcctgatcgcttactggcagtggtatgggacggatttctactttcagcatcagcactgtgcaggctgaagacctggcagtttatttctgtcaccaggattataccttccgacgttcggtggaggcaccaggctggaaatcaaaggctgat (配列番号14)

【0177】

また、配列番号13および14のいずれか1つに対する少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、または少なくとも約99%の配列同一性を有するポリヌクレオチドが提供される。

40

【0178】

また、配列番号13に対して少なくとも約90%同一であるポリヌクレオチド、および配列番号14に対して少なくとも約90%同一であるポリヌクレオチドを含む、組成物が提供される。また、配列番号13に対して少なくとも約95%同一であるポリヌクレオチド、および配列番号14に対して少なくとも約95%同一であるポリヌクレオチドを含む、組成物が提供される。また、配列番号13に対して少なくとも約96%同一であるポリヌクレオチド、および配列番号14に対して少なくとも約96%同一であるポリヌクレオチドを含む、組成物が提供される。また、配列番号13に対して少なくとも約97%同一

50

であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 97% 同一であるポリヌクレオチドを含む、組成物が提供される。また、配列番号 13 に対して少なくとも約 98% 同一であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 98% 同一であるポリヌクレオチドを含む、組成物が提供される。また、配列番号 13 に対して少なくとも約 99% 同一であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 99% 同一であるポリヌクレオチドを含む、組成物が提供される。

【0179】

また、配列番号 13 に対して少なくとも約 90% 同一であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 90% 同一であるポリヌクレオチドを含むベクター（複数化）を含む組成物が提供される。また、配列番号 13 に対して少なくとも約 95% 同一であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 95% 同一であるポリヌクレオチドを含むベクター（複数化）を含む組成物が提供される。また、配列番号 13 に対して少なくとも約 96% 同一であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 96% 同一であるポリヌクレオチドを含むベクター（複数化）を含む組成物が提供される。また、配列番号 13 に対して少なくとも約 97% 同一であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 97% 同一であるポリヌクレオチドを含むベクター（複数化）を含む組成物が提供される。また、配列番号 13 に対して少なくとも約 98% 同一であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 98% 同一であるポリヌクレオチドを含むベクター（複数化）を含む組成物が提供される。また、配列番号 13 に対して少なくとも約 99% 同一であるポリヌクレオチド、および配列番号 14 に対して少なくとも約 99% 同一であるポリヌクレオチドを含むベクター（複数化）を含む組成物が提供される。

【0180】

また、配列番号 13 で示されるポリヌクレオチド配列、および配列番号 14 で示されるポリヌクレオチド配列を含むベクター（複数化）を含む組成物が提供される。

【0181】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞からのポリペプチドの発現および分泌を補助するポリヌクレオチド（例えば細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列）に、同じリーディングフレームで融合させた成熟ポリペプチドのコード配列を含む。リーダー配列を有するポリペプチドは、前タンパク質であり、宿主細胞によりリーダー配列を切断されてポリペプチドの成熟形態を形成し得る。また、ポリヌクレオチドは、成熟タンパク質および追加の 5' アミノ酸残基であるプロタンパク質をコードし得る。プロ配列を有する成熟タンパク質は、プロタンパク質であり、タンパク質の不活性形態である。プロ配列が切断されると、活性成熟タンパク質が残る。

【0182】

ある特定の実施形態では、ポリヌクレオチドは、例えばコードされるポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列に、同じリーディングフレームで融合させた成熟ポリペプチドのコード配列を含む。例えば、細菌宿主の場合には、マーカー配列は、マーカーに融合させた成熟ポリペプチドの精製を提供するための pQE-9 ベクターにより供給されるヘキサ-ヒスチジンタグであってもよいが、または哺乳動物宿主（例えば COS-7 細胞）が使用される場合、マーカー配列は、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するヘマグルチニン（HA）タグであってもよい。

【0183】

本開示はさらに、例えば断片、アナログ、および誘導体をコードする、本明細書で上に説明するポリヌクレオチドのバリエーションに関する。

【0184】

ポリヌクレオチドバリエーションは、コード領域、非コード領域、または両方における変化を含有し得る。一部の実施形態では、ポリヌクレオチドバリエーションは、サイレント置換、付加、または欠失を生成する変化を含有するが、コードされるポリペプチドの特性または

10

20

30

40

50

活性を変化させない。一部の実施形態では、ヌクレオチドバリエーションは、遺伝コードの縮重のためのサイレント置換により作製される。ポリヌクレオチドバリエーションは、様々な理由のために、例えば特定の宿主についてコドン発現を最適化する（ヒト mRNA のコドン細菌宿主、例えば *E. coli* にとって好ましいコドンに変える）ために作製される。

【0185】

また、本明細書で説明するポリヌクレオチドを含むベクターおよび細胞が提供される。  
IV. 生体サンプル

【0186】

生体サンプルは多くの場合、固定液で固定される。アルデヒド固定液、例えばホルマリン（ホルムアルデヒド）およびグルタルアルデヒドが典型的に使用される。また、他の固定技術、例えばアルコール浸漬（Battifora および Kopinski, J. Histochem. Cytochem. (1986年) 34巻: 1095頁）を使用して固定した組織サンプルは好適である。また、使用されるサンプルは、パラフィンに包埋され得る。一部の実施形態では、サンプルは、ホルマリン固定、かつパラフィン包埋される（FFPE）。別の実施形態では、FFPEブロックは、FFPEコアサンプルのための特定のエリア（複数可）を選択するために、分析のための1つまたは複数の部分を選択する前にヘマトキシリンおよびエオシン染色される。これらの微粒子標本から組織ブロックを調製する方法は、以前の様々な予後因子のIHC研究で使用されており、および/または当業者に周知である（例えばAbbondanzoら、Am J Clin Pathol., 1990年5月、93巻（5号）: 698~702頁; AlIredら、Arch Surg., 1990年1月、125巻（1号）: 107~113頁を参照のこと）。

【0187】

簡潔に説明すると、任意のインタクトな器官または組織を、かなり小さい片に切断し、様々な固定液（例えばホルマリン、アルコールなど）中で、組織が「固定」されるまで様々な期間インキュベートしてもよい。サンプルは、身体から外科的に除去された事実上任意のインタクトな組織であり得る。サンプルを、病理組織学検査室で日常的に使用される設備に適合する適度に小さい片（複数可）に切断してもよい。切断された片のサイズは典型的に、数ミリメートル~数センチメートルの範囲である。また、生体サンプルは、体液抽出物、血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、およびまたは脾臓調製物であってもよい。

V. CD37発現および治療的有効性の相関

【0188】

抗CD37イムノコンジュゲートは、その全体が参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2011/0256153号で提供される。ある特定の実施形態では、抗CD37イムノコンジュゲートは、IMGN529である。IMGN529は、huCD37-3抗体（配列番号22~27により表されるCDR、配列番号28のVH、および配列番号29のVLを含む）、SMCCリンカー、およびDM1マイタンシノイドを含有する。huCD37-3抗体の配列を、以下に示す。

huCD37-3 VH-CDR1: TSGVS (配列番号22)

huCD37-3 VH-CDR2: VIWGDGSTN (配列番号23)

huCD37-3 VH-CDR3: GGYSLAH (配列番号24)

huCD37-3 VL-CDR1: RASENIRSNLA (配列番号25)

huCD37-3 VL-CDR2: VATNLAD (配列番号26)

huCD37-3 VL-CDR3: QHYWGTTWT (配列番号27)

huCD37-3 VH v.1.0:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVGSWVRQPPGKLEWLGVIWGDGSTNYHPSLKSRLSIKKDHKSQVFL  
KLNSLTAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSS (配列番号28)

huCD37-3 VH v.1.1:

QVQVQESGPGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVGSWVRQPPGKLEWLGVIWGDGSTNYHSSLKSRLSIKKDHKSQVFL

10

20

30

40

50

KLNSLTAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSS ( 配列番号 3 2 )

h u C D 3 7 - 3 V L :

DIQMTQSPSSLSVSVGERVTITCRASENIRSNLAWYQQKPGKSPKLLVNVATNLADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSLQPEDFGTYYCQHYWGTTWTFGQGTKLEIKR ( 配列番号 2 9 )

h u C D 3 7 - 3 重鎖 ( H C ) v . 1 . 0 :

QVQVQESGPGGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHPSLKSRLSIKKDHKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG ( 配列番号 3 0 )

10

h u C D 3 7 - 3 重鎖 ( H C ) v . 1 . 1 :

QVQVQESGPGGLVAPSQTLSITCTVSGFSLTTSVSWVRQPPGKGLEWLGVIWGDGSTNYHSSLKSRLSIKKDHKSQVFLKLNSLTAADTATYYCAKGGYSLAHWGQGLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVGHVTFPAVLQSSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG ( 配列番号 3 3 )

h u C D 3 7 - 3 軽鎖 ( L C ) :

DIQMTQSPSSLSVSVGERVTITCRASENIRSNLAWYQQKPGKSPKLLVNVATNLADGVPSRFSGSGSGTDYSLKINSLQPEDFGTYYCQHYWGTTWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC ( 配列番号 3 1 )

20

【 0 1 8 9 】

ある特定の実施形態では、イムノコンジュゲートは、2010年2月18日に10801 University Boulevard、Manassas、Virginia 20110のAmerican Type Culture Collection (ATCC)に寄託されたATCC寄託名PTA-10664のハイブリドーマから作製したCD37抗体、またはその抗原結合性断片を含有し得る。ある特定の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、PTA-10664のハイブリドーマから作製した抗体のVH-CDRおよびVL-CDRを含む。

30

【 0 1 9 0 】

IMG529は現在、白血病およびリンパ腫を処置するために臨床開発中である。IMG529を投与する方法は、それぞれが参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願第14/710,354号(公開番号第2015/0343077号)、およびStathisら、「Preliminary Findings from a phase I, multi-center, open-label study of the anti-CD37 antibody-drug conjugate (ADC), IMG529, in adult patients with relapsed or refractory non-Hodgkin Lymphoma (NHL)」、要約番号8526、ASCO Annual Meeting (2014年)で提供される。

【 0 1 9 1 】

ある特定の実施形態では、本開示は、特に、例えばIHCにおいて、あるダイナミックレンジのCD37発現レベルを検出することができる本明細書で提供される抗体およびその抗原結合性断片を使用して、対象におけるCD37の発現レベルの上昇のためにCD37標的治療に有利に応答する可能性が高い対象を同定するための方法を提供する。

40

【 0 1 9 2 】

患者サンプルの評価および異種移植片モデルを使用したin vivo有効性に対する相関は、処置に対してより応答する可能性が高い対象を選択するための発現分析力を示す。IHCは、腫瘍細胞上のCD37発現についてのスコア：0(発現なし)~3(非常に高レベルの発現)を提供する。CD37発現について1、2、または3(または2もしくは3)のスコアを有するサンプルは、CD37イムノコンジュゲートの臨床的に意味がある用量においてCD37標的抗がん治療に応答する高い可能性を有する(例えば、参照に

50

より本明細書に組み込まれるWO 2013/149171を参照のこと)。したがって、CD37スコアの上昇を有する個体の同定は、臨床的に意味がある投与量に应答し得る個体を同定することを補助し得る。さらに、CD37のより均一なレベルの発現は、治療的利益とのより優れた相関を提供する。したがって、均質な染色均一性、または染色の増大と不均質な染色均一性との組合せは、CD37発現の増大を示し得る。例えば、2を超えるヘテロのスコアは、CD37治療剤での処置の患者選択基準として使用することができる。加えて、患者選択基準は、染色強度(例えば1、2、または3)および均一性(例えば不均質または均質(表3を参照のこと))の両方を反映する特定のレベルで膜CD37を発現することが見られる、サンプル中の細胞のパーセンテージに基づいてもよい。例えば、サンプルは、例えば細胞の少なくとも25%が少なくとも2もしくはそれより強くCD37陽性染色されること、または細胞の少なくとも75%が2もしくはそれより強くCD37陽性染色されることとして特徴付けられ得る。別の例では、サンプルは、例えば細胞の少なくとも25%が少なくとも3のCD37陽性染色されること、または細胞の少なくとも75%が3でCD37陽性染色されることとして特徴付けられ得る。別の例では、CD37発現は、Hスコアを与えられる。加えて、CD37の免疫学的検出(免疫組織化学による)は、Hスコアを使用してスコア化することができる。Hスコアは、本明細書で提供される計算を使用して、染色強度スコアを均一性スコアと組み合わせる。以下により詳細に説明するように、Hスコアは、1~300の範囲であり得る。

#### 【0193】

また、CD37発現分析は、低レベルのCD37標的抗がん治療(「低用量治療」)が、抗腫瘍応答をもたらすのに有効であり得る患者を同定するために使用することができる。当技術分野で理解されているように、化合物は一般的に、所望の治療応答を達成する最も少ない投与量で投与される。これは具体的には、臨床的な、および多くの場合所望されない副作用を引き起こす治療薬にとって重要である。CD37発現レベルの上昇を有する対象を認識する能力は、CD37標的治療薬の投与量の潜在的な最小化を可能にし、したがって副作用の可能性を減少させ、一方で治療的有効性を維持する。

#### VI. 免疫検出法

##### 【0194】

ある特定の実施形態では、CD37結合剤(例えば抗体およびその抗原結合性断片)を、免疫検出法で使用して、CD37の発現増大または過剰発現を有する、サンプルおよび/または対象を同定することができる。免疫検出法は、いくつかを挙げると、例えば免疫組織化学(IHC)、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー、および蛍光活性化セルソーティング(FACS)がある。

##### 【0195】

一般的には、免疫検出法は、CD37を含む疑いがあるサンプルを得ることと、サンプルを免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で第1のCD37結合剤(例えば抗CD37抗体またはその抗原結合性断片)と接触させることとを含む。

##### 【0196】

抗原検出の点で、分析される生体サンプルは、CD37を検出することが望ましい任意のサンプル、例えば体液抽出物、血液、血漿、血清、脊髄液、リンパ液、組織切片もしくは標本、ホモジナイズした組織抽出物、生検吸引液、細胞、分離および/もしくは精製形態のCD37含有組成物、または任意の生体体液であってもよい。一部の実施形態では、血液、血漿、もしくはリンパサンプル、または抽出物が使用される。

##### 【0197】

選択された生体サンプルを、免疫複合体(一次免疫複合体)の形成を可能にするのに有効な条件下で、および十分な期間、CD37結合剤(例えば抗CD37抗体またはその抗原結合性断片)と接触させることは一般的に、CD37結合剤(例えば抗CD37抗体またはその抗原結合性断片)をサンプルに添加すること、およびCD37結合剤(例えば抗CD37抗体またはその抗原結合性断片)が、存在する任意のCD37と免疫複合体を形成する、すなわち、これに結合するのに十分長い期間、混合物をインキュベートすること

10

20

30

40

50

の問題である。この時間後、サンプル、例えば組織切片もしくは体液抽出物、E L I S A プレート、またはウェスタンブロットを一般的に洗浄して、任意の非特異的に結合した C D 3 7 結合剤（例えば抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片）を除去し、一次免疫複合体内に特異的に結合した C D 3 7 結合剤（例えば抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片）のみが検出されることを可能にする。

#### 【 0 1 9 8 】

一般的に、免疫複合体形成の検出は、当技術分野で周知であり、多くのアプローチの適用を通して達成することができる。検出において用いる C D 3 7 結合剤（例えば C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片）は、それ自体、検出可能な標識に連結してもよく、次いで、この標識を単に検出し、これにより組成物中の一次免疫複合体の量が決定されることを可能にする。あるいは、一次免疫複合体内に結合する第 1 の C D 3 7 結合剤（例えば抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片）は、第 1 の C D 3 7 結合剤（例えば抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片）に対する結合親和性を有する第 2 の結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）の手段により検出することができる。これらの場合、第 2 の結合剤は、検出可能な標識に連結してもよい。第 2 の結合剤がそれ自体、抗体またはその抗原結合性断片である場合、「二次」抗体またはその抗原結合性断片と呼ぶことができる。一次免疫複合体を、二次免疫複合体の形成を可能にするのに有効な条件下で、および十分な期間、標識二次結合剤と接触させる。次いで、一般的に、二次免疫複合体を洗浄して、任意の非特異的に結合した標識二次結合剤を除去し、次いで、二次免疫複合体に残った標識を検出する。

#### 【 0 1 9 9 】

さらなる方法は、2 ステップアプローチによる一次免疫複合体の検出を含む。本明細書で説明するように、第 1 の C D 3 7 結合剤（例えば抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片）に対する結合親和性を有する第 2 の結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）を使用して、二次免疫複合体を形成する。洗浄後、二次免疫複合体を、ここでもまた、免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能にするのに有効な条件下で、および十分な期間、第 2 の結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）に対する結合親和性を有する第 3 の結合剤と接触させる。第 3 の結合剤を、検出可能な標識に連結し、このようにして形成した三次免疫複合体の検出を可能にする。このシステムは、シグナル増幅が所望される場合、これを提供し得る。

#### 【 0 2 0 0 】

別の実施形態では、ビオチン化 C D 3 7 結合剤（例えば抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片）を使用して C D 3 7 を検出し、次いで、第 2 の結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）を使用してビオチンを検出する。この方法では、試験するサンプルを、最初にビオチン化 C D 3 7 結合剤（例えば抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片）を含む溶液中でインキュベートする。C D 3 7 が存在する場合、結合剤の一部は、C D 3 7 に結合して、ビオチン化 C D 3 7 結合剤 - C D 3 7 複合体を形成する。次いで、複合体を、ストレプトアビジン（またはアビジン）、ビオチン化 D N A、および / または相補的ビオチン化 D N A の連続溶液中でのインキュベーションにより、各ステップが抗体 / 抗原複合体に追加のビオチン部位を付加して、増幅する。好適なレベルの増幅が達成されるまで、増幅ステップを繰り返し、この時点でサンプルを、ビオチンに結合する第 2 の結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）を含む溶液中でインキュベートする。この第 2 の結合剤を、例えば色素原基質を使用する組織酵素学により抗体 / 抗原複合体の存在を検出するために使用され得る酵素で、標識する。好適な増幅により、肉眼で見えるコンジュゲートを作製することができる。

#### 【 0 2 0 1 】

一部の実施形態では、免疫組織化学（I H C）を、免疫学的検出のために使用する。I H C を使用して、サンプル中の C D 3 7 の検出を、サンプルをプローブ、例えば抗 C D 3 7 抗体またはその抗原結合性断片で標的化することにより達成することができる。プローブは、検出可能な標識に直接的もしくは間接的に連結することができるか、または検出可

10

20

30

40

50

能な標識に直接的もしくは間接的に連結される別のプローブにより検出することができる。

【0202】

一部の実施形態では、IHC、例えば較正されたIHCは、タンパク質発現の異なるレベルを区別することができる。一部の実施形態では、IHCは、低CD37、中CD37、または高CD37発現を有するサンプルの染色強度を区別することができる。

【0203】

一実施形態では、CD37の免疫学的検出（免疫組織化学による）は、強度および均一性の両方についてスコア化される（染色された細胞 - 膜のみのパーセント）。強度についてのCD37発現の比較スケールは、0 - 陰性、0 ~ 1 - 非常に弱い、1 - 弱い、1 ~ 2 - 弱い ~ 中程度、2 - 中程度、2 ~ 3 - 中程度 ~ 強い、3 - 強い ~ 非常に強い、のように相関する。定量的に、スコア0は、染色が観察されないか、または膜染色が腫瘍細胞の10%未満でしか観察されないことを表す。スコア1または1+は、かすかな/わずかな感知できる膜染色が腫瘍細胞の10%を超えて検出されることを表す。細胞は、それらの膜部分で染色されているのみである。スコア1および1+は、相互変換可能に使用される。スコア2については、弱い ~ 中程度の完全な膜染色が、腫瘍細胞の10%を超えて観察される。最後に、スコア3は、中程度 ~ 強い完全な膜染色が、腫瘍細胞の10%を超えて観察されることを表す。CD37発現について0または1のスコアを有するサンプルは、CD37発現の上昇を有しないとして特徴付けられ得、一方で、2または3のスコアを有するサンプルは、過剰発現しているか、またはCD37の上昇を有するとして特徴付けられ得る。別の実施形態では、本明細書で提供される抗体、その抗原結合性断片、またはポリペプチドを使用して、CD37発現について0のスコアを有するサンプルは、CD37発現の上昇を有しないとして特徴付けられ得、1のスコアを有するサンプルは、CD37の発現の増大を有するとして特徴付けられ得、2または3のスコアを有するサンプルは、過剰発現しているか、またはCD37の上昇を有するとして特徴付けられ得る。

【0204】

ある特定の実施形態では、対象から得られたサンプルの少なくとも2のスコアは、対象を、抗CD37処置レジメン（例えばIMGN529）での処置の候補者として同定する。ある特定の実施形態では、対象から得られたサンプルの少なくとも3のスコアは、対象を、抗CD37処置レジメン（例えばIMGN529）での処置の候補者として同定する。

【0205】

また、CD37を過剰発現するサンプルは、細胞当たりの発現されたCD37分子のコピー数、または細胞当たりの結合抗体（ABC）数に対応する免疫組織化学スコアにより等級付けすることができ、生化学的に決定することができる。

【0206】

CD37均一性（細胞膜染色のパーセント）についての比較スケールは、以下の通りである：陰性 = 0%；限局性 = < 25%；不均質（ヘテロ） = 25 ~ 75%；および均質（ホモ） = > 75%。

【0207】

ある特定の実施形態では、対象から得られたサンプルの少なくとも2のヘテロのスコアは、対象を、抗CD37処置レジメン（例えばIMGN529）での処置の候補者として同定する。ある特定の実施形態では、対象から得られたサンプルの少なくとも2のホモのスコアは、対象を、抗CD37処置レジメン（例えばIMGN529）での処置の候補者として同定する。ある特定の実施形態では、対象から得られたサンプルの少なくとも3のヘテロのスコアは、対象を、抗CD37処置レジメン（例えばIMGN529）での処置の候補者として同定する。ある特定の実施形態では、対象から得られたサンプルの少なくとも3のホモのスコアは、対象を、抗CD37処置レジメン（例えばIMGN529）での処置の候補者として同定する。

【0208】

10

20

30

40

50

－実施形態では、CD37の免疫学的検出（免疫組織化学による）は、Hスコアを使用してスコア化される。Hスコアは、染色強度スコア（例えば0～3のスコア、0は染色なしを表し、3は強い染色を表す）を、膜染色について陽性である細胞のパーセンテージ（すなわち均一性）と組み合わせる。Hスコアは、以下のように計算することができる：  

$$\text{Hスコア} = [0 * (\text{強度0で染色された細胞のパーセンテージ})] + [1 * (\text{強度1で染色された細胞のパーセンテージ})] + [2 * (\text{強度2で染色された細胞のパーセンテージ})] + [3 * (\text{強度3で染色された細胞のパーセンテージ})]$$
したがって、Hスコアは、0（細胞膜染色なし）～300（全ての細胞膜が強度3で染色されている）の範囲にあり得る。

#### 【0209】

例として、がんを有する対象におけるHスコアは、以下の通りであり得る：  

$$\text{Hスコア} = (\text{強度0が75\%}) + (\text{強度1が0\%}) + (\text{強度2が0\%}) + (\text{強度3が25\%}) = 75$$
；または  

$$\text{Hスコア} = (\text{強度0が0\%}) + (\text{強度1が75\%}) + (\text{強度2が0\%}) + (\text{強度3が25\%}) = 150$$
。

別の例では、がんを有する対象におけるHスコアは、以下の通りであり得る：

$$\text{Hスコア} = (\text{強度0が75\%}) + (\text{強度1が0\%}) + (\text{強度2が25\%}) + (\text{強度3が0\%}) = 50$$
；または  

$$\text{Hスコア} = (\text{強度0が0\%}) + (\text{強度1が75\%}) + (\text{強度2が25\%}) + (\text{強度3が0\%}) = 125$$
。

#### 【0210】

－実施形態では、CD37の免疫学的検出（免疫組織化学による）は、サンプルにわたる陽性パーセントおよび強度を使用してスコア化される。この実施形態では、抗CD37処置レジメンでの処置についての選択は、染色強度（例えば1、2、または3）および均一性（例えば不均質または均質（表3を参照のこと））の両方を反映する特定のレベルで膜CD37を発現することが見られる、サンプル中の細胞のパーセンテージに基づく。例えば、細胞の少なくとも25%（すなわち、25～75%または>75%）が3でCD37陽性染色されるサンプルは、「3ヘテロ」および「3ホモ」として、または集合的に「少なくとも25%が3で陽性」として特徴付けることができる。

#### 【0211】

IHCは、手作業で、または自動システムを使用して（例えば自動こし器を使用して）実施することができる。IHCは、細胞、細胞ペレット、組織、血液からの調製物、血漿、血清、またはリンパ液などについて実施することができる。一部の実施形態では、サンプルは、固定サンプルである。一部の実施形態では、サンプルは、パラフィン包埋サンプルである。一部の実施形態では、サンプルは、ホルマリン固定、かつパラフィン包埋したサンプルである。

#### 【0212】

一部の実施形態では、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）は、免疫学的検出のために使用される。ELISAの根底にある方法論は、当技術分野で周知である。例えば、その全体が参照により本明細書に組み込まれるLequin R、「Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)」、Clin. Chem. 51巻：2415～2418頁（2005年）を参照されたい。1つの例示的なELISAでは、CD37結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）は、タンパク質親和性を示す選択された表面、例えばポリスチレンマイクロタイタープレート中のウェル上に固定される。次いで、CD37を含有するか、または含有する疑いのある試験サンプル、例えば臨床サンプルを、ウェルに添加する。結合させ、非特異的に結合した免疫複合体を除去するために洗浄した後、結合したCD37を検出することができる。検出は一般的に、検出可能な標識に連結された、CD37に特異的な第2抗体またはその抗原結合性断片の添加により達成される。この種類のELISAは、「サンドイッチELISA」である。また、検出は、第2抗体またはその抗原結合性断片の添加、続いて第2抗体またはその抗原結合性断片に対す

10

20

30

40

50



る結合親和性を有する第3抗体またはその抗原結合性断片の添加することにより、達成することができ、第3抗体またはその抗原結合性断片は検出可能な標識に連結されている。発色は、分光測定でモニターし、標準曲線に対する較正によりCD37の濃度に関連させることができる。別の例示的なELISAでは、試験サンプルをウェル表面上に固定し、次いで、CD37結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）と接触させる。結合させ、非特異的に結合した免疫複合体を除去するために洗浄した後、結合したCD37を検出する。最初のCD37結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）が検出可能な標識に連結する場合、免疫複合体は直接的に検出することができる。ここでもまた、免疫複合体は、第1の結合に対して結合親和性を有する第2の結合剤を使用して、第2の結合剤は検出可能な標識に連結して、検出することができる。試験サンプルが固定されている別のELISAは、検出における競合の使用を含む。このELISAでは、標識CD37結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）をウェルに添加し、CD37に結合することを可能にし、それらの標識により検出する。次いで、サンプル中のCD37の量を、コーティングされたウェルとのインキュベーション前またはインキュベーション中に、サンプルを標識CD37結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）と混合することにより決定する。サンプル中のCD37の存在は、ウェルへの結合のために利用可能なCD37結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）の量を低減させるように働き、したがって最終的なシグナルを低減させる。

10

#### 【0213】

－実施形態では、ウェスタンブロットを、免疫学的検出のために使用する。ウェスタンブロットのために、タンパク質を細胞サンプルから抽出し、電気泳動（例えばSDS-PAGE）に供し、膜（例えばニトロセルロースまたはPVDF）にブロットする。次いで、膜をCD37結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）と接触させ、CD37結合剤は、直接標識してもよく、またはさらに二次標識結合剤に供してもよい。検出は、例えばオートラジオグラフィ、比色反応、または化学発光によることができる。この方法は、基質の量の定量、および電気泳動中のアクリルアミドゲルにおける移動距離を示す膜上の相対的位置によるその種類の決定の両方を可能にする。

20

#### 【0214】

－実施形態では、フローサイトメトリーを、免疫学的検出のために使用する。したがって、例えば、細胞当たりの結合抗体（ABC）数を、フローサイトメトリーを使用して評価することができる。細胞当たりの結合抗CD37抗体の数の多さは、高CD37発現レベル、および抗CD37抗体またはそのイムノコンジュゲートでの処置の影響を受けやすい可能性の高さを示し得る。

30

#### 【0215】

－実施形態では、FACSを、免疫学的検出のために使用する。FACS分析は、細胞膜上のCD37の検出を可能にする。簡潔に説明すると、CD37結合剤（例えば抗体またはその抗原結合性断片）を発蛍光団に連結し、検出を、各細胞が光線を通過する際に各細胞から放射された光波長を読むセルソーティング機によって実施する。この方法は、2つまたはそれよりも多い抗体を同時に用い得る。

#### VII. 検出薬剤

40

#### 【0216】

本明細書で提供されるCD37結合剤は、少なくとも1つの薬剤に連結して、検出コンジュゲートを形成することができる。加えて、本明細書で提供されるCD37結合剤は、少なくとも1つの薬剤に連結して検出コンジュゲートを形成する検出薬剤により検出することができる。検出分子および部分は、当技術分野で周知である。診断薬としての抗体分子の有効性を増大させるために、少なくとも1つの所望の分子または部分を連結または共有結合的に結合または複合体化することは従来から行われている。かかる分子または部分は、少なくとも1つのレポーター分子であってもよいが、これに限定されない。レポーター分子は、アッセイを使用して検出することができる任意の部分として定義される。抗体にコンジュゲートされているレポーター分子の非限定的な例として、酵素、放射性標識、

50

ハプテン、蛍光標識、リン光分子、化学発光分子、発色団、発光分子、光親和性分子、着色粒子、および/またはリガンド、例えばビオチンが挙げられる。

【0217】

本発明で企図される抗体または抗原結合性断片検出コンジュゲートは、抗体または断片が、発色性基質との接触に際して着色生成物を生成する二次結合リガンドにおよび/または酵素(酵素タグ)に連結される、*in vitro*での使用のための検出コンジュゲートを含む。本明細書で提供されるCD37抗体またはその抗原結合性断片は、例えばそれらはあるダイナミックレンジのCD37を検出することができるので、コンジュゲート法のために特に有用である。好適な酵素の例として、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(ホースラディッシュ)水素ペルオキシダーゼ、および/またはグルコースオキシダーゼが挙げられる。一部の実施形態では、二次結合リガンドは、ビオチンならびに/またはアビジンおよびストレプトアビジン化合物である。

10

【0218】

酵素の場合、発色および測定される色の量は、存在するCD37の量の直接的な測定である。HRPが標識である場合、色は、基質3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)を使用して、例えば450nmの吸光度で検出することができる。あるいは、HRPのための他の発色性基質、例えば3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)または2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)。TMB、DAB、およびABTSなどの基質を、例えば、ELISAを使用する免疫検出法で使用することができる。

20

【0219】

3,3'-ジアミノベンジジン(DAB)は、HRPなどの酵素の基質であり、アルコールおよび他の有機溶媒中で非常に不溶性である褐色の最終生成物を生成する。また、DABの酸化は重合を引き起こし、四酸化オスミウムと反応する能力をもたらし、したがってその染色強度および電子密度を増大させる。重合したDABの光学密度を強化するために使用されるいくつかの金属および方法のうち、硫化銀と組み合わせた塩化金は、最もうまくいくように見える。

【0220】

3-アミノ-9-エチルカルバゾール(AEC)は、HRPなどの酵素の基質であり、酸化に際して、アルコール可溶性である深紅色の最終生成物を形成する。それゆえ、AECで処理した標本は、アルコールまたはアルコール溶液(例えばハリスヘマトキシリン)中に浸漬してはならない。その代わりに、水性対比染色および封入剤を使用するべきである。

30

【0221】

4-クロロ-1-ナフトール(CN)は、HRPなどの酵素の基質であり、青色の最終生成物として沈殿する。CNは、アルコールおよび他の有機溶媒中で可溶性であるので、標本は、脱水したり、アルコール対比染色に曝露したり、または有機溶媒を含有する封入剤と共にカバーガラスで覆ったりしてはならない。DABとは異なって、CNは、沈殿場所から拡散する傾向がある。

【0222】

p-フェニレンジアミン二塩酸塩/ピロカテコール(Hanker-Yates試薬)は、HRPなどの酵素の基質であり、アルコールおよび他の有機溶媒中で不溶性である青黒色の反応生成物を与える。重合したDABのように、この反応生成物は、オスミウム化することができる。免疫ペルオキシダーゼ技術においてHanker-Yates試薬で様々な結果が達成されている。

40

【0223】

化学発光基質、例えばECLを使用してもよい。ECLなどの基質は、例えばウェスタンブロットティングを使用する免疫検出法で使用することができる。

【0224】

結合剤(例えば抗体)コンジュゲートとしての使用に企図される例示的な蛍光標識とし

50

て、例えば、Alexa 350、Alexa 430、Alexa 488、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、Dylight 488、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、フィコエリスリン、REG、ローダミングリーン、ローダミンレッド、テトラメチルローダミン(TMR)、レノグラフィン(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、Texas Red、およびこれらの標識の誘導体(すなわち、ハロゲン化アナログ、コンジュゲートするためにイソチオシアネートまたは他のリンカーで改変したものなど)が挙げられる。例示的な放射性標識は、トリチウムである。

10

## 【0225】

また、アジド基を含有する分子は、低強度紫外線により生成する反応性ナイトレン中間体を通してタンパク質への共有結合的結合を形成するために使用することができる(PotterおよびHaley、1983年)。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アジドアナログは、粗細胞抽出物中でヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位特異的光プローブとして使用されている(OwensおよびHaley、1987年; Athertonら、1985年)。また、2-および8-アジドヌクレオチドは、精製タンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするために使用されており(Khatounら、1989年; Kingら、1989年; およびDholakiaら、1989年)、抗体結合剤として使用することができる。

20

## 【0226】

本発明の他の実施形態では、CD37結合剤(例えば抗体およびその抗原結合性断片)または二次結合剤を、核種、例えばトリチウムで放射性標識する。追加の実施形態では、ナノ金粒子(例えば約0.5nm~40nmのサイズ)および/または量子ドット(Hayward, Calif.)が用いられる。

## 【0227】

一部の実施形態では、CD37は、Optiview DAB IHC検出試薬(Ventannaカタログ番号760-700)を使用して検出される。

## 【0228】

一部の実施形態では、CD37は、BenchMark Ultra染色システムを使用して検出される。

30

## 【0229】

一部の実施形態では、CD37は、Optiview DAB IHC検出試薬(Ventannaカタログ番号760-700)を使用して、BenchMark Ultra染色システムを使用して検出される。

VIII. 組成物およびキット

## 【0230】

また、本明細書で開示される方法の実施における使用のための組成物およびキットが、本明細書で提供される。かかるキットは、容器を含んでもよく、容器の各々は、本発明の実施を支持するための、例えば1つもしくは複数のCD37結合剤(例えば抗体またはその抗原結合性断片)、緩衝液、および/または試薬を含む、方法で利用される様々な試薬(典型的に濃縮形態で)の1つまたは複数と、CD37の検出のための器具とを有する。キットはさらに、CD37結合剤に結合する第2の結合剤、および任意選択で、第2の結合剤に結合する第3の結合剤を含み得る。CD37結合剤、第2の結合剤、もしくは第3の結合剤は、検出試薬に結合させ得るか、またはキットは、検出試薬をCD37結合剤、第2の結合剤、もしくは第3の結合剤にカップリングするための試薬を含み得る。また、本発明のリガンド検出法におけるキット構成成分を説明する標識もしくは指標、またはその一組の使用説明書は典型的に含まれ、説明書は、キットまたはその構成成分の添付文書および/または包装を伴い得る。

40

50

## 【0231】

ある特定の実施形態では、キットは、CD37に結合する第1抗体または抗原結合性断片、第1抗体または抗原結合性断片に結合する第2抗体または抗原結合性断片、第2抗体または抗原結合性断片に結合する第3抗体または抗原結合性断片を含み、第3抗体または抗原結合性断片は、検出試薬（例えば酵素タグ）、任意選択で検出試薬の基質（例えばTMB、DAB、またはABTS）、および任意選択でCD37タンパク質またはCD37を含有する細胞サンプル（例えばパラフィン包埋サンプル）に連結される。キットはさらに、がんの処置のための治療剤、例えば抗CD37イムノコンジュゲートを含み得る。

## 【0232】

一実施形態では、CD37結合剤は、1B11-2またはその抗原結合性断片である。一実施形態では、CD37結合剤は、1B11-2と同じCD37エピトープに結合する抗体または抗原結合性断片である。一実施形態では、CD37結合剤は、1B11-2の6つのCDRを含む抗体または抗原結合性断片である。一実施形態では、CD37結合剤は、1B11-2のVHおよびVLを含む抗体または抗原結合性断片である。

## 【0233】

一実施形態では、CD37特異的抗体またはその抗原結合性断片は、約0.1~約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.1~約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.1~約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.5~約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.5~約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約0.5~約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1~約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1~約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1~約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2~約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2~約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約2~約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含まれる。別の実施形態では、CD37特異的抗体またはその抗原結合性断片は、約1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含まれる。別の実施形態では、CD37特異的抗体またはその抗原結合性断片は、約2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含まれる。別の実施形態では、CD37特異的抗体またはその抗原結合性断片は、約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で含まれる。

## 【0234】

別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約1~約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1~約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約1~約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2~約20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2~約15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約2~約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度を達成するための希釈についての説明書を伴って、濃縮溶液で含まれる。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約1.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約3  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約6  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約7  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、約9  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、または約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度を達成するための希釈についての説明書を伴って、濃縮溶液で含まれる。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度を達成するための希釈についての説明書を伴って、濃縮溶液で含まれる。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約2.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度を達成するための希釈についての説明書を伴って、濃縮溶液で含まれる。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約4.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度を達成するための希釈についての説明書を伴って、濃縮溶液で含まれる。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約8.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度を達成するための希釈についての説明書を伴って、濃縮溶液で含まれる。別の実施形態では、抗体またはその抗原結合性断片は、約10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の最終濃度を達成するための希釈についての説明書を伴って、濃縮溶液で含まれる。また、キットは、CD37発現の検出およびスコア化についての説明書を含み得る。また、キットは、対照または参照サンプルを含み得る。対照または参照サンプルの非限定的な例として、正常（正常対照）または腫瘍（陽性対照）サンプルに由来する細胞ペレットまたは組織培養細胞株が挙げられる。例示的な細胞株は、CD37を発現する発現ベクターを安定的にまたは一過性にトランスフェクトした細胞株を含む。追加の例は、実施例で説明する細胞ペレットおよび組織サンプルを含む。陽性細胞株は、Dauidi細胞（高発現）、Ramos細胞（中発現）、およびNamalwa細胞（中~低発現）を含む

10

20

30

40

50

。ヒト扁桃は、胚中心および外套帯が高発現を示し、濾胞間領域が発現を示さないので、陽性および陰性対照組織の両方として働く。一部の実施形態では、対照または参照サンプルは、パラフィン包埋サンプルである。

【0235】

一部の実施形態では、キットは、(a) ヒトCD37に対するモノクローナル抗体から構成される捕捉試薬、および(b) これもまたCD37モノクローナル抗体を含み得るが、またCD37に結合する検出可能な(標識または非標識)抗体を含んでもよい検出試薬、の基本要素を含む包装された組合せである。これらの基本要素は、本明細書で定義される。

【0236】

一実施形態では、キットはさらに、捕捉試薬のための固体支持体を含み、これは別々の要素として提供され得るか、またはこの上に捕捉試薬が既に固定されている。それゆえ、キット中の捕捉抗体は固体支持体上に固定され得るか、またはそれらは、キットと共に含まれるか、もしくはキットとは別々に提供される、かかる支持体上に固定されてもよい。

【0237】

一実施形態では、捕捉試薬で、マイクロタイタープレートをコーティングする。検出試薬は、直接検出される標識抗体、または異なる種で生じさせた非標識抗体に対する標識抗体により検出される非標識抗体であってもよい。標識が酵素である場合、キットは通常、酵素が必要とする基質および補因子を、標識が発蛍光団である場合、検出可能な発色団を提供する色素前駆体を含む。検出試薬が非標識の場合、キットはさらに、例えば蛍光定量的検出形式での、例えば非標識抗体に対する標識抗体など、検出可能な抗体のための検出手段を含み得る。標識が酵素である場合、キットは通常、酵素が必要とする基質および補因子を、標識が発蛍光団である場合、検出可能な発色団を提供する色素前駆体を、および標識がビオチンである場合、アビジン、例えばアビジン、ストレプトアビジン、またはMUGを用いてHRPもしくは -ガラクトシダーゼにコンジュゲートしたストレプトアビジンを含む。

【0238】

一実施形態では、捕捉試薬は、CD37抗体1B11-2、または抗体1B11-2の配列を含む抗体である。一実施形態では、検出試薬は、CD37抗体1B11-2、または抗体1B11-2の配列を含む抗体である。別の実施形態では、検出試薬CD37抗体1B11-2、または抗体1B11-2の配列を含む抗体は、ビオチン化される。

【0239】

別の実施形態では、キットは、酵素、発蛍光団、放射活性標識、および発光団からなる群から選択される検出試薬をさらに含む。別の実施形態では、検出試薬は、ビオチン、ジゴキシゲニン、フルオレセイン、トリチウム、およびローダミンからなる群から選択される。

【0240】

また、キットは、アッセイを行うための説明書、および/または抗原標準物質としてのCD37タンパク質もしくはその断片(例えばCD37細胞外ドメイン、またはGPI連結ドメインの全てもしくは一部を有するCD37細胞外ドメイン)、ならびに他の添加物、例えば安定化剤、洗浄およびインキュベーション緩衝液などを含有し得る。一実施形態では、CD37抗原標準物質は、本明細書の実施例で説明するCD37タンパク質である。また、キットは、CD37発現の検出およびスコア化についての説明書を含み得る。

【0241】

キットの構成成分は、所定の比で提供してもよく、様々な試薬の相対量は、実質的にアッセイの感度を最大限にする、試薬の溶液中の濃度を提供するために好適に変動する。特に、試薬は、賦形剤を含む、通常凍結乾燥されている乾燥粉末として提供してもよく、これは溶解に際して、試験するサンプルと合わせるのに適切な濃度を有する試薬溶液を提供する。

【0242】

10

20

30

40

50

また、本明細書で説明する抗体または抗原結合性断片を含む組成物が提供される。一実施形態では、組成物は、本明細書で説明する抗CD37抗体または抗原結合性断片、および緩衝液、例えば検出アッセイ、例えばIHC、ELISA、またはFACSで使用され得る緩衝液を含む。かかる緩衝液は当業者に公知であり、希釈液を含む。例として、IHC緩衝液は、例えばカゼイン血清もしくはアルブミン（例えばウシ血清、ヤギ血清、またはBSA）、TweenもしくはTriton、PBS、および/もしくはアジ化ナトリウム、またはこれらの任意の組合せを含有し得る。また、IHC緩衝液は本明細書で提供され、当業者に公知である。また、ELISA緩衝液は、本明細書で提供され、当業者に公知である。ELISA緩衝液は、例えば血清もしくはアルブミン（例えばウシ血清、ヤギ血清、またはBSA）、脱脂粉乳、カゼイン、および/もしくはゼラチン、またはこれらの任意の組合せを含有し得る。ある特定のFACS緩衝液は、本明細書で、例えば実用的実施例で提供される。また、FACS緩衝液は、例えば血清もしくはアルブミン（例えばウシ血清、ヤギ血清、またはBSA）、および/またはアジ化ナトリウムを含有し得る。また、FACS緩衝液は、PBS、EDTA、および/もしくはDNA分解酵素、またはこれらの任意の組合せを含有し得る。

10

#### 【0243】

本開示の実施形態はさらに、本開示のある特定の抗体の調製および本開示の抗体を使用するための方法を詳細に説明する、以下の非限定的な実施例を参照することにより定義することができる。材料および方法の両方に対する多くの改変が、本開示の範囲から逸脱することなく実施され得ることが当業者に明らかである。

20

#### 【実施例】

#### 【0244】

##### IX. 実施例

本明細書で説明する実施例および実施形態は、単に例示の目的のためであること、ならびにこれに照らした様々な改変または変更が当技術分野において示唆され、本出願の趣旨および範囲内に含まれるべきであることが理解される。

##### (実施例1)

##### CD37ハイブリドーマの生成

#### 【0245】

免疫組織化学(IHC)染色に好適な抗ヒトCD37モノクローナル抗体(本開示の抗体)を産生するハイブリドーマを、約4,800個のハイブリドーマから選択した。野生型Balb/cマウスを、E.coliにおいて作製した組換えCD37抗原hCD37-LELで免疫することにより、ハイブリドーマを作製した。この抗原は、精製を容易にするために3'末端に付加された6xHisタグを有する、CD37のアミノ酸107~242(配列番号15)を含む。CD37組換えタンパク質での免疫化は、完全フロイントアジュバント(CFA)もしくは追加免疫のための不完全フロイントアジュバント(Sigma)またはMagicマウスアジュバント(Creative Diagnostics)中に乳化したタンパク質の皮下注射により行った。一般的に、マウスを2週間隔で5回免疫し、その後、融合3日前に、免疫原の腹腔内注射による最終追加免疫を与えた。

30

40

#### 【0246】

免疫した野生型Balb/cマウス起源の脾臓細胞、およびマウス骨髄腫P3X63Ag8.653細胞(P3細胞)を使用して、全部で5つの独立した融合を行った。ECM200電気融合機(BTX Harvard Apparatus)を使用して標準のプロトコールに従って、細胞融合を行った。各融合は、1,000個を超えるハイブリドーマを産生した。

#### 【0247】

これらのハイブリドーマにより産生された抗体を、CD37抗原の様々な組換え変形を使用したELISAによりスクリーニングし、確認した。hCD37-LELは、精製を容易にするために3'末端に付加された6xHisタグを有する、ヒトCD37のアミノ

50

酸107~242(配列番号15)を含み、E.coli.において作製した。hCD37-Fc-LAGAは、精製を容易にするために3'末端に付加されたヒトIgG1Fcドメインを有する、ヒトCD37のアミノ酸107~235(配列番号17)を含み、HEK-293T細胞において作製した。hCD37-ECDFcは、精製を容易にするために3'末端に付加されたマウスIgG2aFcドメインを有する、ヒトCD37のアミノ酸107~235(配列番号16)を含み、HEK-293T細胞において作製した。

#### 【0248】

未変性条件については、組換えタンパク質を、50mM重炭酸ナトリウムコーティング緩衝液(Sigma-Aldrich)中に直接希釈した。変性条件については、組換えタンパク質を、50mM DTTを含む1%SDS中で65℃にて30分間インキュベートし、続いて100mMヨードアセトアミドと共に室温にて30分間インキュベートし、その後、50mM重炭酸ナトリウムコーティング緩衝液中に希釈した。各組換えタンパク質を、4℃で一晩のインキュベーションにより、マイクロタイタープレート上に約25~100ng/ウェルで固定した。

#### 【0249】

プレートを、0.05% Tween-20で補完したPBSで1回洗浄し、1%ウシ血清アルブミン(BSA)で補完したPBSでブロックした。プレートを、0.05% Tween-20で補完したPBSで3回洗浄し、ハイブリドーマ上清をプレートに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、上記のように3回洗浄し、HRP標識したヤギ抗マウス二次抗体(Jackson ImmunoResearch、1:5,000で希釈した)と共に室温で1時間インキュベートした。プレートを上記のように3回洗浄し、HRP基質TMB(Bio-FX)を添加することにより、結合したHRPをコンジュゲートした抗体を検出した。プレートを約10分間インキュベートし、次いで、発色現像を停止溶液(Bio-FX)で停止させた。450nmでの吸光度を、マルチプレートリーダーで各プレートについて測定した。クローン1B11からのハイブリドーマ上清は、未変性および変性条件の両方について強い陽性ELISAシグナルをもたらした(図1Aを参照のこと)、サブクローニングのために選択した。クローン1B11から2つのサブクローン:1B11-2および1B11-20を得た。両方のサブクローンからのハイブリドーマ上清は、未変性および変性条件の両方について強い陽性ELISAシグナルをもたらした(図1Bを参照のこと)、クローン1B11-2をさらなる分析のために選択した。

#### (実施例2)

ELISAによる抗CD37抗体の特徴付け

#### 【0250】

1B11-2からの抗体を、標準のプロテインAクロマトグラフィーを使用して精製した。Leica Biosystemsにより販売されている抗CD37抗体(製品コードNCL-CD37)を比較のために使用した。抗CD37抗体の結合を、抗原として使用される組換えCD37タンパク質でのELISAにより調べた。各組換えタンパク質を、上に説明する未変性または変性条件のいずれかを使用して、重炭酸ナトリウムコーティング緩衝液(Sigma-Aldrich)中で、マイクロタイタープレート上に約25~100ng/ウェルで固定した。プレートを、0.05% Tween-20で補完したPBSで1回洗浄し、1%ウシ血清アルブミン(BSA)で補完したPBSでブロックした。プレートを、0.05% Tween-20で補完したPBSで3回洗浄し、精製した抗体をプレートに添加した。プレートを室温で1時間インキュベートし、上記のように3回洗浄し、HRP標識したヤギ抗マウス二次抗体(Jackson ImmunoResearch、1:5,000で希釈した)と共に室温で1時間インキュベートした。プレートを上記のように3回洗浄し、HRP基質TMB(Bio-FX)を添加することにより、結合したHRPをコンジュゲートした抗体を検出した。プレートを約10分間インキュベートし、次いで、発色現像を停止溶液(Bio-FX)で停止させた。450nm

mでの吸光度を、マルチプレートリーダーで各プレートについて測定した。未変性hCD37-Fc-LAGAおよびhCD37-LELへの結合についての代表的な結果を図2に示す。抗体1B11-2は、NCL-CD37と比較して、両方の未変性CD37タンパク質に、大いに改善された親和性で結合する。変性hCD37-LELタンパク質への結合についての結果を図3に示す。抗体1B11-2は、NCL-CD37と比較して、変性hCD37-LELタンパク質に、改善された親和性で結合する。

(実施例3)

抗原エピトープの特徴付け

【0251】

抗CD37抗体の結合をさらに、上に説明する未変性条件下で、抗原として使用される組換えCD37タンパク質hCD37-ECD-S2-FcでのELISAにより調べた(S2は、アミノ酸138~176を含有する、CD37の大きな細胞外ドメインの第2のセグメントを指す)。代表的な結果を図4に示す。hCD37-ECD-S2-Fcは、精製を容易にするために3'末端に付加されたマウスIgG2a Fcドメインを有する、ヒトCD37のアミノ酸107~109および138~235(配列番号18)を含み、HEK-293T細胞において作製した。抗体1B11-2は、hCD37-ECD-S2-Fcに結合しない一方で、NCL-CD37は、このCD37タンパク質断片への結合を保持する。同様の結果が、ウェスタンブロット分析で見られた。

(実施例4)

抗CD37抗体の免疫組織化学的評価

FFPE CD37 IHC

【0252】

クローン1B11-2からの精製抗体を、IHCにより、分析し、LeicaのNCL-CD37マウスモノクローナル抗体と比較した。分析は、Leica Bond RX Automated Stainer、ならびに表1で列挙される試薬および条件を使用して実施した。

【表1】

表1. IHC 試薬およびアッセイ条件

| ステップ            | 作用/試薬(供給業者)  | 時間    |
|-----------------|--|-------|
| バーク             | 温度: 60°C   | 30 分間 |
| 脱蠟              | Bond Dewax 溶液(Leica)<br>100%試薬グレードエタノール<br>(Arantik)     | 固定    |
| 抗原回復            | Bond Epitope Retrieval 1 (クエン酸緩衝液に基づく pH6.0 溶液)          | 20 分間 |
| 内因性ペルオキシダーゼブロック | 過酸化水素(Leica)   | 5 分間  |
| 試験物品            | Leica 抗体希釈液中に希釈することにより調製した、様々な濃度の ImmunoGen, Inc.が作製した抗体 | 15 分間 |
| 検出              | 一次後試薬(Leica)   | 8 分間  |
|                 | ポリマー(Leica)  | 8 分間  |
|                 | 混合 DAB (Leica)   | 10 分間 |
| 対比染色            | ヘマトキシリン(Leica)   | 5 分間  |

【0253】

ホルマリン固定したパラフィン包埋(FFPE)細胞サンプル、正常組織、びまん性大



細胞型B細胞リンパ腫患者腫瘍生検、濾胞性リンパ腫患者腫瘍生検、および慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫患者腫瘍生検を含有するスライドを60℃でベークし、Bond Dewax溶液および100%エタノールを使用して脱蠟した。Bond Epitope Retrieval 1(クエン酸緩衝液に基づくpH6.0溶液)を使用した熱誘発エピトープ回復を20分間実施し、内因性ペルオキシダーゼを過酸化水素で5分間ブロックした。スライドを、様々な濃度のImmunoGen, Inc.が作製した1B11-2抗体、Leica/Novocastrol NCL-CD37抗体(クローンCT1)、またはLeica/Novocastrol muIgG1対照抗体と共に15分間インキュベートした。結合した抗体を、Leica Bond Refine検出システムと共にインキュベートすることにより検出した。抗体の適用後、スライドを、一次後試薬(ウサギ抗マウスIgG)と共に8分間、ポリマー(ヤギ抗ウサギポリマー)と共に8分間、およびDAB(3,3-ジアミノベンジジン四塩酸塩)と共に10分間インキュベートした。これは、茶色シグナルをもたらした。スライドをヘマトキシリンで5分間対比染色した。

10

## 【0254】

FFPE正常脾臓および扁桃組織サンプルは、以下に概略するように、Mercy Health SystemsおよびArdais Corporationから得られたヒト組織ブロックに由来した。FFPE細胞サンプルは、DSMZ(German Collection of Microorganisms and Cell Cultures)により供給されるDaudiおよびRamos細胞株に由来し、Namalwa細胞株は、American Tissue Culture Collectionにより供給された。5µmに設定したマイクロームを使用して、サンプルの切片を含有するスライドを、FFPEブロックから調製し、正常電スライド上に載せた。これらのスライドを一晩空気乾燥し、その後染色した。ヒト正常組織アレイをPantomicsから購入し、非ホジキンリンパ腫組織マイクロアレイをTriStar Technology Group LLCから購入した。

20

## 【表2】

表2. FFPE 試験サンプル

| ヒト組織種類             | 市販供給源  |
|--------------------|--|
| 正常脾臓(2)            | Mercy Health Systems                               |
| 正常扁桃(3)            | Mercy Health Systems (2)および Ardais Corporation (1) |
| 正常組織マイクロアレイ        | Pantomics  |
| 非ホジキンリンパ腫組織マイクロアレイ | TriStar Technology Group LLC                       |

30

40

## 【0255】

CD37染色強度および分布パターンを、対照IgG染色(非特異的)に対してスコア化し、1B11-2染色を、LeicaのNCL-CD37マウスモノクローナル抗体で観察された染色と比較した。強度を、0~3のスケールでスコア化し、0=染色なし、1=弱い染色、2=中程度の染色、および3=強い染色であった。染色の均一性を、陰性(陽性染色を示す細胞がない)、限局性(細胞の25%未満が染色されている)、不均質(細胞の25~75%が染色されている)、および均質(細胞の75%より多くが染色されている)としてスコア化した。染色強度およびスコア化スケールを、以下に説明する。全ての染色は、委員会認定病理学者が評価した。

50

## 【表3】

表3.染色の強度および均一性

| 強度(膜染色の量) |     | 均一性(陽性細胞のパーセント) |        |
|-----------|-----|-----------------|--------|
| 0         | 陰性  | 0               | 陰性     |
| 1         | 弱い  | 限局性             | <25%   |
| 2         | 中程度 | 不均質(ヘテロ)        | 25-75% |
| 3         | 強い  | 均質(ホモ)          | >75%   |

10

F F P E C D 3 7 I H C についての精製 1 B 1 1 - 2 抗体の検証

## 【0256】

Leica 抗体希釈液 (0.35% ProClin (商標) 950 を含む Tris 緩衝食塩水、界面活性剤、およびタンパク質安定化剤) 中に  $8.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、 $4.2 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、および  $2.1 \mu\text{g}/\text{mL}$  で希釈したクローン 1 B 1 1 - 2 からの精製抗体を、C D 3 7 陽性対照サンプル (ヒト正常扁桃、Daudi 細胞、Ramos 細胞、および Namalwa 細胞) を染色するために使用した。抗体を、C D 3 7 陽性サンプルにおける容認できる膜染色および特異性により測定される、C D 3 7 特異性について評価した。また、このクローンを、同じ C D 3 7 陽性ヒト組織および細胞を使用して、Leica 抗体希釈液中に  $4.2 \mu\text{g}/\text{mL}$  で希釈した NCL - C D 3 7 マウス mAb (クローン CT1) と比較した。Leica の NCL - C D 3 7 抗体は、C D 3 7 陽性細胞ペレットの各々において容認できる膜染色を生じ、扁桃組織の胚中心および外套帯 (両方とも C D 3 7 について陽性) においていくらかの低レベル核バックグラウンドを伴って容認できる膜染色を生じ、扁桃の濾胞間領域 (C D 3 7 陰性である) においては染色がなかった。1 B 1 1 - 2 は、C D 3 7 陽性サンプルにおいて容認できる膜染色および優れた特異性を示し、核バックグラウンド染色を完全に欠くという追加の利点を有した (Leica の NCL - C D 3 7 マウス mAb と比較した 1 B 1 1 - 2 の画像について図 5 を参照のこと)。1 B 1 1 - 2 は、Leica の NCL - C D 3 7 マウスモノクローナル抗体で観察されたパターンと同様のパターンの膜染色を生じたが、この膜染色は、Leica の NCL - C D 3 7 抗体により生じた膜染色より特異的かつより明確にはっきりとしていた。また、1 B 1 1 - 2 は扁桃の濾胞間領域 (C D 3 7 発現について陰性) では染色を生じなかったことに留意することが重要であり、このことは特異性の増大を示す。1 B 1 1 - 2 について、 $4.2 \mu\text{g}/\text{mL}$  の好適な染色濃度が実験的に決定された。

20

30

## 【0257】

また、Leica 抗体希釈液中に  $4.2 \mu\text{g}/\text{mL}$  で希釈した 1 B 1 1 - 2 を、ヒト正常組織アレイ (Pantomics から購入した) およびヒト扁桃および脾臓組織を染色するために使用して、特異性を評価した。ここでもまた、1 B 1 1 - 2 を、同じ正常扁桃および脾臓組織ならびにヒト正常組織アレイについて、Leica 抗体希釈液中に  $4.2 \mu\text{g}/\text{mL}$  で希釈した Leica の NCL - C D 3 7 マウスモノクローナル抗体と比較した。ほとんどの正常組織 (扁桃および脾臓を除外する) において、Leica の NCL - C D 3 7 マウスモノクローナル抗体は、散在性リンパ球細胞においてのみ染色を示し、組織の残りの部分は陰性であった。小腸のパネート細胞において、および脾臓の脾島細胞においていくらかの細胞質バックグラウンドの赤みが観察された (図 6 を参照のこと)。Leica の NCL - C D 3 7 抗体は、いくらかの低レベル核バックグラウンドを伴うにもかかわらず、ヒト正常扁桃の胚中心および外套帯において、ならびにヒト正常脾臓組織の辺縁帯において、容認できる膜染色を生じた。Leica の NCL - C D 3 7 抗体で、扁桃の濾胞間領域において、または脾臓の赤脾髄において染色は存在しなかった。1 B 1 1 - 2 は、ヒト正常扁桃の胚中心および外套帯において、ならびにヒト正常脾臓組織の辺縁帯において、容認できる膜染色を示し、残りの正常組織においては散在性リンパ球染色の

40

50

み、バックグラウンド染色は全くなかった（図6を参照のこと）。また、扁桃の濾胞間領域において、または脾臓の赤脾髄において染色はなかった。これらの結果は、1B11-2は、染色感度、特異性、およびバックグラウンドの低減の点で有利であることを示し、これらの全ては、IHCアッセイの高品質の性能および分析に重要である。

（実施例5）

ヒト腫瘍サンプルを使用した1B11-2 CD37抗体のIHC評価

【0258】

びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（n=52）、濾胞性リンパ腫（n=20）、および慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫（n=8）を代表するヒト腫瘍サンプル（全て、TriStar Technology Group LLCから購入した非ホジキンリンパ腫組織マイクロアレイに含まれていた）を、1B11-2抗体を使用したIHCによりCD37発現について評価した。CD37染色強度およびスコア分布を、以下の表4に要約する。図7は、1B11-2抗体での、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫および濾胞性リンパ腫組織の染色の例を示す。これらの結果は、非ホジキンリンパ腫患者組織におけるCD37発現を評価するためのIHCアッセイにおける使用のための、より特異的かつ高感度の抗体としての1B11-2の利点を示す。

【表4】

表4:スコア分布(%陽性)

| 腫瘍の種類:                            | びまん性大細胞型 B細胞リンパ腫 n=52 | 濾胞性リンパ腫 n=20 | 慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫 n=8 |
|-----------------------------------|-----------------------|--------------|---------------------------|
| 陽性(任意の強度):                        | 96%                   | 95%          | 100%                      |
| レベル2以上の強度で、少なくとも25%の腫瘍細胞が染色されている: | 58%                   | 35%          | 50%                       |
| レベル3以上の強度で、少なくとも25%の腫瘍細胞が染色されている: | 60%                   | 100%         | 100%                      |

【0259】

1B11-2抗体およびNCL-CD37マウスモノクローナル(Leica)抗体を、非ホジキンリンパ腫組織マイクロアレイ(TMA)(TriStar Technology Group LLCから購入した)を使用して比較した。IHCアッセイ(CD37アッセイ)においてNCL-CD37抗体を使用して、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫サンプルの27%(52個のうちの14個)、濾胞性リンパ腫サンプルの85%(20個のうちの17個)、および慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫サンプルの37%(8個のうちの3個)は、最も高いカテゴリー(少なくとも25%の腫瘍細胞でレベル3の染色強度、表5)にスコア化された。対照的に、Leica Bond Rx自動スライド染色器上でLeica Bond Refine検出キットを利用した、上に説明するIHCアッセイにおける1B11-2抗体は、増大した感度および特異性を有する染色を生じ、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫サンプルの59%(52個のうちの31個)、濾胞性リンパ腫サンプルの95%(20個のうちの19個)、および慢性リンパ球性白血病/小リンパ球性リンパ腫サンプルの100%(8個のうちの8個)は、最も高いカテゴリー(少なくとも25%の腫瘍細胞でレベル3の染色強度、表5)にスコア化される染色を生じた。また、1B11-2抗体は、3個のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫サンプルにおいて低レベルのCD37発現を検出することができ、一方で、LeicaのNCL-CD37抗体は、この低レベルの発現を検出することができなかった。これらの結

果は、1B11-2が、染色感度および特異性の点で有利であり、より大きなダイナミックレンジのCD37染色を生じることが示す。

【表5】

表5:非ホジキンリンパ腫 TMA における CD37 分布率比較

| スコア                               | びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫(n=52) |          | 濾胞性リンパ腫 (n=20) |          | 慢性リンパ球性白血病 /小リンパ球性リンパ腫(n=8) |          |
|-----------------------------------|-------------------------|----------|----------------|----------|-----------------------------|----------|
|                                   | NCL-CD37                | 1B11-2   | NCL-CD37       | 1B11-2   | NCL-CD37                    | 1B11-2   |
| 陽性(任意の強度)                         | 47 (90%)                | 50 (96%) | 19 (95%)       | 19 (95%) | 8 (100%)                    | 8 (100%) |
| レベル1以上の強度で、少なくとも25%の腫瘍細胞が染色されている: | 26 (50%)                | 11 (21%) | 0              | 0        | 0                           | 0        |
| レベル2以上の強度で、少なくとも25%の腫瘍細胞が染色されている: | 33 (63%)                | 30 (58%) | 12 (60%)       | 7 (35%)  | 7 (88%)                     | 4 (50%)  |
| レベル3以上の強度で、少なくとも25%の腫瘍細胞が染色されている: | 14 (27%)                | 31 (60%) | 17 (85%)       | 19 (95%) | 3 (38%)                     | 8 (100%) |

(実施例6)

ドメインマッピング

変性 SDS PAGE ウェスタンブロッティングによるドメインマッピング

【0260】

Fc融合CD37-ECDの様々な調製物を認識する能力を、1B11-2(左パネル)について、市販されている抗CD37抗体(Leica、右パネル)と直接比較して、変性SDS PAGE、続くウェスタンブロッティングで試験した。Fc融合CD37-ECD調製物を、70mM -メルカプト-エタノールを含有するLaemmli緩衝液中での100で10分間のインキュベーションにより変性させ、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、続いてPVDf膜に電気泳動移行させた。膜を、0.1% Tween-20を含むTris緩衝食塩水(TBST)中の5%脱脂乳により、室温で1時間ブロックした。一次抗体を一晩適用し、続いてホースラディッシュペロキシダーゼにコンジュゲートした二次抗マウスF(ab)<sub>2</sub>で室温にて1時間検出した。プロットを、標準の手順に従って強化化学発光検出を使用して現像した。結果を図8に示す。Leica抗体は全ての3つのFc-CD37-ECD調製物を認識するが、本発明の1B11-2抗体は、hCD37-ECD-FcおよびhCD37-Fc-LAGAのみを認識し、hCD37-ECD-S2-Fcは認識しなかった。hCD37-ECD-S2-Fc構築物は、CD37-ECDのS1セグメント(アミノ酸110~137)を欠いている。したがって、アミノ酸110~137の領域は、1B11-2によるエピトープ認識に重要であるが、Leica抗体による認識には重要ではない。

未変性PAGEウェスタンブロッティングによるドメインマッピング

【0261】

10

20

30

40

50

Fc融合CD37-ECDの様々な調製物を認識する能力を、1B11-2について、未変性PAGE、続くウェスタンブロッティングで試験した。Fc融合CD37-ECD調製物を、Native Pageサンプル緩衝液に入れロードし、SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離し、続いてPVDF膜に電気泳動移行させるか、またはクーマシーブリリアントブルーでゲル染色した。PVDF膜を、0.1% Tween-20を含むTris緩衝食塩水(TBST)中の5%脱脂乳により、室温で1時間ブロックした。一次抗体を一晩適用し、続いてホースラディッシュペルオキシダーゼにコンジュゲートした二次抗マウスF(ab)<sub>2</sub>で室温にて1時間検出した。プロットを、標準の手順に従って強化化学発光検出を使用して現像した。結果を図9に示す。変性SDS PAGE(図8)およびELISA実験(図4を参照のこと)からのデータと一致して、本発明の1B11-2抗体は、hCD37-ECD-FcおよびhCD37-Fc-LAGAのみを認識し、hCD37-ECD-S2-Fcは認識しなかった。これらのデータは、CD37-ECDのS1セグメント(アミノ酸110~137)またはその一部は、1B11-2によるエピトープ認識に重要であることを示す(図9の左パネル)。クーマシーブリリアントブルーゲル染色(図9の右パネル)は、hCD37-ECD-S2-Fcタンパク質が1B11-2による検出に十分な量で存在していたことを示す。

(実施例7)

抗ヒトCD37抗体のVLおよびVH領域のクローニングおよび配列決定

【0262】

RNeasyキット(QIAgen)を使用して製造業者のプロトコールに従って、5 × 10<sup>6</sup>細胞の上に説明する抗ヒトCD37ハイブリドーマ1B11-2から、全細胞RNAを調製した。次いで、SuperScript III cDNA合成キット(Invitrogen)を使用して、全RNAからファーストストランドcDNAを合成した。

【0263】

ハイブリドーマ細胞に由来する抗体可変領域cDNAを増幅するためのPCR手順は、Wangら((2000年)J Immunol Methods. 233巻: 167~77頁)、およびCoら((1992年)J Immunol. 148巻: 1149~54頁)で説明されている方法に基づいた。可変軽鎖(VL)および可変重鎖(VH)配列を、5'末端上の縮重プライマー、および3'末端上のマウスカッパーまたはIgG1定常領域のいずれかに特異的なプライマーにより増幅した。次いで、PCR反応を1%低融点アガロースゲルで泳動させ、続いて300~400bpアンプリコンバンドを切り出し、これらを続いてZymo DNAMiniカラムを使用して精製した。精製アンプリコンを、両方向から可変領域cDNA配列を生成するために、PCR反応の同じ5'および3'プライマーを利用した配列決定のためにBeckman Coulter Genomicsに送った。

【0264】

VLおよびVH cDNA配列をクローニングするために使用した縮重プライマーは、5'末端を変えるので、完全な可変領域cDNA配列を確認するために追加の配列決定を試みる必要があった。予備的な配列をNCBI IgBlastサイト([www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/))の検索クエリーに入力して、抗体配列が由来したマウス生殖細胞系配列を同定した。次いで、PCRプライマーをマウス抗体の生殖細胞系関連リーダー配列にアニールするように設計し、そのため、この新しいPCR反応は、PCRプライマーにより変更されていない完全な可変領域cDNA配列を生成し得る。PCR反応、バンド精製、および配列決定は、上に説明するように実施した。

【0265】

抗ヒトCD37抗体について得られた可変領域cDNA配列を、生殖細胞系定常領域配列と組み合わせて、全長抗体cDNA配列を得た。次いで、重鎖および軽鎖の分子量を、cDNA配列の翻訳から計算し、精製マウス抗ヒトCD37抗体のLC/MS分析により得られた分子量と比較した。マウス1B11-2軽鎖および重鎖について観察された分子量は、予測した値と適合し、cDNA配列が正確であることを確認した。

10

20

30

40

50

## 【 0 2 6 6 】

VHおよびVL CDR配列を、それぞれ、表1および2に示す。VHおよびVL配列を、それぞれ、表3および4に示す。全長重鎖および軽鎖配列を、それぞれ、表5および6に示す。VHおよびVLのポリヌクレオチド配列を、表8に示す。

## 【 0 2 6 7 】

本明細書で引用する全ての刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、および受託番号/データベース配列(ポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列の両方を含む)は、各個々の刊行物、特許、特許出願、インターネットサイト、または受託番号/データベース配列が参照により組み込まれることが具体的かつ個々に示されているのと同程度に、全ての目的についてそれらの全体は参照により本明細書に組み込まれる。

10

【 図 1 A 】

| 抗体             | 濃度        | hCD37-Fc-LAGA |     | hCD37-ECD-Fc |     | hCD37-LEL |     |
|----------------|-----------|---------------|-----|--------------|-----|-----------|-----|
|                |           | 未変性           | 変性  | 未変性          | 変性  | 未変性       | 変性  |
| Leica NCL-CD37 | 1B11      | 3.0           | 3.1 | 3.0          | 3.1 | 3.0       | 1.7 |
|                | 10 µg/mL  | 2.8           | 3.2 | 2.7          | 3.1 | 3.0       | 2.8 |
|                | 5 µg/mL   | 2.6           | 3.1 | 2.4          | 3.1 | 3.0       | 2.0 |
|                | 2.5 µg/mL | 2.4           | 3.1 | 2.2          | 3.1 | 3.0       | 1.8 |

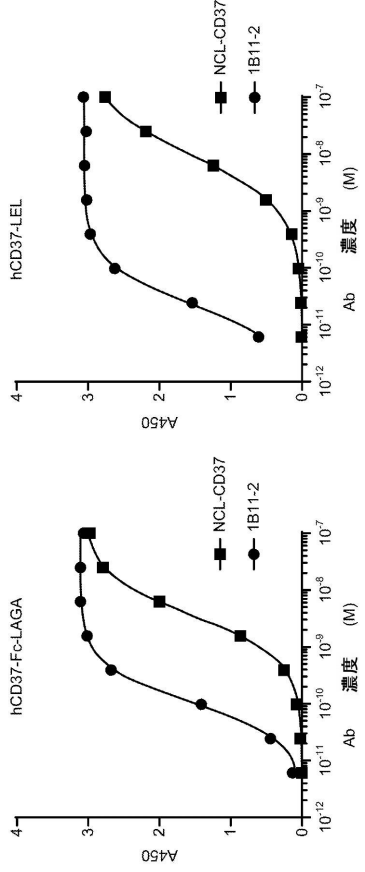
FIG. 1A

【 図 1 B 】

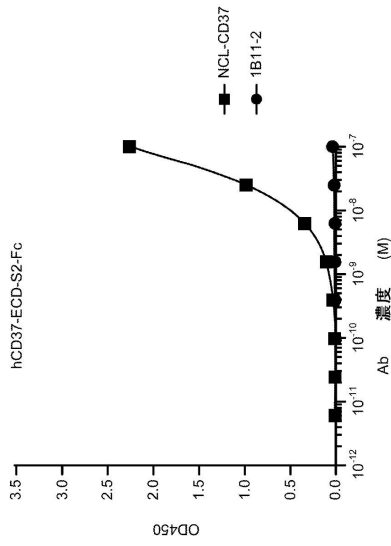
| 抗体             | 濃度        | hCD37-Fc-LAGA |      | hCD37-LEL |      |
|----------------|-----------|---------------|------|-----------|------|
|                |           | 未変性           | 変性還元 | 未変性       | 変性還元 |
| 1B11-2         | 上清        | 3.3           | 3.3  | 3.2       | 3.3  |
|                | 上清        | 3.2           | 3.2  | 3.2       | 3.2  |
| Leica NCL-CD37 | 10 µg/mL  | 2.9           | 3.3  | 2.7       | 3.3  |
|                | 5 µg/mL   | 2.5           | 3.2  | 2.4       | 3.2  |
|                | 2.5 µg/mL | 2.1           | 3.2  | 2.0       | 3.2  |

FIG. 1B

【 図 2 】



【 図 4 】



【 図 3 】

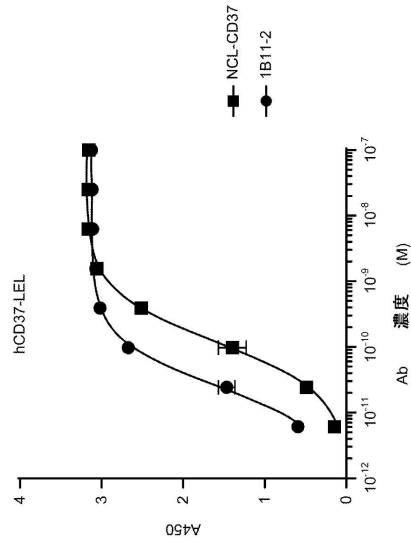


FIG. 2

FIG. 3

【 図 5 】

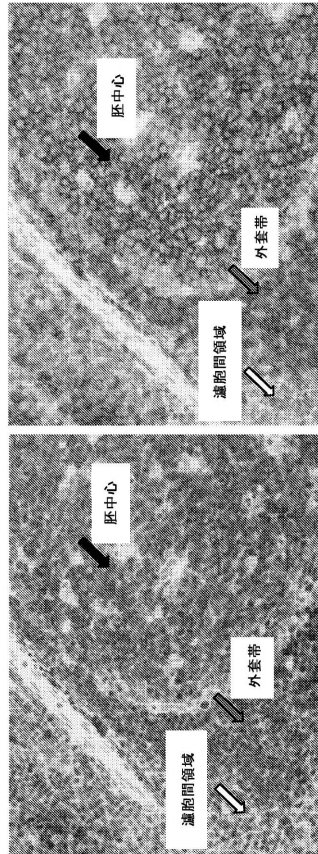


FIG. 4

FIG. 5

【 図 6 】

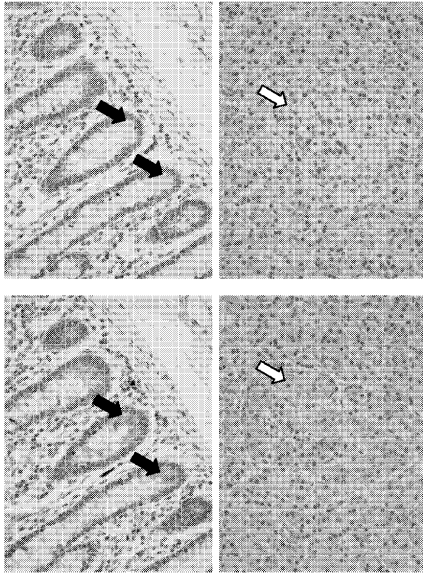


FIG. 6

【 図 7 】

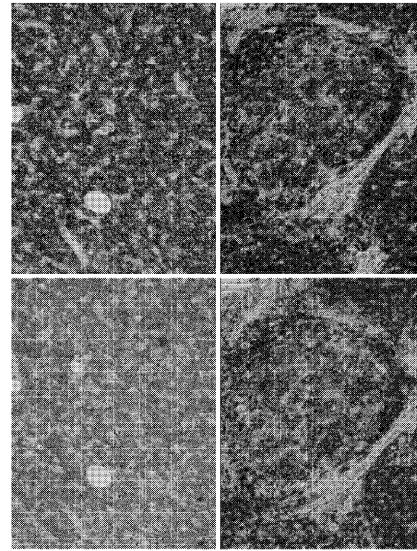


FIG. 7

【 図 8 】

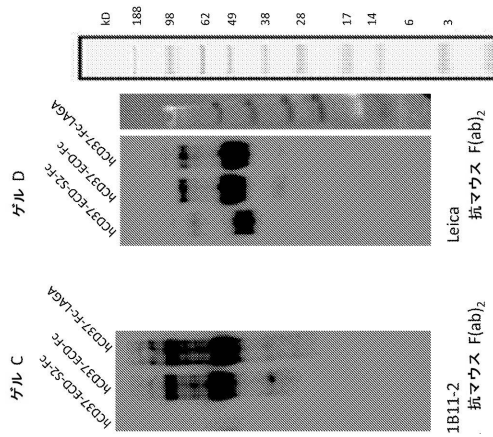


FIG. 8

【 図 9 】

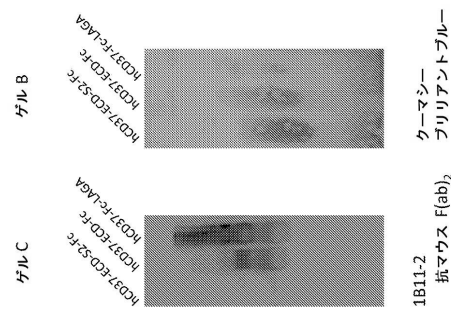


FIG. 9



【配列表】

0006890581000001.app

## フロントページの続き

|             |                  |         |                |
|-------------|------------------|---------|----------------|
| (51)Int.Cl. |                  | F I     |                |
| A 6 1 K     | 47/68 (2017.01)  | A 6 1 K | 31/5365        |
| A 6 1 P     | 35/00 (2006.01)  | A 6 1 K | 47/68          |
| A 6 1 P     | 35/02 (2006.01)  | A 6 1 P | 35/00          |
| G 0 1 N     | 33/53 (2006.01)  | A 6 1 P | 35/02          |
| G 0 1 N     | 33/543 (2006.01) | G 0 1 N | 33/53 D        |
| G 0 1 N     | 33/574 (2006.01) | G 0 1 N | 33/543 5 0 1 A |
| G 0 1 N     | 33/48 (2006.01)  | G 0 1 N | 33/574 A       |
| C 1 2 N     | 15/13 (2006.01)  | G 0 1 N | 33/574 D       |
| C 1 2 N     | 15/63 (2006.01)  | G 0 1 N | 33/48 P        |
|             |                  | C 1 2 N | 15/13          |
|             |                  | C 1 2 N | 15/63          |

微生物の受託番号 ATCC PTA-10664  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10665  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10666  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10667  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10668  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10669  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10670  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10722  
 微生物の受託番号 ATCC PTA-10723

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 デッカート, ジュタ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 2 0, レキシントン, イートン ロード 1 6

(72)発明者 タバレス, ダニエル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 7 6 0, ナティック, シルベスター ロード 2 7

(72)発明者 ルイ, リンコン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 9 3, ウェストン, アローヘッド ロード 1 1

(72)発明者 ローブリッチ, スベン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 5 3, ウォルサム, フレンド ストリート 2 0

(72)発明者 ケリー, メーガン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 0 3, バーリントン, プリティ スプリングス  
 ロード 3 7

審査官 西垣 歩美

(56)参考文献 特開2 0 1 2 - 1 6 5 7 6 0 ( J P , A )

特表2 0 1 3 - 5 2 4 7 7 7 ( J P , A )

Jutta Deckert, A novel anti-CD37 antibody-drug conjugate with multiple anti-tumor mechanisms for the treatment of B-cell malignancies, BLOOD, 2 0 1 3年, vol.122, No.20, p.3 500-3510

Karl-Heinz Heider, A novel Fc-engineered monoclonal antibody to CD37 with enhanced ADC C and high proapoptotic activity for treatment of B-cell malignancies, BLOOD, 2 0 1 1年, vol.118, No.15, p.4159-4168

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 1/00 - 19/00

C12N 5/10

C12P 21/08

CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/RESISTRY(STN)

JSTPLUS/JMEDPLUS/JST7580(JDreamIII)