

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2008-526205

(P2008-526205A)

(43) 公表日 平成20年7月24日(2008.7.24)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
C 07 K 16/28 (2006.01)	C 07 K 16/28	4 B 0 6 4
C 12 P 21/08 (2006.01)	C 12 P 21/08	4 B 0 6 5
C 07 K 16/46 (2006.01)	C 07 K 16/46	4 C 0 8 5
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	A 4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 159 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2007-549554 (P2007-549554)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・94080-4990・サウス・サン・フランシスコ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成17年12月23日 (2005.12.23)	(71) 出願人	592221528 バイオジェン・アイデック・エムエイ・インコーポレイテッド アメリカ合衆国、マサチューセッツ 02142、ケンブリッジ、ケンブリッジセンター 14
(85) 翻訳文提出日	平成19年7月23日 (2007.7.23)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(86) 國際出願番号	PCT/US2005/047072		
(87) 國際公開番号	W02006/073941		
(87) 國際公開日	平成18年7月13日 (2006.7.13)		
(31) 優先権主張番号	60/640,323		
(32) 優先日	平成16年12月31日 (2004.12.31)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B R 3 に結合するポリペプチド及びその使用

(57) 【要約】

本発明は、アンタゴニスト及びアゴニストポリペプチドを含む、新規の B R 3 結合抗体及びポリペプチドに関する。また、本発明は、治療方法、スクリーニング方法、診断方法、アッセイ及びタンパク質精製方法などにおける B R 3 結合抗体及びポリペプチドの使用に関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、ヒトエフェクター細胞存在下にて抗体依存性細胞障害(ADC C)を有するかないしは、ヒト野生型 Ig G Fc を含有する抗体と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて ADC C を亢進している抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 2】

ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、ヒト野生型 Ig G Fc を含有する抗体と比較して、ヒトエフェクター細胞存在下にて抗体依存性細胞性障害(ADC C)を減弱している抗体ないしはポリペプチド。

10

【請求項 3】

ヒト B R 3 細胞外ドメインに結合し、インビボの B 細胞を殺傷するか又は枯渇する抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 4】

前記の抗体ないしはポリペプチドが、該抗体ないしはポリペプチドで処理されていないネガティブコントロール又は基準レベルと比較して少なくとも 20 % インビボの B 細胞を殺傷又は枯渇する、請求項 3 に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 5】

前記の抗体ないしはポリペプチドが、該抗体ないしはポリペプチドで処理されていないネガティブコントロール又は基準レベルと比較して少なくとも 25 % 以上、 30 % 以上、 40 % 以上、 50 % 以上、 60 % 以上、 70 % 以上、 80 % 以上のインビボの血中 B 細胞を殺傷又は枯渇する、請求項 4 に記載の抗体ないしはポリペプチド。

20

【請求項 6】

前記抗体が、ヒト、カニクイザル及びアカゲザルの B 細胞からなる群から選択される少なくとも一の靈長類 B 細胞を枯渇することができる、請求項 4 又は 5 に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7】

ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、野生型又は天然配列の Ig G Fc を含有する抗体と比較して、インビボの半減期が増加している抗体ないしはポリペプチド。

30

【請求項 8】

前記抗体ないしはポリペプチドが、血清アルブミン、血清アルブミン結合ポリペプチド又は非タンパク質ポリマーにコンジュゲートされている、請求項 3 に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 9】

前記の抗体ないしはポリペプチドが、野生型 Ig G Fc 領域と比較して変更した Fc 領域を含有する、請求項 1 ないし 7 の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 10】

前記の抗体ないしはポリペプチドが、野生型 Ig G Fc 領域を含有する抗体と比較して、pH 6.0 でのヒト Fc 新生児レセプター(FcRn)に対する親和性が高く、変更した Fc 領域を含有する、請求項 7 に記載の抗体ないしはポリペプチド。

40

【請求項 11】

残基 L 3 8 及び R 3 9 を含有する、ヒト B R 3 上に機能的なエピトープを有するヒト化抗体又はヒト抗体。

【請求項 12】

残基 G 3 6 を含有する、ヒト B R 3 上に機能的なエピトープを有するヒト化抗体又はヒト抗体。

【請求項 13】

残基 L 2 8 及び V 2 9 を含有する、ヒト B R 3 上に機能的なエピトープを有する抗体。

【請求項 14】

残基 P 2 1 及び A 2 2 を含有する、ヒト B R 3 上に機能的なエピトープを有する抗体。

50

【請求項 15】

残基 F 2 5、 V 3 3、 A 3 4 を含有し、場合によって残基 R 3 0 をさらに含有する、ヒト B R 3 上に機能的なエピトープを有するヒト化抗体又はヒト抗体。

【請求項 16】

ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、マウス B R 3 細胞外ドメイン配列に 5 0 0 n M 以下、 1 0 0 n M 以下、 5 0 n M 以下、 1 0 n M 以下、 5 n M 以下又は 1 n M 以下の見かけの K d 値で結合する抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 17】

ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に、 2 5 での B I A c o r e アッセイにおける F a b として 1 0 0 u M 以下、 1 u M 以下、 5 0 0 n M 以下、 1 0 0 n M 以下、 5 0 n M 以下、 1 0 n M 以下、 5 n M 以下又は 1 n M 以下の見かけの K d 値で結合する請求項 1 ないし 1 4 の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 18】

表 2 に記載の抗体の何れか一に由来し、ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に、 2 5 での B I A c o r e アッセイにおける F a b として 1 0 0 u M 以下、 1 u M 以下、 5 0 0 n M 以下、 1 0 0 n M 以下、 5 0 n M 以下、 1 0 n M 以下、 5 n M 以下又は 1 n M 以下の見かけの K d 値で結合する抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 19】

ヒト細胞外 B R 3 配列に結合し、表 2 に記載の抗体の何れか一の H 1、 H 2 及び H 3 領域のそれぞれに少なくとも 7 0 % の相同性を有する H 1、 H 2 及び H 3 領域を有するヒト化抗体又はヒト抗体。

【請求項 20】

ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、表 2 に記載の抗体の何れか一の L 1、 L 2 及び L 3 領域のそれぞれに少なくとも 7 0 % の相同性を有する L 1、 L 2 及び L 3 領域を有するヒト化抗体又はヒト抗体。

【請求項 21】

ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、表 2 に記載の抗体の何れか一の V H ドメインに少なくとも 7 0 % の相同性を有するヒト抗体又はヒト化抗体。

【請求項 22】

ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、配列番号 4 - 1 3、 1 5、 1 6 - 1 8、 2 0 30 、 2 2、 2 4、 2 6、 2 8 - 7 3、 7 5 - 7 6、 7 8、 8 0 - 8 5、 8 7 - 9 6、 9 8、 1 0 0、 1 0 2、 1 0 4、 1 0 6、 1 0 7、 1 0 9 - 1 1 0、 1 1 2、 1 1 6、 1 1 8、 1 2 0、 1 2 2、 1 2 4 - 1 2 7 及び 1 2 9 - 1 3 1 の何れか一の H 3 配列を含有してなるヒト抗体又はヒト化抗体。

【請求項 23】

さらに、表 2 に開示される抗体の何れか一の H 1、 H 2 及び H 3 の配列を含有してなる、請求項 2 2 に記載の抗体。

【請求項 24】

さらに、表 2 に開示される抗体の何れか一の L 1、 L 2 及び L 3 の配列を含有してなる、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 25】

(1) QVRRALDY (配列番号 2 1 2) を含有する H 3 高頻度可変領域(H V R 3)；と(2) R DTSKNTF (配列番号 2 1 0) を含有する重鎖フレームワーク 3 領域(H C - F R 3)を含んでなる抗 B R 3 抗体。

【請求項 26】

さらに、 H 1 高頻度可変領域(H V R 1)内に残基 GFTVTAYYMS (配列番号 2 1 4) と H 2 高頻度可変領域(H V R 2)内に残基 GFIRDKANGYTTEYNPSVKG (配列番号 2 1 3) を含んでなる、請求項 2 5 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 27】

さらに、配列番号 6 - 9、 1 6 - 1 8、 3 5 - 3 6、 7 5 - 7 6 及び 8 1 - 8 5 の何れ

10

20

30

40

50

か一の抗体配列の残基番号 49 - 65 (カバット番号付け)を含有する HVR2 と残基番号 26 - 35 を含有する HVR1 とを含んでなる、請求項 25 に記載の抗 BR3 抗体。

【請求項 28】

(1) QVRRALDY (配列番号 212)を含有する H3 高頻度可変領域 (HVR3)；と (2) RDTSKNTL (配列番号 211)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (HC-FR3)を含んでなる抗 BR3 抗体。

【請求項 29】

さらに、配列番号 5、11 - 13 及び 37 - 73 の抗体配列の何れか一の残基番号 26 - 35 及び 49 - 65 (カバット番号付け)を含有してなる、請求項 28 に記載の抗 BR3 抗体。

10

【請求項 30】

(1) QVRRALDY (配列番号 212)を含有する H3 高頻度可変領域 (HVR3)；と (2) W-A-X3-X4-X5-X6-S (配列番号 215)を含有する L1 高頻度可変領域 (LVR1)を含んでなり、X3がQ又はSであり、X4がH又はIであり、X5がL又はRであり、X6がD又はEである、抗 BR3 抗体。

【請求項 31】

(1) QVRRALDY (配列番号 212)を含有する H3 高頻度可変領域 (HVR3)；と (2) X1-X2-P-X4-X5-G-X7-Y-X9-S (配列番号 216)を含有する H1 高頻度可変領域 (HVR1)を含んでなり、X1がG又はDであり、X2がL又はSであり、X4がM、R又はVであり、X5がA又はSであり、X7がF、H又はYであり、X9がT又はIであり、抗 BR3 抗体。

20

【請求項 32】

(1) QVRRALDY (配列番号 212)を含有する H3 高頻度可変領域 (HVR3)；(2) 配列番号 215 の配列を含有する LVR1 と、(3) 配列番号 216 の配列を含有する HVR1 を含んでなる BR3 結合抗体。

【請求項 33】

(1) 配列 X1-X2-X3-X4-X5-G-A-M-D-Y (配列番号 217)を含有し、X1がT、N又はRであり、X2がT、S、L、N又はPであり、X3がL又はNであり、X4がP、F、L、Y又はNであり、X5がD又はYである、HVR3 と、(2) RDTSKNTF (配列番号 210)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (HC-FR3)とを含んでなる BR3 抗体。

30

【請求項 34】

前記 HVR3 が配列番号 6 - 9 及び 16 - 18 の何れか一の抗体の残基番号 94 - 102 (カバット番号付け)を含有する、請求項 33 に記載の抗 BR3 抗体。

【請求項 35】

(1) 配列 X1-X2-X3-X4-X5-G-X7-M-D-Y (配列番号 218)を含有し、X1がT又はNであり、X2がA、T又はSであり、X3がN、H又はLであり、X4がP、F、Y又はNであり、X5がT又はYであり、X7がA又はEである、HVR3 と、(2) RDTSKNTL (配列番号 211)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (HC-FR3)とを含んでなる抗 BR3 抗体。

【請求項 36】

前記 HVR3 が配列番号 5 及び 10 - 13 の何れか一の抗体の残基番号 94 - 102 (カバット番号付け)を含有する、請求項 35 に記載の抗 BR3 抗体。

40

【請求項 37】

配列番号 7 - 13 及び 16 - 18 の何れか一の抗体配列の残基番号 94 - 102 (カバット番号付け)を含有する HVR3 を含んでなる BR3 結合抗体。

【請求項 38】

(1) 配列番号 81 - 83 の何れか一の抗体配列の残基 94 - 102 (カバット番号付け)を含有する HVR3 と、(2) RDTSKNTF (配列番号 210)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (HC-FR3)を含んでなる抗 BR3 抗体。

【請求項 39】

RVCYN-X6-LGVCAGGMDY (配列番号 220)を含有し、X6 が R 又は H である HVR3 を含んでなる抗 BR3 抗体。

50

【請求項 4 0】

さらに、配列番号 8 6、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、1 0 8、1 1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3 及び 1 9 4 - 2 0 7 の何れか一の抗体配列の残基 2 4 - 3 4、残基 4 9 - 5 5 及び残基 8 9 - 9 7 (カバット番号付け)をそれぞれ含有する L V R 1、L V R 2 及び L V R 3 を含んでなる、請求項 3 9 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 4 1】

配列番号 7 - 1 3、1 6 - 1 8、2 4、2 6 - 7 3、7 5 - 7 6、7 8、8 0 - 8 5、8 7 - 9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 4、1 0 6、1 0 7、1 0 9 - 1 1 0、1 1 2、1 1 4、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4 - 1 2 7、1 2 9 及び 1 9 3 の何れか一の抗体配列の残基番号 2 6 - 3 5、4 9 - 6 5 及び 9 4 - 1 0 2 (カバット番号付け)をそれぞれ含有する H 1、H 2 及び H 3 を含んでなる抗 B R 3 抗体。

【請求項 4 2】

残基 QVRRALDY (配列番号 2 1 2) を含有する H 3 ; 残基 GFTVTAYYMS (配列番号 2 1 4) を含有する H 1 と、残基 GFIRDKANGYTTEYNPSVK (配列番号 2 1 3) を含有する H 2 を含んでなる、ヒト化抗 B R 3 抗体。

【請求項 4 3】

残基 RVCYNRLGVCAGGMDY (配列番号 2 2 1) を含有する H 3 ; 残基 SGFTISSLNSIH (配列番号 2 2 2) を含有する H 1 と、残基 AWITPSDGNTD (配列番号 2 2 3) を含有する H 2 を含んでなる抗 B R 3 抗体。

【請求項 4 4】

RVCYNRLGVCAGGMDY (配列番号 2 2 1) を含有する H 3 ; 残基 SGFTISSLSSIH (配列番号 2 2 4) を含有する H 1 と AWVLPSVGFTD (配列番号 2 2 3) を含有する H 2 を含んでなる抗 B R 3 抗体。

【請求項 4 5】

3.1 (ATCC 寄託 P T A - 6 6 2 2) 又は 1 2 B 1 2.1 (ATCC 寄託 P T A - 6 6 2 4) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体のヒト B R 3 の細胞外ドメインへの結合を競合的に阻害することができる B R 3 結合抗体。

【請求項 4 6】

前記抗体が 3.1 (ATCC 寄託 P T A - 6 6 2 2) 又は 1 2 B 1 2.1 (ATCC 寄託 P T A - 6 6 2 4) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体の可変領域配列を含有する、請求項 4 5 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 4 7】

前記抗体が 3.1 (ATCC 寄託 P T A - 6 6 2 2) 又は 1 2 B 1 2.1 (ATCC 寄託 P T A - 6 6 2 4) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体の高頻度可変領域配列を含有する、請求項 4 5 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 4 8】

前記抗体が 3.1 (ATCC 寄託 P T A - 6 6 2 2) 又は 1 2 B 1 2.1 (ATCC 寄託 P T A - 6 6 2 4) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体のヒト化型である、請求項 4 5 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 4 9】

配列番号 1 3、1 5、1 6 - 1 8、2 2、2 4、2 6、2 8 - 7 3、7 5 - 7 6、7 8、8 0 - 8 5、8 7 - 9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 4、1 0 6、1 0 7、1 0 9 - 1 1 0、1 1 2、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4 - 1 2 7 及び 1 2 9 - 1 3 1 の何れか一の V_H 配列を含有してなる抗体。

【請求項 5 0】

配列番号 3、1 4、2 1、2 3、2 5、2 7、7 4、7 7、7 9、8 6、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、1 0 8、1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3 及び 1 2 8 の何れか一の V_L 配列を含有してなる抗体。

【請求項 5 1】

10

20

30

40

50

前記抗体が、ヒトB R 3細胞外ドメイン配列に、25でのB I A c o r eアッセイにおけるF a bとして、500nM以下、100nM以下、50nM以下、10nM以下、5nM以下又は1nM以下の見かけのK d値で結合する、請求項19ないし27の何れか一に記載の抗体。

【請求項52】

前記抗体が、ヒトB R 3細胞外ドメイン配列に、25でのB I A c o r eアッセイにおけるF a bとして、500nM-0.001pMの間の見かけのK d値で結合する、請求項1ないし27の何れか一に記載の抗体。

【請求項53】

前記抗体ないしはポリペプチドがヒトI g GのF c領域を含有する、請求項1ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。 10

【請求項54】

前記抗体ないしはポリペプチドがヒトI g G 1又はヒトI g G 3のF c領域を含有する、請求項3ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはイムノアドヘシン。

【請求項55】

前記抗体ないしはポリペプチドがヒトI g G 4のF c領域を含有する、請求項2ないし27の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項56】

前記抗体ないしはポリペプチドが細胞表面上の天然のB R 3ポリペプチドへのB A F Fの結合を阻害する、請求項1、3ないし21、25ないし44及び49ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。 20

【請求項57】

前記抗体ないしはポリペプチドがB細胞増殖及びB細胞生存を阻害する、請求項1、3ないし21及び25ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項58】

前記抗体ないしはポリペプチドがインビボでB細胞を殺傷又は枯渇する、請求項1、7ないし21及び25ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項59】

前記抗体ないしはポリペプチドが、ヒトエフェクター細胞存在下にて抗体依存性細胞障害(A D C C)を有するかないしは、ヒト野生型I g G 1 F cを含有する抗B R 3抗体と比較してヒトエフェクター細胞存在下にてA D C Cを亢進している、請求項3ないし21及び25ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。 30

【請求項60】

前記抗体ないしはポリペプチドが、ヒト野生型I g G 1 F cを含有する抗B R 3抗体と比較して、ヒトエフェクター細胞存在下にて抗体依存性細胞障害(A D C C)を減弱している、請求項3ないし21及び25ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項61】

B細胞増殖及びB細胞生存を刺激するB R 3結合抗体ないしはポリペプチド。

【請求項62】

前記ポリペプチドがA D C Cエフェクター機能を有さない、請求項61に記載のB R 3結合抗体ないしはポリペプチド。 40

【請求項63】

前記ポリペプチドがヒトI g GのF c領域を含有する、請求項61に記載のB R 3結合抗体ないしはポリペプチド。

【請求項64】

前記F c領域がD 2 6 5 A及びN 2 9 7 Aの変異(E U番号システム)を有する、請求項63に記載のB R 3結合抗体ないしはポリペプチド。

【請求項65】

前記F c領域がD 2 6 5 A及びN 2 9 7 Aの変異(E U番号システム)を有する、請求項 50

2に記載のB R 3結合抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 6 6】

F c領域内の残基の番号付けがE U番号付けシステムに従った場合、F c領域の238、239、246、248、249、250、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、297、298、301、303、305、307、309、312、314、315、320、322、324、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、428、430、434、435、437、438及び439からなる群から選択される位置の何れか一又は何れかの組合せのアミノ酸を置換することによって、野生型IgG F c配列と比較して、抗体ないしはポリペプチドの薬物動態学的性質及び/又はCDC、ADCCを変化するために変更されているF c領域を含有する、請求項1ないし65の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。
10

【請求項 6 7】

前記置換がN434A、N434Y、N343F、N434Hからなる群から選択される、請求項66に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 6 8】

前記F c領域が配列番号134であり、XがA、W、H、Y及びFからなる群から選択される何れかのアミノ酸である、請求項66に記載の抗体ないしはポリペプチド。
20

【請求項 6 9】

前記抗体ないしはイムノアドヘシンが、置換K246H、H268D、E283L、S324G、S239D及びI332Eの少なくとも何れか一又は何れかの組合せを含有するヒトIgGのF c領域を含んでなる、請求項1及び3ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7 0】

前記抗体ないしはイムノアドヘシンが、置換S298A、K326A、E333A及びK334Aの少なくとも何れか一又は何れかの組合せを含有するヒトIgGのF c領域を含んでなる、請求項1及び3ないし52の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。
30

【請求項 7 1】

細胞障害性剤又は化学療法剤にコンジュゲートされた、請求項1ないし70の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7 2】

前記細胞障害性剤が放射性同位体又は毒素である、請求項71に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7 3】

前記抗体がCHO細胞内で産生される、請求項1ないし72の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7 4】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項1ないし73の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。
40

【請求項 7 5】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項1ないし74の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7 6】

前記抗体がヒト抗体である、請求項1ないし75の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7 7】

前記抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂、一本鎖Fv(scfv)、Fv断片；ダイ
50

アボディ及び線状抗体からなる群から選択されるものである、請求項 1 ないし 7 6 の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7 8】

前記抗体が多特異的抗体である、請求項 1 ないし 7 7 の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチド。

【請求項 7 9】

請求項 1 ないし 7 8 の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチドをコードする単離された核酸分子。

【請求項 8 0】

請求項 1 ないし 7 9 の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチドをコードする発現ベクター。

【請求項 8 1】

請求項 7 9 に記載の核酸分子又は該核酸分子を含有する発現ベクターを含んでなる宿主細胞。

【請求項 8 2】

請求項 1 ないし 8 1 の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチドを產生する請求項 8 1 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 3】

C H O 細胞である、請求項 8 2 に記載の宿主細胞。

【請求項 8 4】

請求項 8 1 に記載の細胞を培養し、該細胞培養物から抗体ないしはポリペプチドを回収することを含む、請求項 1 ないし 8 3 の何れか一に記載の抗体ないしはポリペプチドの產生方法。

【請求項 8 5】

請求項 1 ないし 8 4 の何れか一に記載の B R 3 結合抗体ないしはポリペプチドと担体を含有してなる組成物。

【請求項 8 6】

さらに、細胞障害性剤、化学療法剤、生物学的応答モディファイア、免疫抑制剤及び抗 C D 2 0 抗体からなる群から選択される少なくとも一の付加的治療剤を含有する、請求項 8 5 に記載の組成物。

【請求項 8 7】

容器と容器に包含される組成物を具備し、該組成物が請求項 1 ないし 8 6 の何れか一に記載の抗体を含有するものである、製造品。

【請求項 8 8】

さらに、前記組成物が疾患を治療するために使用することができることを指示するパッケージ挿入物を具備する、請求項 8 7 に記載の製造品。

【請求項 8 9】

前記疾患が、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(S L E)、シェーグレン症候群、多発性硬化症、非ホジキンリンパ腫、 A L L 、 C L L 、広汎性大 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫及び多発性骨髄腫からなる群から選択されるものである、請求項 8 8 に記載の製造品。

【請求項 9 0】

B R 3 陽性癌に罹患した患者に治療的有効量の本発明の B R 3 結合抗体ないしはポリペプチドを投与することを含む、 B R 3 陽性癌の治療方法。

【請求項 9 1】

前記 B R 3 結合抗体ないしはポリペプチドが、請求項 1 ないし 1 8 、 2 2 ないし 5 2 、 6 6 ないし 7 8 の何れか一に記載の抗体及びポリペプチドからなる群から選択される少なくとも一の B R 3 結合抗体ないしはポリペプチド；請求項 1 9 ないし 2 4 の何れか一に記載の何れかのアンタゴニスト B R 3 結合抗体又は表 2 に記載のアンタゴニスト B R 3 結合抗体である、請求項 9 0 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 9 2】

B細胞腫瘍に罹患した患者に、治療的有効量の本発明のB R 3結合抗体ないしはポリペプチドを投与することを含む、B細胞腫瘍の治療方法。

【請求項 9 3】

前記B R 3結合抗体ないしはポリペプチドが、請求項1ないし18、25ないし52及び66ないし78の何れか一に記載の抗体及びポリペプチドからなる群から選択される少なくとも一のB R 3結合抗体ないしはポリペプチド；請求項19ないし24の何れか一に記載のアンタゴニストB R 3結合抗体又は表2に記載のアンタゴニストB R 3結合抗体である、請求項92に記載の方法。

【請求項 9 4】

自己免疫性疾患に罹患した患者に、治療的有効量の本発明のB R 3結合抗体を投与することを含む、自己免疫性疾患の治療方法。

【請求項 9 5】

前記B R 3結合抗体ないしはポリペプチドが、請求項1ないし18、25ないし52及び66ないし78の何れか一に記載の抗体及びポリペプチドからなる群から選択される少なくとも一のB R 3結合抗体ないしはポリペプチド；請求項19ないし24の何れか一に記載のアンタゴニストB R 3結合抗体又は表2に記載のアンタゴニストB R 3結合抗体である、請求項68に記載の方法。

【請求項 9 6】

癌に罹患した患者に、治療的有効量の本発明のB R 3結合抗体を投与することを含む、癌の治療方法。

【請求項 9 7】

前記B R 3結合抗体ないしはポリペプチドが、請求項1ないし18、25ないし52及び66ないし78の何れか一に記載の抗体及びイムノアドヘシンからなる群から選択される少なくとも一のB R 3結合抗体ないしはイムノアドヘシン；請求項19ないし24の何れか一に記載のアンタゴニストB R 3結合抗体又は表2に記載のアンタゴニストB R 3結合抗体である、請求項96に記載の方法。

【請求項 9 8】

B細胞数を減少するために有効な量の請求項1ないし97の何れか一に記載のB R 3結合抗体ないしはポリペプチドと、混合した細胞集団を接触させることを含む、混合細胞集団からB細胞を枯渇する方法。

【請求項 9 9】

前記B R 3結合抗体ないしはポリペプチドが、請求項1ないし18、25ないし52及び66ないし78の何れか一に記載の抗体及びポリペプチドからなる群から選択される少なくとも一のB R 3結合抗体ないしはポリペプチド；請求項19ないし24の何れか一に記載のアンタゴニストB R 3結合抗体又は表2に記載のアンタゴニストB R 3結合抗体である、請求項72に記載の方法。

【請求項 1 0 0】

B細胞数を減少するために有効な量の、ヒトエフェクター細胞の存在下にてADC Cエフェクター機能を有するかないしはADC Cエフェクター機能を亢進する請求項1ないし99の何れか一に記載のB R 3結合抗体ないしはポリペプチドと、混合した細胞集団を接触させることを含む、混合細胞集団からB細胞を枯渇する方法。

【請求項 1 0 1】

B細胞数を減少するために有効な量の、ヒトエフェクター細胞の存在下にてADC Cエフェクター機能を有するかないしはエフェクター機能を亢進し、細胞表面上のB R 3へのBAFF結合をブロックする請求項1ないし100の何れか一に記載のB R 3結合抗体ないしはポリペプチドと、混合した細胞集団を接触させることを含む、混合細胞集団からB細胞を枯渇する方法。

【請求項 1 0 2】

さらに、治療的有効量の抗CD20抗体とB R 3結合抗体ないしはポリペプチドとが連

10

20

30

40

50

続して又は同時に投与される工程を含む、請求項 9 0 ないし 9 7 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 0 3】

さらに、混合した細胞集団に、抗 C D 2 0 抗体と B R 3 結合抗体ないしはポリペプチドとを連続して又は同時に接觸させる工程を含む、請求項 9 8 ないし 1 0 1 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 0 4】

前記 B R 3 結合抗体ないしはポリペプチドが A D C C エフェクター機能を変更している、請求項 9 0 ないし 9 7 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 0 5】

前記抗 B R 3 抗体が細胞表面上の B R 3 への B A F F 結合をブロックする、請求項 1 0 1 又は 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 6】

前記 C D 2 0 結合抗体がリツキサン(登録商標)抗体である、請求項 1 0 1 又は 1 0 2 に記載の方法。

【請求項 1 0 7】

さらに、B A F F アンタゴニスト、生物学的応答モディファイア、B 細胞枯渇薬剤、細胞障害性剤、化学療法剤及び免疫抑制剤からなる群の少なくとも一の治療的有効量が連続して又は同時に投与されることを含む、請求項 9 0 ないし 9 7 の何れか一に記載の治療方法。

【請求項 1 0 8】

さらに、B A F F アンタゴニスト、生物学的応答モディファイア、B 細胞枯渇薬剤、細胞障害性剤、化学療法剤及び免疫抑制剤からなる群の少なくとも一の治療的有効量が連続して又は同時に投与されることを含む、請求項 9 8 ないし 1 0 1 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 0 9】

前記 B A F F アンタゴニストが、B R 3 - F c、T A C I - F c、B C M A - F c、抗 B A F F ペプチボディ、抗 B A F F 抗体及び抗 B R 3 抗体からなる群から選択されるものである、請求項 1 0 7 又は請求項 1 0 8 に記載の方法。

【請求項 1 1 0】

前記癌が、非ホジキンリンパ腫(N H L)、リンパ球優性ホジキン病(L P H D)、濾胞性リンパ腫、多発性骨髄腫、A L L 、C L L 及び広汎性大 B 細胞リンパ腫からなる群から選択されるものである、請求項 9 0 又は 9 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 1】

前記抗体が 9 . 1 抗体又は V 3 - 1 抗体由来である、請求項 9 0 ないし 1 0 1 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 1 2】

前記抗体が 9 . 1 R F の重鎖可変ドメイン(配列番号 3 5)を含有する、請求項 9 0 ないし 1 0 1 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 1 3】

前記抗体が V 3 - 4 6 s R F の重鎖可変ドメイン(配列番号 1 2 7)を含有する、請求項 9 0 ないし 1 0 1 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 1 4】

前記癌が非ホジキンリンパ腫(N H L)であり、化学療法剤がドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン及びプレドニソロンからなる群から選択されるものである、請求項 9 2 に記載の方法。

【請求項 1 1 5】

前記自己免疫性疾患が、関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(S L E)、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病(I T P)、血栓性血小板減少性紫斑病(T T P)、自己免疫性血小板減少、多発性硬化症、乾癬、I g A ネ

10

20

30

40

50

フロパシ、IgM多発性神経炎、重症筋無力症、血管炎、真正糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群及び糸球体腎炎からなる群から選択されるものである、請求項94に記載の方法。

【請求項116】

前記自己免疫性疾患が関節リウマチである、請求項115に記載の方法。

【請求項117】

前記免疫抑制剤がメトトレキセートである、請求項108に記載の方法。

【請求項118】

前記抗体ないしはポリペプチドが細胞障害性剤又は化学療法剤にコンジュゲートされる、請求項90ないし115の何れか一に記載の方法。 10

【請求項119】

前記細胞障害性剤が放射性同位体又は毒素である、請求項119に記載の方法。

【請求項120】

前記BR3結合抗体が、野生型IgGFcを有する抗体と比較して、ヒトFcRnに対する結合親和性を亢進している、請求項90ないし115の何れか一に記載の方法。

【請求項121】

免疫不全疾患に罹患している患者に、治療的有効量のアゴニストBR3結合抗体ないしはポリペプチドが投与されることを含む、自己免疫性疾患の治疗方法。

【請求項122】

前記抗体ないしはポリペプチドが2.1抗体に由来する、請求項90ないし101及び121の何れか一に記載の方法。 20

【請求項123】

前記抗体が2.1-4.6の重鎖可変ドメインを含有する、請求項121に記載の方法。

【請求項124】

前記BR3結合抗体ないしはポリペプチドが配列番号133及び135ないし142の何れか一のIgGFc領域を含有する、請求項121に記載の方法。

【請求項125】

前記BR3結合抗体ないしはポリペプチドが、N434A、N434F、N434Y及びN434Hからなる群から選択される少なくとも一の434での置換(EU番号付けシステム)を有するヒトIgG1Fc領域を含有する、請求項121に記載の方法。 30

【請求項126】

前記ヒトIgG1Fc領域が配列番号134であり、XがA、W、F、Y又はHである、請求項125に記載の方法。

【請求項127】

前記アゴニストBR3結合抗体ないしはポリペプチドが、天然のヒトIgG野生型Fcと比較して、ADCC活性を減弱している、請求項121に記載の方法。

【請求項128】

前記抗体ないしはポリペプチドが、D265A/N297A置換(EU番号付けシステム)を有するヒトIgG1Fc配列を含有する、請求項121に記載の方法。

【請求項129】

前記アゴニストBR3結合抗体がHu2.1-4.6又はHu2.1-4.6.DANAである、有効121に記載の方法。 40

【請求項130】

前記BR3結合抗体がモノクローナル抗体である、請求項90ないし129の何れか一に記載の方法。

【請求項131】

前記BR3結合抗体がヒト化抗体である、請求項90ないし129の何れか一に記載の方法。

【請求項132】

前記BR3結合抗体がヒト抗体である、請求項90ないし129の何れか一に記載の方 50

法。

【請求項 1 3 3】

前記 B R 3 結合抗体が、 F a b 、 F a b ' 、 F (a b)' 2 、一本鎖 F v (s c F v)、 F v 断片；ダイアボディ及び線状抗体からなる群から選択されるものである、請求項 9 0 ないし 1 2 9 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 3 4】

前記抗体が多特異的抗体である、請求項 1 ないし 1 3 3 の何れか一に記載の方法。

【請求項 1 3 5】

前記 B R 3 結合抗体がさらに血清アルブミン結合ペプチドを含有する、請求項 9 0 ないし 1 2 9 の何れか一に記載の方法。

10

【請求項 1 3 6】

請求項 1 ないし 1 3 5 の何れか一に記載の抗体を B R 3 と接触させて抗体を回収する工程を含む、 B R 3 を単離する方法。

【請求項 1 3 7】

請求項 1 ないし 1 3 6 の何れか一に記載の B R 3 抗体をヒスチジンバッファ中に含有する液体製剤。

【請求項 1 3 8】

前記バッファが酢酸ヒスチジンバッファである、請求項 1 3 7 に記載の液体製剤。

【請求項 1 3 9】

B 細胞増殖のインヒビターのスクリーニング方法であって、

20

(a) 請求項 1 ないし 1 3 8 の何れか一に記載の B R 3 アゴニスト抗体により B 細胞を刺激する

(b) 候補化合物を投与する；そして、

(c) 細胞増殖を検出する

工程を含む、方法。

【請求項 1 4 0】

B R 3 経路の下流マーカを同定してモニタリングする方法であって、

(a) 請求項 1 ないし 1 3 9 の何れか一に記載の B R 3 アゴニスト抗体により B 細胞を刺激する；そして

(b) 細胞内での遺伝子発現における変化を検出する

30

工程を含む、方法。

【請求項 1 4 1】

自己免疫性疾患又は癌の診断方法であって、

(a) 本発明の B R 3 結合抗体ないしはポリペプチドと試験被検体からの生物学的試料を接触する；

(b) 生物学的試料中の B R 3 ポリペプチドのレベルをアッセイする；そして

(c) B R 3 タンパク質の標準レベルと生物学的試料中の B R 3 ポリペプチドのレベルを比較する

ことを含み、 B R 3 タンパク質の標準レベルと比較して B R 3 タンパク質のレベルにおける存在又は増加によって B R 3 結合治療によって治療される自己免疫性疾患又は癌が示唆される、方法。

40

【請求項 1 4 2】

試験試料又は被検体における本発明の抗 B R 3 抗体ないしはポリペプチドを結合する工程と、コントロール抗体又はポリペプチドと比較して結合した抗体ないしはポリペプチドを比較する工程を含む、 B R 3 ポリペプチドの検出方法。

【請求項 1 4 3】

前記抗体ないしはポリペプチドが、 F A C S 分析、免疫組織化学アッセイ(I H C)及び E L I S A アッセイからなる群から選択されるアッセイに使用される、請求項 1 4 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

50

【発明の開示】

【0001】

(発明の分野)

本発明は、BR3に結合する抗体及びポリペプチドとその使用に関する。

【0002】

(発明の背景)

BAFF(BLyS、TALL-1、THANK、TNFSF13B又はzTNF4としても知られる)は、B細胞生存および成熟に必須であるTNFリガンドスーパーファミリーのメンバーである(Mackay & Browning (2002) *Nature Rev. Immunol.* 2, 465-475に概説される)。トランスジェニックマウスのBAFF過剰発現により、B細胞過形成と重篤な自己免疫性疾患が起こる(Mackay, 等 (1999) *J. Exp. Med.* 190, 1697-1710; Gross, 等 (2000) *Nature* 404, 995-999; Khare, 等 (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 3370-33752-4)。BAFFレベルは、様々な自己免疫性疾患、例えば全身性エリテマトーデス、関節リウマチ、ウェゲナー肉芽腫症及びシェーグレン症候群を有するヒト患者において上昇している(Cheema, G. S. 等, (2001) *Arthritis Rheum.* 44, 1313-1319; Groom, J. 等, (2002) *J. Clin. Invest.* 109, 59-68; Zhang, J., 等, (2001) *J. Immunol.* 166, 6-10; Krumbholz 等, ANCA Workshop, Prague, Czech Republic, 2003)。さらに、BAFFレベルは疾患の重症度と相関することから、BAFFがこれらの疾患の病理発生において直接的な役割を果たしうることが示唆される。コラーゲン誘導性関節炎(CIA)、狼瘡(例えばBWF1マウス)、多発性硬化症(例えば実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE))の動物モデルにおけるBAFF遮断によって疾患が寛解する。慢性移植片対宿主病(cGVHD)モデルのBR3:Fc治療は、B細胞活性化を阻止(ロック)するのではなくB細胞生存を阻害することによって、cGVHDと関係している脾腫を有意に阻害した(Kalled, SL 等 (2005) *Curr Dir Autoimmun.* 8: 206-42)。ゆえに、BAFF遮断は強いB細胞成分を有する自己免疫の他の動物モデルに有効であるようである。

【0003】

さらに、CD4+及びCD8+のT細胞が、タイプIおよびタイプIIサイトカインを生産して、CD25発現を増やすように組換えたBAFFによって同時に刺激されうることが報告されている(Ng, LG, et al. 2004. *J Immunol* 173:807)。さらに、報告されることには、BAFF-R:FcはBAFF媒介性ヒトT細胞増殖を遮断した(Huard, B, 等, (2000) *J Immunol* 167:6225)。またさらに、Bリンパ球悪性腫瘍患者の中には、BAFFのレベルが上昇しているものがいる (Kern, C 等, (2004) *Blood* 103(2): 679-88)。ある報告によると、可溶性BAFF又はAPRILを加えると、B-CLL細胞が自然発生的で薬剤誘発性アポトーシスから保護され、NF-B活性化を刺激した。逆に、可溶性BCMA-Fc又は抗BAFF及び抗APRIL抗体を加えると、B-CLLアポトーシスが亢進された(Kern, C 等, 上掲)。BAFFは、悪性B細胞に必須の自己分泌性生存因子として働きうる(Mackay F, 等, (2004) *Curr Opin Pharmacol.* 4(4): 347-54)。したがって、BAFFは様々な疾患状態と関連していた。

【0004】

BAFFは、TNFレセプタースーパーファミリーの3つのメンバーである、TACI、BCMA及びBR3(別名BAFF-R)と結合する (Gross, 等, 上掲; 8. Thompson, J. S. 等, (2001) *Science* 293, 2108-2111. Yan, M., 等; (2001) *Curr. Biol.* 11, 1547-1552; Yan, M., 等, (2000) *Nat. Immunol.* 1, 37-41. Schiemann, B., 等, (2001) *Science* 293, 2111-2114)。3つの中でBR3だけはBAFFに特異的であり;他の2つは関連したTNFファミリーメンバーであるAPRILも結合する。BAFF及びレセプターノックアウト又は突然変異体マウスの表現型を比較すると、BR3を介するシグナル伝達がBAFFのB細胞生存機能を媒介することが示された (Thompson, 等, 上掲; Yan, (2002), 上掲; Schiemann, 上掲)。対照的に、TACIは阻害レセプターとして働くようであるが(Yan, M., (2001) *Nat. Immunol.* 2, 638-643)、BCMAの役割はあまり明らかでない(Schiemann, 上掲)。

10

20

30

40

50

【0005】

B R 3 は、 B 細胞の表面上に発現される 1 8 4 残基のタイプIII膜貫通型タンパク質である(Thompson, 等, 上掲 ; Yan, (2002), 上掲)。細胞内領域は、公知の構造的ドメイン又はタンパク質-タンパク相互作用のモチーフに配列類似性を持たない。様々な系統の研究から、B R 3 が B 細胞が B A F F 媒介性生存シグナルを受け取る一次レセプターであるという強い所見が示されている(Kalled, S., 等, Curr Dir Autoimmun. 2005;8:206-42に概説される)。これは、近年作製された B A F F - R ^{-/-} マウスである B A F F - R ノックアウトマウスによって確認されている(Shulga-Morskaya, S. 等, (2004) J Immunol. 15;173(4): 2331-41)。B R 3 は、多発性骨髄腫及び非ホジキン性リンパ腫を含む様々な疾患組織において発現している (Novak, AJ (2004) Blood 104:2247-2253 ; Novak, AJ (2004) Blood 103:689-694)。 10

【0006】

(発明の概要)

本発明は、新規の B R 3 結合ポリペプチド、例えば B R 3 結合イムノアドヘシン、抗体及び F c 領域を欠く抗体と、本発明の方法におけるその予期しない有益な特性、例えば B 細胞を枯渇するため、B 細胞増殖及び生存を刺激するため、治療的使用のため又は診断や研究の使用のための潜在的な薬剤としての使用を提供する。

【0007】

本発明は、本発明は、以下の何れか一、何れかの組合せ又はすべての特性を含む B R 3 結合ポリペプチドを提供する：(1) 500 nM 以下、100 nM 以下、50 nM 以下、10 nM 以下、5 nM 以下又は 1 nM 以下の見かけの K d 値でヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合する；(2) ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、500 nM 以下、100 nM 以下、50 nM 以下、10 nM 以下、5 nM 以下又は 1 nM 以下の見かけの K d 値でマウス B R 3 細胞外ドメイン配列に結合する；(3) 特定の残基(一又は複数)を含有するヒト B R 3 上に機能的なエピトープを有する；(4) ヒト B A F F へのヒト B R 3 の結合を阻害する；(5) ヒトエフェクター細胞存在下にて抗体依存性細胞性障害(ADC)を有するか、野生型 IgG と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて ADC を亢進しているか、野生型 IgG 又は天然配列の IgG Fc と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて ADC を減弱している；(6) 本明細書中で開示される抗体の何れか一に由来する；(7) 野生型又は天然配列の IgG Fc を有するポリペプチドないしは親ポリペプチドよりも高い親和性でヒト Fc 新生児レセプター(FcRn)を結合する；(8) このような抗体で処理されていない適当なネガティブコントロール又は基準レベルと比較して好みしくは少なくとも 20% インビオ又はインビトロの B 細胞を殺傷又は枯渇する。B R 3 結合ポリペプチドには、Fc ドメインに融合された B R 3 (例えばペプチボディ)を結合するペプチド(例えばファージディスプレイ由来)が含まれる。 20 30

【0008】

一実施態様では、B 細胞表面抗原に結合しないコントロール抗体による処置と比較して、又は処置前の基準レベルと比較して、本発明の抗体は、マウスの以下の何れか一、何れかの組合せ又はすべての細胞集団中の B 細胞の少なくとも 20% を枯渇しうる：(1) 血液 B 細胞、(2) リンパ節 B 細胞、(3) 脾臓濾胞性 B 細胞、(4) 脾臓周辺帯 B 細胞。他の実施態様では、B 細胞枯渇は 25%、30%、40%、50%、60%、70%、80% 以上である。 40

【0009】

また、本発明は、以下の何れか一、何れかの組合せ又はすべての特性を含むアゴニスト B R 3 結合ポリペプチドを提供する：(1) 500 nM 以下、100 nM 以下、50 nM 以下、10 nM 以下、5 nM 以下又は 1 nM 以下の見かけの K d 値でヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合する；(2) ヒト B R 3 特異的残基に機能的なエピトープを有する；(3) インビトロで B 細胞増殖を刺激する；(4) ヒト B A F F へのヒト B R 3 の結合を阻害する；(5) 本明細書中で開示される抗体の何れか一に由来する；(6) 野生型又は天然配列の IgG Fc を有するポリペプチドないしは親ポリペプチドよりも高い親和性でヒト 50

F c 新生児レセプター(F c R n)を結合する；(7) インビボでB細胞増殖又はB細胞生存を刺激する。一実施態様によると、野生型IgG1又は天然IgG1 Fc配列又は9.1RF抗体と比較して、アゴニスト抗体はADC C機能が少ないかないしは存在しない。一実施態様によると、本発明のアゴニスト抗体はFc領域内に少なくとも以下の置換D265A/N297A(EU番号付けシステム)を有する。一実施態様によると、アゴニスト抗体はヒトIgG4のIgG Fc配列を有する。

【0010】

一実施態様では、本発明のBR3結合ポリペプチドは残基F25、V33及びA34を含有するヒトBR3に機能的なエピトープを有し、該モノクローナル抗体は9.1抗体又は2.1抗体でない。更なる実施態様では、機能的なエピトープは残基R30を更に含む。一実施態様では、本発明のBR3結合ポリペプチドは、残基P21及びA22を含有するヒトBR3に機能的なエピトープを有する。一実施態様では、本発明のBR3結合ポリペプチドは残基L38及びR39を含有するヒトBR3に機能的なエピトープを有し、該抗体は9.1抗体でない。一実施態様では、BR3結合ポリペプチドは残基G36を含有するヒトBR3に機能的なエピトープを有し、該抗体は2.1抗体でない。一実施態様では、本発明のBR3結合ポリペプチドは、残基V29及びL28を含有するヒトBR3に機能的なエピトープを有する。さらに他の実施態様では、機能的なエピトープはL28及びV29を更に含む。一実施態様では、L38、R39、P21及びA22の何れか一、何れかの組合せ又はすべてを含むヒトBR3に機能的なエピトープを有する抗BR3抗体は、アゴニストBR3結合抗体である。他の実施態様では、G36を含有するヒトBR3に機能的なエピトープを有する抗BR3抗体は、アゴニストBR3結合抗体である。

10

20

30

40

【0011】

本発明は、BR3に結合し、図に記載した抗体配列の下線部位の何れか一又は配列一覧に記載したCDRないしは高頻度可変領域に少なくとも70%の相同性を有するH1、H2、H3、L1、L2又はL3領域を有する抗体及びこれらの抗体に由来するBR3結合抗体である表2の抗体を提供する。一実施態様では、本発明の抗体は、BR3に結合し、表2に記載の抗体の何れか一のH1、H2及びH3領域のそれぞれに少なくとも70%の相同性を有するH1、H2及びH3領域を有する。一実施態様では、本発明の抗体は、BR3に結合し、表2に記載の抗体の何れか一のL1、L2及びL3領域のそれぞれに少なくとも70%の相同性を有するL1、L2及びL3領域を有する。一実施態様では、抗体はBR3に結合し、表2に記載の抗体の何れか一のVHドメインに少なくとも70%の相同性を有するVHドメインを有する。

30

【0012】

本発明は、残基QVRRALDY(配列番号212)を含有するH3高頻度可変領域(HVR3)を含んでなるヒト化抗BR3抗体を提供する。他の実施態様では、BR3結合抗体は、(1)残基QVRRALDY(配列番号212)を含有するH3高頻度可変領域(HVR3)；と(2)残基RDTSKNTF(配列番号210)を含有する重鎖フレームワーク3領域(HC-FR3)を含んでなる。一実施態様では、BR3結合抗体は、さらに、配列番号35-36の何れか一の抗体配列の残基番号49-65(カバット番号付け)を含有するHVR2と残基番号26-35を含有するHVR1とを含んでなる。他の実施態様では、抗BR3抗体は、さらに、H1高頻度可変領域(HVR1)内に残基GFTVTAYYMS(配列番号214)とH2高頻度可変領域(HVR2)内に残基GFIRDKANGYTTEYNPSVKG(配列番号213)を含んでなる。他の実施態様では、抗体は、さらに、LVR1内に残基KSSQSLLYSSNQNNYLA(配列番号232)、LVR2内に残基WASTRES(配列番号233)、LVR3内に残基QQSQISPPT(配列番号231)を含んでなる。

40

【0013】

他の実施態様では、抗BR3結合抗体は、(1)QVRRALDY(配列番号212)を含有するH3高頻度可変領域(HVR3)；と(2)RDTSKNTL(配列番号211)を含有する重鎖フレームワーク3領域(HC-FR3)を含んでなる。一実施態様では、抗BR3結合抗体は、配列番号37-73の抗体配列の何れか一の残基番号26-35及び49-65(カバッ

50

ト番号付け)を含有してなる。一実施態様では、抗体は、LVR1内に残基KSSQSLLYSSNQN NYLA (配列番号232)、LVR2内に残基WASTRES (配列番号233)、LVR3内に残基QQSQISPPT (配列番号231)を含んでなる。

【0014】

他の実施態様では、抗BR3結合抗体は以下の式I:

W-A-X3-X4-X5-X6-S (配列番号215) (式I)

を含有するL2高頻度可変領域(LVR2)を含んでなり、このとき、X3がQ又はSであり; X4がH、I又はTであり; X5がL又はRであり、X6がD又はEであり、式IがW ASTRES (配列番号233)でない。一実施態様では、抗BR3抗体はさらに、QVRRALDY (配列番号212)を含有するH3高頻度可変領域(HVR3)を含んでなる。一実施態様では、LVR2は配列番号23及び25からなる群から選択される抗体配列の残基番号50-56(カバット番号付け)を含有してなる。一実施態様では、抗体はさらに、HVR1内に残基GFTVTAYYMS (配列番号214)とHVR2内に残基GFIRDKANGYTTEYNPSVK (配列番号213)を含んでなる。一実施態様では、抗体はさらに、LVR1内に残基KSSQSLLYSSNQ NYLA (配列番号232)と、LVR3内に残基QQSQISPPT (配列番号231)を含んでなる。

10

【0015】

他の実施態様では、抗BR3抗体は以下の式II:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-Y-X9-X10 (配列番号216) (式II)

を含有するH1高頻度可変領域(HVR1)を含んでなり、このとき、X1がG又はD、S、A、V、E又はTであり; X2がL、S、W、P、F、A、V、I、R、Y又はDであり; X3がP、T、A、N、S、I、K、L又はQであり; X4がM、R、V、Y、G、E、A、T、L、W又はDであり; X5がA、S、T、G、I、R、P、N、D、Y又はHであり; X6がG、A、S、P又はTであり; X7がF、H、Y、R、S、V又はNであり; X9がT、I、M、F、W又はVであり; X10がT、G、S又はAであり、式IIがGFTVTA YYMS (配列番号214)でない。一実施態様では、抗体はさらに、QVRRALDY (配列番号212)を含有するH3高頻度可変領域(HVR3)を含有してなる。一実施態様では、HVR1は、配列番号24、26-34、36及び38-73からなる群から選択される抗体配列の残基番号26-35(カバット番号付け)を含有してなる。一実施態様では、抗体はさらに、LVR2内に残基WASTRES (配列番号233)を含有してなる。一実施態様では、抗体はさらに、LVR1内に残基KSSQSLLYSSNQ NYLA (配列番号232)、LVR2内に残基WASTRES (配列番号233)及びLVR3内に残基QQSQISPPT (配列番号231)を含んでなる。一実施態様では、抗体はさらに、HVR2内に残基GFIRDKANGYTTEYNPSVK (配列番号213)を含んでなる。

20

30

30

【0016】

他の実施態様では、本発明のBR3結合抗体は、(1)QVRRALDY (配列番号212)を含有するH3高頻度可変領域(HVR3);と(2)Hu9.1-73、Hu9.1-70、Hu9.1-56、Hu9.1-51、Hu9.1-59、Hu9.1-61、Hu9.1-A、Hu9.1-B and Hu9.1-Cからなる群から選択される抗体のHVR1の残基番号26-35とLVR2の残基番号50-56を含んでなる抗体である。一実施態様では、抗体はさらに、HVR2内に残基GFIRDKANGYTTEYNPSVK (配列番号213)を含んでなる。一実施態様では、抗体はさらに、LVR1内に残基KSSQSLLYSSNQ NYLA (配列番号232)と、LVR3内に残基QQSQISPPT (配列番号231)を含んでなる。

40

【0017】

また、本発明は、配列番号7-13及び16-18からなる群から選択される抗体配列の残基番号94-102(カバット番号付け)を含有するHVR3を含んでなる抗BR3抗体を提供する。一実施態様では、抗体はさらに、配列番号7-13及び16-18の何れか一の抗体配列の残基番号26-35及び残基番号49-65(カバット番号付け)をそれぞれ含有するHVR1及びHVR2を含んでなる。一実施態様では、抗体のLVR1、LVR2及びLVR3は、配列番号3の抗体配列のそれぞれ残基24-34、残基50-56及び残基89-97(カバット番号付け)を含有してなる。

50

【0018】

一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号22、24及び26-73の何れか一の可変重鎖配列を含有する可変重鎖ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号21、23及び25の何れか一の可変軽鎖配列を含有する可変軽鎖ドメインを含んでなる。他の実施態様では、抗体は配列番号74の配列を含んでなる。他の実施態様では、抗体は配列番号76の配列を含んでなり、XはA、W、H、Y、S又はFである。具体的な一実施態様では、抗体は配列番号75の配列を含んでなる。

【0019】

本発明は、以下の式III：

X1-X2-X3-X4-X5-G-X7-MDY (配列番号218) (式III)

10

を含有し、このとき、X1がN、T又はRであり；X2がA、S、T、L、N又はPであり；X3がN、H又はLであり；X4がP、Y、F、N、T又はLであり；X5がY、T又はDであり；X7がA又はEである、H V R 3を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。一実施態様では、式IIIはTPHTYGAMDY(配列番号235)でない。一実施態様では、式IIIはNSNFYGAMDY(配列番号219)である。一実施態様では、抗体はさらに、残基RDTSKNTF(配列番号210)又はRDTSKNTL(配列番号211)を含有するH C - F R 3を含んでなる。一実施態様では、抗体のL V R 1、L V R 2及びL V R 3は、配列番号3の抗体配列のそれぞれ残基24-34、残基50-56及び残基89-97(カバット番号付け)を含有してなる。一実施態様では、抗体のH V R 1及びH V R 2は、配列番号4の抗体配列のそれぞれ残基26-35及び残基49-65(カバット番号付け)を含有してなる。

20

【0020】

あるいは、本発明は、以下の式III：

X1-X2-X3-X4-X5-G-X7-MDY (配列番号218) (式III)

を含有し、このとき、X1がN、T又はRであり；X2がA、S、T、L、N又はPであり；X3がN、H又はLであり；X4がP、Y、F、N、T又はLであり；X5がY、T又はDであり；X7がA又はEであるH V R 3を含んでなり、さらに、残基RDTSKNTF(配列番号210)又はRDTSKNTL(配列番号211)を含有するH C - F R 3を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。一実施態様では、H C - F R 3がRDTSKNTF(配列番号210)を含んでなるとき、抗体のH V R 3は配列番号6-9及び16-17の何れか一の抗体配列の残基94-102(カバット番号付け)を含んでなる。一実施態様では、H C - F R 3がRDTSKNTL(配列番号211)を含んでなるとき、抗体のH V R 3は配列番号5及び10-13の何れか一の抗体配列の残基94-102(カバット番号付け)を含んでなる。一実施態様では、抗体のL V R 1、L V R 2及びL V R 3は、配列番号3の抗体配列の残基24-34、残基50-56及び残基89-97(カバット番号付け)をそれぞれ含有する。一実施態様では、抗体のH V R 1及びH V R 2は、配列番号4の抗体配列のそれぞれ残基26-35及び残基49-65(カバット番号付け)を含有してなる。

30

【0021】

他の実施態様では、式IIIの配列は以下の式IV：

X1-X2-X3-X4-X5-GAMDY (配列番号218) (式IV)

40

であり、このときX1がN、T又はRであり；X2がS、T、L、N又はPであり；X3がN又はLであり；X4がP、Y、F、N又はLであり；X5がY又はDである。

一実施態様では、抗B R 3抗体は、式IVの配列を含有するH V R 3と配列番号210の配列を含有するH C - F R 3を含んでなる。更なる実施態様では、抗体は配列番号14の軽鎖配列を含んでなる。更なる実施態様では、抗体は、D 2 6 5 A / N 2 9 7 A(EU番号付け)変異を有するF c領域を含んでなる。

一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号4-13及び16-18の何れか一の可変重鎖配列を含有する可変重鎖ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号3の可変軽鎖配列を含有する可変軽鎖ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は配列番号14の配列を含んでなる。他の実施態様では、抗体は配列番号15の配列を含んでなる。

50

【0022】

本発明は、可変軽鎖配列 配列番号77と可変重鎖配列 配列番号78、及びその変異体を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。一実施態様では、抗B R 3抗体は配列番号79の可変軽鎖配列を含んでなる。他の実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号80-85の何れか一の可変重鎖配列を含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号80又は82の何れか一の抗体配列の残基番号26-35(カバット番号付け)を含有するHVR1を含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号80、84又は85の何れか一の抗体配列の残基番号49-65(カバット番号付け)を含有するHVR2を含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号80、82又は83の何れか一の抗体配列の残基番号94-102(カバット番号付け)を含有するHVR3を含んでなる。他の実施態様では、抗B R 3抗体は、(1)配列番号81-85の何れか一の抗体配列の残基94-102(カバット番号付け)を含有するHVR3と、(2)RDTSKNTF(配列番号210)を含有する重鎖フレームワーク3領域(HC-FR3)を含有する。一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号80-85の何れか一の抗体配列の残基番号26-35、49-65及び94-102を含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は、抗体配列 配列番号79の残基番号24-34(カバット番号付け)を含有するLVR1を含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は、抗体配列 配列番号79の残基番号50-56(カバット番号付け)を含有するLVR2を含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は、抗体配列 配列番号79の残基番号89-97(カバット番号付け)を含有するLVR3を含んでなる。他の実施態様では、抗B R 3抗体のLVR1、LVR2およびLVR3は、配列番号79のそれぞれ残基番号24-34、50-56及び89-97(カバット番号付け)を含有する。

10

20

30

40

50

【0023】

一実施態様では、抗B R 3抗体は、配列番号78及び80-85の何れか一の可変重鎖配列を含有する可変重鎖ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗B R 3抗体は配列番号77及び79の可変軽鎖配列を含有する可変軽鎖ドメインを含んでなる。

本発明は、配列番号87-94の何れか一の抗体配列の残基番号95-102を含有するHVR3を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。本発明は、配列番号87-94、98、100、102、104、106、107、109-110、112、114、116、118、120、122、124-127、129及び193の何れか一の抗体配列の残基番号49-58を含有するHVR2を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。本発明は、配列番号87-94、98、100、102、104、106、107、109-110、112、114、116、118、120、122、124-127、129及び193の何れか一の抗体配列の残基番号24-34を含有するHVR1を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。本発明は、配列番号86、97、99、101、103、105、108、111、113、115、117、119、121、123、128及び194-207の何れか一の抗体配列の残基番号24-34を含有するLVR1を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。本発明は、配列番号86、97、99、101、103、105、108、111、113、115、117、119、121、123、128及び194-207の何れか一の抗体配列の残基番号50-56を含有するLVR2を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。本発明は、配列番号86、97、99、101、103、105、108、111、113、115、117、119、121、123、128及び194-207の何れか一の抗体配列の残基番号89-97を含有するLVR3を含んでなる抗B R 3抗体を提供する。一実施態様では、LVR1、LVR2及びLVR3が、配列番号86、97、99、101、103、105、108、111、113、115、117、119、121、123、128及び194-207の何れか一の抗体配列の残基番号24-34、50-56及び89-97を含有する。一実施態様では、HVR1、HVR2及びHVR3が、配列番号87-94、98、100、102、104、106、107、109-110、112、114、116、118、120、122、124-127、129及び193の何れか一の抗体配列の残基番号24-34、49-58及び99-102を含有する。

5 - 1 0 2 を含有する。一実施態様では、抗 B R 3 抗体は、配列番号 8 7 - 9 4、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 4、1 0 6、1 0 7、1 0 9 - 1 1 0、1 1 2、1 1 4、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4 - 1 2 7、1 2 9 及び 1 9 3 の何れか一の V H 配列を含有する可変重鎖ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗 B R 3 抗体は、配列番号 8 6、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、1 0 8、1 1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 8 及び 1 9 4 - 2 0 7 の何れか一の V L 配列を含有する可変軽鎖ドメインを含んでなる。

【 0 0 2 4 】

本発明は、X 6 が R 又は H である RVCYN-X6-LGVCAGGMDY (配列番号 220) (式 V) を含有する H V R 3 を含んでなる抗 B R 3 抗体を提供する。

10

本発明は、以下の式 VI :

RAS-X4-X5-X6-X7-X8-X9-VA (式 VI)

を含有し、X4がQ又はEであり；X5がD又はEであり；X6がI又はEであり；X7がS又はAであり；X8がS又はTであり；X9がA又はSである、L V R 1 を含んでなる抗 B R 3 抗体を提供する。

本発明は、以下の式 VII :

X1-X2-A-S-X5-L-X7-S (式 VII)

を含有し、X1がY又はFであり；X2がS、A又はGであり；X5がN、F又はYであり；X7がF又はYである、L V R 2 を含んでなる抗 B R 3 抗体を提供する。

20

本発明は、以下の式 VIII :

Q-X2-S-X4-X5-X6-PPT (式 VIII)

を含有し、X2がQ又はHであり；X4がG、L、R、H、Y、Q又はEであり；X5がN、T、M、S、A、T、I又はVであり；X6がT又はSである、L V R 3 を含んでなる抗 B R 3 抗体を提供する。

一実施態様では、抗 B R 3 抗体は、式 I、II 及び III の配列を含有する軽鎖を含んでなる。他の実施態様では、抗 B R 3 抗体は、式 I、II 及び III の配列を含有する軽鎖を含んでなり、式 V 又は配列番号 2 2 0 の配列を含有する H V R 3 を含んでなる。

【 0 0 2 5 】

本発明は、残基 RVCYNRLGVCAGGMDY (配列番号 2 2 1) を含有する H 3 ；残基 SGFTISSLNSIH (配列番号 2 2 2) を含有する H 1 と、残基 AWITPSDGNTD (配列番号 2 2 3) を含有する H 2 を含んでなる抗 B R 3 結合抗体を提供する。他の実施態様では、抗 B R 3 結合抗体は、RVCYNRLGVCAGGMDY (配列番号 2 2 1) を含有する H 3 ；残基 SGFTISSLSSIH (配列番号 2 2 4) を含有する H 1 と AWVLPSVGFTD (配列番号 2 2 5) を含有する H 2 を含んでなる。

30

一実施態様では、抗 B R 3 抗体は、配列番号 8 7 - 9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 4、1 0 6、1 0 7、1 0 9 - 1 1 0、1 1 2、1 1 4、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4 - 1 2 7、1 2 9 及び 1 9 3 の何れか一の可変重鎖配列を含有する可変重鎖を含んでなる。一実施態様では、抗 B R 3 抗体は、配列番号 8 6、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、1 0 8、1 1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3、1 2 8 及び 1 9 4 - 2 0 7 の何れか一の可変軽鎖配列を含有する可変軽鎖を含んでなる。

【 0 0 2 6 】

一実施態様では、抗 B R 3 抗体は、3 . 1 (A T C C 寄託 P T A - 6 6 2 2) 又は 1 2 B 1 2 . 1 (A T C C 寄託 P T A - 6 6 2 4) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体のヒト B R 3 の細胞外ドメインへの結合を競合的に阻害することができる。更なる実施態様では、抗体は 3 . 1 (A T C C 寄託 P T A - 6 6 2 2) 又は 1 2 B 1 2 . 1 (A T C C 寄託 P T A - 6 6 2 4) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体の可変領域配列を含有する。他の実施態様では、抗体は 3 . 1 (A T C C 寄託 P T A - 6 6 2 2) 又は 1 2 B 1 2 . 1 (A T C C 寄託 P T A - 6 6 2 4) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体の高頻度可変領域配列を含有する。他の実施態様では、抗体は 3 . 1 (A T C C 寄託 P T A - 6 6 2 2) 又は 1 2 B 1 2 . 1 (A T C C 寄託 P T A - 6 6 2 4) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体のヒト化型である。

40

【 0 0 2 7 】

50

一実施態様では、抗 B R 3 抗体は、3.1 (ATCC 寄託 PTA-6622) 又は 12B12.1 (ATCC 寄託 PTA-6624) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体のヒト B R 3 への結合を競合的に阻害することができる。更なる実施態様では、抗体は 3.1 (ATCC 寄託 PTA-6622) 又は 12B12.1 (ATCC 寄託 PTA-6624) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体の可変領域配列を含有する。他の実施態様では、抗体は 3.1 (ATCC 寄託 PTA-6622) 又は 12B12.1 (ATCC 寄託 PTA-6624) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体の高頻度可変領域配列を含有する。他の実施態様では、抗体は 3.1 (ATCC 寄託 PTA-6622) 又は 12B12.1 (ATCC 寄託 PTA-6624) として寄託されたハイブリドーマによって產生される抗体のヒト化型である。

一実施態様では、本発明の抗体は、本明細書中にて具体的に記載する何れか一の抗体と同じエピトープに結合する。他の実施態様では、本発明の抗体は寄託された抗体の配列を含有する。

【0028】

本発明は、ADC、CDC 及び FcRn 結合などの変更した Fc エフェクター機能を有する B R 3 結合抗体及びイムノアドヘシンを提供する。一実施態様では、野生型のヒト IgG1 と比較して亢進した ADC 活性を有する抗体及びイムノアドヘシンが含まれる。他の実施態様では、野生型のヒト IgG1 と比較して減弱した ADC 活性を有する抗体及びイムノアドヘシンが含まれる。更なる他の実施態様では、野生型のヒト IgG1 と比較して亢進した FcRn 結合親和性を有する抗体及びイムノアドヘシンが含まれる。一実施態様では、抗体又はイムノアドヘシンは、Fc 領域内の残基の番号付けが EU 番号付けシステムに従った場合、Fc 領域の 238、239、246、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、332、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438 及び 439 からなる群から選択される Fc 領域内に少なくとも一の置換を有する。一実施態様では、残基 434 は A、W、Y、F 及び H からなる群から選択される残基である。他の実施態様では、抗体又はイムノアドヘシンは以下の置換 S298A / E333A / K334A を有する。他の実施態様では、抗体又はイムノアドヘシンは以下の置換 K322A を有する。他の実施態様では、抗体又はイムノアドヘシンは、配列番号 134 を含み、X が A、W、H、Y 及び F からなる群から選択される何れかのアミノ酸である。他の実施態様では、抗体又はイムノアドヘシンは、置換 K246H、H268D、E283L、S324G、S239D 及び I332E の少なくとも何れか一又は何れかの組合せを有する。更なる他の実施態様では、本発明の抗体又はイムノアドヘシンは、少なくとも以下の置換 D265A / N297A を有する。

【0029】

本発明の一実施態様では、B R 3 結合ポリペプチドは細胞障害性剤又は化学療法剤にコンジュゲートされる。

他の実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。他の実施態様では、抗体はヒト化抗体である。他の実施態様では、抗体はヒト抗体である。他の実施態様では、抗体はキメラ抗体である。他の実施態様では、抗体は F(ab)、F(ab')₂、一本鎖 Fv (sc Fv)、Fv 断片；ダイアボディ及び線状抗体からなる群から選択されるものである。他の実施態様では、抗体は二特異性抗体などの多特異性抗体である。

また、前述の実施態様の何れか一の抗体又はポリペプチドと担体を含んでなる組成物が提供される。一実施態様では、担体は薬剤的に受容可能な担体である。これらの組成物は製造品やキットにおいて提供される。

【0030】

10

20

30

40

50

また、本発明は、抗 B R 3 抗体をヒスチジンバッファ中に含有する液体製剤を提供する。一実施態様では、バッファは酢酸ヒスチジンバッファである。他の実施態様では、本発明の製剤又は組成物は予めシリングに充填されたものとしてパッケージ化される。

また、本発明は、抗体を発現するための発現ベクターなどを含む、本明細書中で開示された抗体配列の何れかをコードする単離された核酸を提供する。

本発明の他の態様は、前述の核酸を含む宿主細胞と、抗体を産生する宿主細胞である。後者の好適な一実施態様では、宿主細胞は C H O 細胞である。抗体を産生する宿主細胞を培養し、細胞培養物から抗体を回収することを含む、これらの抗体の産生方法が提供される。

本発明の更なる他の態様は、容器と、容器に包含される組成物と、パッケージ挿入物とを具備し、該組成物が前述の実施態様の何れかの抗体を含んでなるものである、製造品である。一実施態様では、製造品は、本発明の B R 3 結合抗体を含んでなる診断用キットである。

【 0 0 3 1 】

また、本発明は、 B R 3 結合抗体、ポリペプチド又はその機能的な断片が、哺乳動物、例えば骨髄移植を有するヒトや、自己免疫性疾患、癌、 B 細胞腫瘍、 B R 3 陽性癌又は免疫不全性疾患などの疾患に罹っているヒト患者に投与されることによって本明細書に開示される疾患が治療される方法を提供する。自己免疫性疾患、 B 細胞腫瘍又は B R 3 陽性癌を治療するための好適な一実施態様では、投与される B R 3 結合ポリペプチドないし抗体は、アンタゴニスト B R 3 結合抗体ないしポリペプチドであるか、アゴニスト B R 3 結合抗体ないしポリペプチドでないことが好ましい。免疫不全性疾患の治療のための好適な一実施態様では、用いられる B R 3 結合抗体ないしポリペプチドは本発明のアゴニスト B R 3 結合抗体ないしポリペプチドである。一実施態様では、本発明の治療される癌は、非ホジキン性リンパ腫、慢性リンパ球性白血病、多発性骨髄腫(濾胞性リンパ腫、広汎性大 B 細胞リンパ腫、周辺帯 B 細胞リンパ腫及びマントル細胞リンパ腫を含む)からなる群から選択される。

【 0 0 3 2 】

自己免疫性疾患、癌、 B 細胞腫瘍又は B R 3 陽性癌の治療のための方法の一実施態様では、抗体は、本発明の 9 . 1 R F 抗体と比較して、 p H 6 . 0 での F c R n に結合する親和性を亢進する B R 3 結合抗体である。自己免疫性疾患、 B 細胞腫瘍又は B R 3 陽性癌の治療方法の一実施態様では、 B R 3 結合抗体は、 9 . 1 R F 抗体と比較して、ヒトエフェクター細胞の存在下において A D C C エフェクター機能を亢進している B R 3 結合抗体である。

一実施態様では、 B R 3 陽性癌は、 B 細胞リンパ腫又は白血病、例えば非ホジキンリンパ腫(N H L)又はリンパ球優性ホジキン病(L P H D)、慢性リンパ球性白血病(C L L)、急性リンパ球性白血病(A L L)又は小リンパ球性リンパ腫(S L L)である。他の実施態様では、 B R 3 陽性癌は多発性骨髄腫である。更なる実施態様では、治療方法はさらに、少なくとも一の化学療法剤が患者に投与されることを含み、非ホジキン性リンパ腫(N H L)の場合、化学療法剤はドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチン及びプレドニソロンからなる群から選択されるものである。

【 0 0 3 3 】

また、自己免疫性疾患に罹患した患者に、治療的有効量の本発明の B R 3 結合抗体ないしポリペプチドが投与されることを含む、自己免疫性疾患の治療方法が提供される。一実施態様では、自己免疫性疾患は、関節リウマチ、若年性慢性関節リウマチ、狼瘡、例えば全身性エリテマトーデス(S L E)、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、例えばクローン病及び潰瘍性大腸炎、特発性血小板減少性紫斑病(I T P)、血栓性血小板減少性紫斑病(T T P)、自己免疫性血小板減少、多発性硬化症、乾癬、 I g 神経障害、例えば I g A ネフロパシー、 I g M 多発性神経炎及び I g G 神経障害、重症筋無力症、血管炎、例えば A N C A 関連血管炎、真正糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群、視神経脊髄炎(N M O)、ペニフィグス、例えば新生物関連天疱瘡、天疱瘡尋常及び落葉性天疱瘡、多発性筋炎 / 皮

10

20

30

40

50

膚筋炎及び糸球体腎炎からなる群から選択されるものである。自己免疫性疾患が関節リウマチである場合、抗体は第二治療剤と組み合わせて投与されうる。一実施態様では、第二治療剤はメトトレキセートである。

【0034】

自己免疫性疾患、B細胞腫瘍、BR3陽性癌の治療方法では、BR3結合抗体は、単独又は第二治療剤、例えば第二抗体、他のB細胞枯渇薬剤、化学療法剤、免疫抑制剤又はヒト免疫応答を調節する他の生物製剤(例えば生物学的応答モディファイア)と組み合わせて投与されうる。第二抗体はCD20ないし異なるB細胞抗原に結合するもの又は、NKないしT細胞抗原でありうる。一実施態様では、抗CD20抗体は、リツキシマブ(RITUXAN(登録商標))、m2H7(マウス2H7)、hu2H7(ヒト化2H7)及びすべての機能的変異体、hu2H7.v16(vはバージョンを表す)、v31、v96、v114及びv115、(例えば、国際公開公報2004/056312を参照)からなる群から選択されるものである。一実施態様では、第二抗体は放射性標識した抗CD20抗体である。他の実施態様では、CD20結合抗体は、毒素ないし放射性同位体を含む細胞障害性剤とコンジュゲートされる。他の実施態様では、第二治療剤は、インターロイキン(例えばIL-2、IL-12)、インターフェロン、フルダラビン、シクロホスファミド、TNFを標的とする抗体(例えばEnbrel(登録商標)、Remicade(登録商標)及びHumira(登録商標))、コロニー刺激因子(例えばCSF、GM-CSF、G-CSF)からなる群から選択されるものである。他の実施態様では、第二抗体ないし生物製剤は他のBAFFアンタゴニスト(例えばBR3抗体、抗BAFF抗体、TACI-Fc、BCMA-Fc及びBR3-Fc)でありうる。一実施態様では、自己免疫性疾患又は癌のために第二治療剤として投与されるBAFFアンタゴニストはADC活性を有さない。他の実施態様では、第二治療剤は、抗VEGF抗体(例えばアバスチンTM抗体)、抗CD64抗体、抗C32a抗体、抗CD16抗体、抗INF抗体、抗CD79a抗体、抗CD70b抗体、抗CD52抗体、抗CD40抗体、CTL4-Ig、抗CD22抗体、抗CD23抗体、抗CD80抗体、抗HLA-DR抗体、抗MHCII(IA)抗体、抗IL-7抗体、抗IL-2抗体、抗IL-4抗体、抗IL-21抗体および抗IL-10抗体からなる群から選択されるものである。B細胞枯渇薬剤の具体的な例には、限定するものではないが、前述の抗CD20抗体、Alemtuzumab(抗CD52抗体)及びEpratuzumab又はCMC-544(Wyeth)(抗CD22抗体)などがある。他の実施態様では、第二治療剤は、B細胞を枯渇する小分子やIAPインヒビターである。

【0035】

他の態様では、本発明は、皮膚筋炎、ウェーグナー肉芽腫症、ANCA関連血管炎(ANCA)、再生不良性貧血症、自己免疫性溶血性貧血(AIHA)、第VIII因子欠損、血友病A、自己免疫性好中球減少症、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、固形臓器移植拒絶反応、移植片対宿主病(GVHD)、IgM媒介、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、橋本甲状腺炎、自己免疫性肝炎、リンパ系間質性肺炎(LIP)、閉塞性細気管支炎(非移植性)対NSIP、ギラン-バレ症候群、大脈管血管炎、巨細胞(高安)動脈炎、中脈管血管炎、川崎病、結節性多発動脈炎からなる群から選択される自己免疫性疾患の治疗方法であって、この疾患に罹患する患者に、治療的有効量のBR3結合抗体が投与されることを含む治疗方法を提供する。

また、本発明は、治療的有効量の本発明のアゴニストBR3結合抗体ないしはポリペプチドが投与される工程を含む、哺乳動物の免疫不全性疾患の治疗方法を提供する。

【0036】

本発明は、本発明の抗体を用いてBR3を単離する方法を提供する。また、本発明は、B細胞増殖のインヒビターのスクリーニング方法であって、(a)BR3アゴニスト抗体によりB細胞を刺激する；(b)候補化合物を投与する；そして、(c)B細胞増殖などのBR3活性を検出する工程を含む方法を提供する。また、本発明は、BR3経路の下流マーカを同定してモニタリングする方法であって、(a)BR3アゴニスト抗体によりB細胞を刺激する；そして(b)細胞のタンパク質活性及び/又は遺伝子発現における変化を

10

20

30

40

50

検出する工程を含む方法を提供する。

【0037】

また、本発明は、B R 3 結合治療アンタゴニストで治療される自己免疫性疾患又は癌の診断方法であって、(a) 本発明のB R 3 結合抗体ないしはポリペプチドと試験被検体からの生物学的試料を接触する；(b) 生物学的試料中のB R 3 ポリペプチドのレベルをアッセイする；そして(c) B R 3 タンパク質の標準レベルと生物学的試料中のB R 3 ポリペプチドのレベルを比較することを含み、B R 3 タンパク質の標準レベルと比較してB R 3 タンパク質のレベルにおける存在又は増加によってB R 3 結合治療によって治療される自己免疫性疾患又は癌が示唆される方法を提供する。

また、本発明は、試験試料又は被検体における本発明の抗B R 3 抗体ないしはイムノアドヘシンを結合する工程と、コントロール抗体又はイムノアドヘシンと比較して結合した抗体ないしはイムノアドヘシンを比較する工程を含む、B R 3 ポリペプチドの検出方法を提供する。一実施態様では、抗体ないしはイムノアドヘシンが、F A C S 分析、免疫組織化学アッセイ(I H C)及びE L I S A アッセイからなる群から選択されるアッセイに使用される。非B A F F 阻止(ロック)抗B R 3 抗体は、リガンドに結合するかどうか、B R 3 を検出する有用性があり、遊離及び結合したB R 3 を測定する際に有用性がある。

【0038】

(本発明の詳細な説明)

ここで用いられる「B A F F」、「B A F F ポリペプチド」、「T A L L - 1」又は「T A L L - 1 ポリペプチド」、「B L y S」なる用語は、「天然配列B A F F ポリペプチド」及び「B A F F 変異体」を包含する。「B A F F」は、配列番号143又は配列番号144のアミノ酸配列の何れか一によってコードされるポリペプチドと、それらのホモログ及び断片及び変異体であり、天然配列のB A F F の生物学的活性を有するものに対する名称である。B A F F の生物学的活性は、B 細胞生存を促進する、B 細胞成熟を促進する、およびB R 3、B C M A 又はT A C I に結合することからなる群から選択されうる。B A F F の変異体は、天然配列のB A F F ポリペプチドと好ましくは少なくとも80%ないし100%までの連続的整数、より好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列同一性を有する。「天然配列」B A F F ポリペプチドは、天然由来の対応するB A F F ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。例えば、B A F F はフューリン型のプロテアーゼにより細胞表面から切断された後の可溶型で存在する。そのような天然配列のB A F F ポリペプチドは天然から単離するか、組み換えおよび/または合成方法により生成することができる。「天然配列B A F F ポリペプチド」なる用語は、ポリペプチドの天然に生じる切断型ないし分泌型(例えば、細胞外ドメイン配列)、天然に生じる変異型(例えば、選択的スプライシング型)および天然に生じる対立変異型を具体的に包含する。「B A F F」なる用語は、Shu 等. , J. Leukocyte Biol. , 65:680 (1999) ; GenBank寄託番号 AF136293 ; 1998年5月7日公開のW098/18921 ; 1998年10月7日公開のEP 869,180 ; 1998年6月25日公開のW098/27114 ; 1999年3月18日公開のW099/12964 ; 1999年7月8日公開のW099/33980 ; Moore 等. , Science, 285:260-263 (1999) ; Schneider 等. , J. Exp. Med. , 189:1747-1756 (1999) ; Mukhopadhyay 等. , J. Biol. Chem. , 274:15978-15981 (1999) に記載のポリペプチドを含む。

【0039】

ここで用いられる「B A F F アンタゴニスト」なる用語は、広義の意味で用いられ、(1)天然配列B A F F ポリペプチドないし天然配列B R 3 ポリペプチドに結合してB A F F ポリペプチドと相互作用するB R 3 を部分的又は完全にロック(阻止)する、および(2)天然配列B A F F シグナル伝達を部分的又は完全にロック、阻害ないし中和(無効化)する任意の分子を含む。とりわけ、天然配列B A F F ポリペプチドシグナル伝達はB 細胞生存およびB 細胞成熟を促進する。B A F F シグナル伝達の阻害、ロックまたは中和により、とりわけB 細胞数が減少する。本発明によるB A F F アンタゴニストはインビトロ及び/又はインビボのB A F F ポリペプチドの一以上の生物学的活性を部分的または完全にロック、阻害ないし中和するであろう。一実施態様では、生物学的活性なB A F F

10

20

30

40

50

はインビトロ又はインビボで以下の事象の何れか一またはそれらのいくつかを増強する：B細胞の生存促進、IgG及び/又はIgMレベルの増加、又はB細胞増殖の刺激。

【0040】

本明細書中で用いられる「TACIアンタゴニスト」なる用語は、広義の意味で用いられ、(1)天然配列のBAFFポリペプチドないしは天然配列のTACIポリペプチドに結合してBAFFポリペプチドとのTACI相互作用を部分的又は完全にブロック(阻止)する、および(2)天然配列BAFFシグナル伝達を部分的又は完全にブロック、阻害ないし中和(無効化)する任意の分子を含む。

本明細書中で用いられる「BCMAアンタゴニスト」なる用語は、広義の意味で用いられ、(1)天然配列のBAFFポリペプチドないしは天然配列のBCMAポリペプチドに結合してBAFFポリペプチドとのBCMA相互作用を部分的又は完全にブロック(阻止)する、および(2)天然配列BAFFシグナル伝達を部分的又は完全にブロック、阻害ないし中和(無効化)する任意の分子を含む。

【0041】

上記のように、BAFFアンタゴニストは直接的または間接的な方法で、インビトロまたはインビボのBAFFシグナル伝達を部分的ないし完全にブロック、阻害又は中和する機能を持つ。例えば、BAFFアンタゴニストは直接BAFFに結合する。例えば、抗体がBAFFのBR3への結合を立体的に妨げるようにヒトBAFFの162、163、206、211、231、233、264および265からなる群から選択した残基の近傍残基及び/又は残基162-275を含んでなるヒトBAFFの領域内で結合する抗BAFF抗体を包含する。他の実施例では、直接結合するものは、TACI、BR3及びBCMAなどのBAFFレセプターの細胞外ドメインを含んでなるポリペプチド、又はECDの囲みの最少領域(ヒトBR3の残基19-35に対応する)を含んでなるポリペプチドである。あるいは、BAFFアンタゴニストは、BAFF結合領域で天然配列BR3の細胞外ドメインに結合して、インビトロ、インサイツ又はインビボでBR3へのBAFFの結合を部分的又は完全にブロック、阻害ないし中和しうる。例えば、このような間接的アンタゴニストは、BAFFへのヒトBR3の結合が立体的に妨げられるように、これら残基の近傍残基又はヒトBR3の残基23-38を含んでなるBR3の領域に結合する抗BR3抗体である。BAFFアンタゴニストでありうるBAFF結合Fcタンパク質の他の例には、国際公開公報02/66516、国際公開公報00/40716、国際公開公報01/87979、国際公開公報03/024991、国際公開公報02/16412、国際公開公報02/38766、国際公開公報02/092620及び国際公開公報01/12812にみられる。BAFFアンタゴニストには、WO 02/24909の図20に列挙されるBAFF結合配列や国際公開公報2003/024991、国際公開公報02/092620に記載のもの、BAFFを結合する配列の断片、及びこれら配列を含んでなる融合タンパク質(例えばFc融合タンパク質)などがある。

【0042】

ここで用いられる「BR3」、「BR3ポリペプチド」または「BR3レセプター」なる用語は、「天然配列BR3ポリペプチド」および「BR3変異体」を包含する(ここでさらに定義する)。「BR3」は配列番号145-149の何れか一を含んでなるポリペプチド及びその変異体又は断片の名称である。本発明のBR3は、ヒト組織型又は他の供給源などの様々な供給源から単離されるか、組み換え法及び/又は合成法によって調整されうる。BR3なる用語には、国際公開公報02/24909及び国際公開公報03/14294に記載のBR3ポリペプチドが含まれる。

「天然配列」BR3ポリペプチドは、天然由来の対応するBR3ポリペプチドと同じアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。そのような天然配列のBR3ポリペプチドは天然から単離するか、組み換えおよび/又は合成方法により生成することができる。「天然配列BR3ポリペプチド」なる用語は、ポリペプチドの天然に生じる切断型、可溶型ないし分泌型(例えば、細胞外ドメイン配列)、天然に生じる変異型(例えば、選択的スライシング型)および天然に生じる対立変異型を具体的に包含する。本発明のBR3ポリペプチドには、ヒトBR3のアミノ酸残基1-184の近接した配列からなるかまたはそれ

10

20

30

40

50

らを含有する B R 3 ポリペプチドが含まれる。

【 0 0 4 3 】

B R 3 「細胞外ドメイン」または「E C D」は、膜貫通ドメインおよび細胞質ドメインを実質的に含まない B R 3 ポリペプチド型を意味する。B R 3 の E C D 型には、B R 3 のアミノ酸 1 - 7 7 、 2 - 6 2 、 2 - 7 1 、 1 - 6 1 、 8 - 7 1 、 1 7 - 4 2 、 1 9 - 3 5 又は 2 - 6 3 の何れかを含んでなるポリペプチドを包含する。

「B R 3 変異体(変異型)」は、B R 3 E C D の残基 1 9 - 3 5 と少なくとも約 6 0 % のアミノ酸配列同一性を有する B R 3 ポリペプチドを意味し、天然配列 B A F F ポリペプチドを結合する。Gordon, N.C., 等, (2003) Biochemistry 42:5977-5983 を参照。場合によつては、B R 3 変異体は単一システィン豊富なドメインを含む。そのような B R 3 変異体ポリペプチドには、例えは完全長アミノ酸配列のうちの一以上のアミノ酸残基が N 末端および / または C 末端で、並びに一以上の内部ドメイン内で付加または欠損している B R 3 ポリペプチドが含まれる。天然配列 B A F F ポリペプチドを結合する B R 3 E C D の断片もまた包含される。一実施態様では、B R 3 変異型ポリペプチドは、ヒト B R 3 の残基 1 9 - 3 5 に対応する部位と、少なくとも約 6 5 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも約 7 0 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも約 7 5 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも約 8 0 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも約 8 5 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも約 9 0 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも約 9 5 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも約 9 8 % のアミノ酸配列同一性、又は少なくとも約 9 9 % のアミノ酸配列同一性を有している。

【 0 0 4 4 】

ヒト B R 3 ポリペプチドないしはその特定の断片の、B R 3 変異体ポリペプチドは天然 B R 3 ポリペプチド配列を包含しない。通常、B R 3 変異体ポリペプチドは少なくともおよそ 1 7 アミノ酸長又はそれ以上である。

「抗体」なる用語は、広義な意味で用いられ、例えはモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多エピトープ特異性を有する抗体、一本鎖抗体、多特異性抗体および抗体の断片を具体的に包含する。いくつかの実施態様によると、本発明のポリペプチドは抗体フレームワーク内、例えは可変領域内ないしは C D R 内に融合して、抗体が結合して B A F F の B R 3 への結合または B A F F シグナル伝達を阻害しうる。本発明のポリペプチドを含む抗体は、キメラ、ヒト化またはヒトのものであります。本発明のポリペプチドを含む抗体は抗体断片であります。そのような抗体およびそれらを生成する方法は以下に詳細に記載する。あるいは、本発明の抗体は動物を本発明のポリペプチドで免疫化することによって生成することができる。ゆえに、本発明のポリペプチドに直接関係する抗体を包含する。

【 0 0 4 5 】

本明細書中の「抗 B R 3 」及び「 B R 3 結合」なる用語は、交換可能に用いられ、抗体ないしはポリペプチドが B R 3 ポリペプチドを結合することを意味する。好ましくは、抗 B R 3 抗体は配列番号 1 4 5 - 1 4 9 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する B R 3 ポリペプチド上のエピトープに結合し、ヒト T A C I 又はヒト B C M A に結合しない。好ましくは、抗 B R 3 抗体は、ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に、2 5 での B I A c o r e アッセイにおける F a b として 5 0 0 n M 以下、1 0 0 n M 以下、5 0 n M 以下、1 0 n M 以下、5 n M 以下又は 1 n M 以下の見かけの K d 値で結合する。一実施態様では、抗体ないしポリペプチドは 0 . 0 0 1 p M から 5 0 0 n M の見かけの K d で B R 3 に結合する。

本発明の「アンタゴニスト抗 B R 3 抗体」は、B R 3 ポリペプチドを結合して、B R 3 シグナル伝達を阻害する(例えは、B R 3 関連の B 細胞増殖、B 細胞生存又は B 細胞増殖及び生存の両方を阻害する)抗体を意味する。

本発明の「アゴニスト抗 B R 3 抗体」は、B R 3 ポリペプチドに結合して、B R 3 シグナル伝達(例えは B R 3 関連の B 細胞増殖、B 細胞生存又は B 細胞増殖及び生存の両方)を刺激する抗体を意味する。

10

20

30

40

50

【0046】

「CD20」抗原は、末梢血又はリンパ系器官の90%以上のB細胞の表面で見出される分子量およそ35kDの非グルコシル化膜結合型リンタンパク質である。CD20は初期のプレB細胞発育中に発現し、プラズマ細胞分化まで残る；ヒトの幹細胞、リンパ球祖先細胞(プロジェニタ)または正常血漿細胞にはみられない。CD20は正常なB細胞及び悪性のB細胞の双方に存在する。文献でのCD20の他の名称には「Bリンパ球限局性分化抗原」及び「Bp35」がある。CD20抗原は、例えば、ClarkおよびLedbetter, Ad v. Can. Res. 52:81-149 (1989)、およびValentineら, J. Biol. Chem. 264(19):11282-1287 (1989)に記載されている。

CD20結合抗体および抗CD20抗体はここで交換可能に用いられ、抗体が抗原を発現する細胞を標的とした治療薬剤として有効な程度に親和性を持ってCD20を結合するすべての抗体を包含し、以下に記載のアッセイのネガティブコントロールタンパク質などの他のタンパク質と顕著な交差反応を示さない。また、抗体の一アームがCD20を結合する二重特異性抗体を包含する。このCD20結合抗体の定義によって前述の抗体の機能的断片(フラグメント)も包含する。CD20結合抗体は10nMより小さいKdでCD20を結合するであろう。好ましい実施態様では、該結合は7.5nMより小さい、より好ましくは5nMより小さい、さらにより好ましくは1-5nMの間、最も好ましくは1nMより小さいKdである。

【0047】

CD20抗原に結合する抗体の例には：現在「リツキシマブ」(「リツキサン(登録商標)」)と呼称される「C2B8」(米国特許第5,736,137号、出典明記によりここに特別に組み込まれる)；「Y2B8」または「イブリツモマブチウキセタン(Ibritumomab Tiuxetan)」ゼバリン(登録商標)と呼称されるイットリウム-[90]-標識2B8マウス抗体(米国特許第5,736,137号、出典明記によりここに特別に組み込まれる)；「トシツモマブ(Beckman Coulter)とも呼称され場合によっては¹³¹Iで標識して「131I-B1」抗体となるマウスIgG2a「B1」(ヨードI¹³¹トシツモマブ、BEXXARTM)米国特許第5,595,721号、出典明記によりここに特別に組み込まれる)；マウスモノクローナル抗体「1F5」(Press等. Blood 69(2):584-591 (1987)および「フレームワーク部分」またはヒト化1F5を含む変異体(国際公開公報03/002607, Leung, S.)；ATCC寄託番号HB-96450)；マウス2H7およびキメラ2H7抗体(米国特許第5,677,180号、出典明記によりここに特別に組み込まれる)；ヒト化2H7；huMax-CD20 (Genmab, Denmark)；AME-133 (Applied Molecular Evolution)；A20抗体又はその変異体、例えばキメラA20抗体ないしヒト化A20抗体(それぞれcA20、hA20) (US 2003/0219433, Immunomedics)；およびInternational Leukocyte Typing Workshopより入手可能なモノクローナル抗体L27、G28-2、93-1B3、B-C1またはNU-B2 (Valentine等., In: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987))が含まれる。

【0048】

本明細書中の「リツキシマブ」又は「リツキサン(登録商標)」なる用語は、CD20抗原に対する遺伝的に操作したキメラマウス/ヒトモノクローナル抗体を指し、出典明記によって本明細書中に組み込まれる米国特許第5,736,137号に記載の「C2B8」を表すものであり、CD20を結合する能力を有するその断片を含む。

具体的な実施態様では、抗CD20抗体はヒトおよび靈長類のCD20を結合する。具体的な実施態様では、CD20を結合する抗体はヒト化またはキメラである。CD20結合抗体には、リツキシマブ(リツキサン(登録商標))、m2H7(マウス2H7)、hu2H7(ヒト化2H7)、およびそのすべての機能的変異体、限定するものではないがhu2H7.v16(vはバージョンを表す)、v31、v73、v75並びにフコース欠乏性変異体、及び国際公開公報2004/056312に記載の他の2H7変異体が含まれる。特に明記しない場合、本明細書中に開示するヒト化2H7.v.16の配列及びその変異体は成熟ポリペプチド、すなわちリーダー配列を有さないものである。

10

20

30

40

50

【0049】

C D 2 0 抗体に関する特許および特許文献には、米国特許第5,776,456号、同第5,736,137号、同第5,843,439号、同第6,399,061号、および同第6,682,734号、並びに米国特許出願公開 US 2002/0197255A1、US 2003/0021781A1、US 2003/0082172 A1、US 2003/0095963 A1、US 2003/0147885 A1 (Anderson 等.)；米国特許第6,455,043B 1およびW000/09160 (Grillo-Lopez, A.)；W000/27428 (Grillo-LopezおよびWhite)；W000/27433 (Grillo-LopezおよびLeonard)；W000/44788 (Braslawsky 等)；W001/10462 (Rastetter, W.)；W001/10461 (RastetterおよびWhite)；W001/10460 (WhiteおよびGrillo-Lopez)；US2001/0018041 A1、US2003/0180292A1、W001/34194 (HannaおよびHariharan)；米国出願公開 US2002/0006404およびW002/04021 (HannaおよびHariharan)；米国出願公開 US2002/0012665 A1およびW001/74388 (Hanna, N.)；米国出願公開 US 2002/0058029 A1 (Hanna, N.)；米国出願公開 US 2003/0103971 A1 (HariharanおよびHanna)；米国出願公開 US2002/0009444A1、およびW001/80884 (Grillo-Lopez, A.)；W001/97858 (White, C.)；米国出願公開 US2002/0128488A1およびW002/34790 (Reff, M.)；W002/060955 (Braslawsky 等)；W02/096948 (Braslawsky 等)；W002/079255 (ReffおよびDavies)；米国特許第6,171,586B1、およびW098/56418 (Lam 等)；W098/58964 (Raju, S.)；W099/22764 (Raju, S.)；W099/51642、米国特許第6,194,551B 1、米国特許第6,242,195B 1、米国特許第6,528,624B 1および米国特許第6,538,124 (Idusogie 等)；W000/42072 (Presta, L.)；W000/67796 (Curd 等)；W001/03734 (Grillo-Lopez 等)；米国出願公開 US 2002/0004587A1およびW001/77342 (MillerおよびPresta)；米国出願公開 US2002/0197256 (Grewal, I.)；米国出願公開 US 2003/0157108 A1 (Presta, L.)；米国特許第6,565,827号B 1、同第6,090,365号B 1、同第6,287,537号B 1、同第6,015,542号、同第5,843,398号、および同第5,595,721号、(Kaminski 等)；米国特許第5,500,362号、同第5,677,180号、同第5,721,108号、同第6,120,767号、同第6,652,852号B1 (Robinson 等)；米国特許第6,410,391号B1 (Raubitschek 等)；米国特許第6,224,866B1およびW000/20864 (Barbera-Guillem, E.)；W001/13945 (Barbera-Guillem, E.)；W000/67795 (Goldenberg)；米国出願公開 US 2003/0133930 A1およびW000/74718 (GoldenbergおよびHansen)；W000/76542 (Golay 等)；W001/72333 (WolinおよびRosenblatt)；米国特許第6,368,596B 1 (Ghetie 等)；米国特許第6,306,393および米国出願公開 US2002/0041847 A1、(Goldenberg, D.)；米国出願公開 US2003/0026801A1 (WeinerおよびHartmann)；W002/102312 (Engleman, E.)；米国特許出願公開 2003/0068664 (Albitar 等)；W003/02607 (Leung, S.)；WO 03/049694、US2002/0009427A1、およびUS 2003/0185796 A1 (Wolin 等)；W003/061694 (SingおよびSiegall)；US 2003/0219818 A1 (Bohen 等)；US 2003/0219433 A1およびWO 03/068821 (Hansen 等)；US2003/0219818A1 (Bohen 等)；US2002/0136719A1 (Shenoy 等)；W02004/032828 (Wahl 等)が含まれ、これらは出典明記により特別に組み込まれる。また、米国特許第5,849,898および歐州出願番号330,191 (Seed 等)；米国特許第4,861,579およびEP332,865A2 (MeyerおよびWeiss)；USP 4,861,579 (Meyer 等)；W095/03770 (Bhat 等)；US 2003/0219433 A1 (Hansen 等)を参照のこと。

【0050】

C D 2 0 抗体は、そのままの抗体または細胞障害性合成物、例えば放射性同位元素又は毒素などに抱合したものでありうる。このような抗体には、放射性同位元素、イットリウム-90 に連結した抗体ZevalinTM(IDEA Pharmaceuticals, San Diego, CA)、とI-131を抱合したBexxarTM(Corixa, WA)とが含まれる。ヒト化2H7変異体には、F R のアミノ酸置換と移植されたC D R に変異を持つ親和性成熟変異体を有するものが含まれる。C D R 又はF R の置換されたアミノ酸は、ドナー又はアクセプタ抗体にあるものに限らない。他の実施態様では、さらに本発明の抗C D 2 0 抗体は、C D C および/またはA D C C 機能およびB 細胞殺傷(またここではB 細胞枯渇とも称する)の亢進を含むエフェクター機能の改善を導くF c 領域のアミノ酸残基変化を含む。記載のように(Idusogie 等., 上掲(2001)；Shields 等., 上掲)、特に、3つの突然変異はC D C およびA D C C 活性を改良することが同定された：S 2 9 8 A / E 3 3 3 A / K 3 3 4 A(またここでは3つのA 1 a 突然変異または変異体として示す；F c 領域の番号付けはE U 番号付けシステムに従う；Ka 10 20 30 40 50

bat 等. , 上掲)。

本発明の他の抗 C D 2 0 抗体には、安定性を改善する特定の変化を有するものが含まれる。一実施態様では、キメラ抗 C D 2 0 抗体はマウス V 領域およびヒト C 領域を有する。そのようなある特定のキメラ抗 C D 2 0 抗体はリツキサン(登録商標)(リツキシマブ(登録商標); Genentech, Inc.)である。リツキシマブおよび hu 2 H 7 は補体依存性細胞障害(C D C)および抗体依存性細胞性細胞障害(A D C C)の両方を介して B 細胞の溶解を媒介しうる。改変した F c 領域アミノ酸配列および亢進または減弱した C 1 q 結合能を有する抗体変異体は、米国特許第6,194,551号および国際公開公報99/51642に記載されている。それら特許公報の内容は出典明記によって特別にここに組み込まれる。また、Idusogie 等. J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)も参照のこと。

10

【 0 0 5 1 】

アポトーシスのインヒビター(IAP)は、アポトーシスを抑制するタンパク質のファミリーを指す(Deveraux, 等, (1999) Genes Dev 13(3):239-252)。I A P の例には、メラノーマIAP (ML-IAP)及びヒトX染色体連鎖IAP (XIAP)細胞性IAP 1 (cIAP-1)、及び細胞性IAP 2 (cIAP-2)などがあり、これらはカスパーーゼ3、カスパーーゼ7及びカスパーーゼ9活性を抑制する(Deveraux 等, J Clin Immunol (1999), 19:388-398; Deveraux 等, (1998) EMBO J. 17, 2215-2223; Vucic 等, (2000) Current Bio 10:1359-1366)。

I A P のインヒビター(I A P インヒビター)の例には、XIAP、cIAP-1、cIAP-2又はML-I APに関するアンチセンスオリゴヌクレオチド、Smac/DIABLO由来ペプチド又は、I A P とそのカスパーーゼとの相互作用を阻止する他の分子、及びカスパーーゼ活性の I A P 媒介性抑制を阻害する分子などがある(Sasaki 等, Cancer Res., 2000, 60(20):5659; Lin 等, Biochem J., 2001, 353:299; Hu 等, Clin. Cancer Res., 2003, 9(7):2826; Arnt 等, J. Biol. Chem., 2002, 277(46):44236; Fulda 等, Nature Med., 2002, 8(8):808; Guo 等, Blood, 2002, 99(9):3419; Vucic 等, J. Biol. Chem., 2002, 277(14):12275; Yang 等, Cancer Res., 2003, 63(4):831); 国際公開公報2005/097791、国際公開公報2005/094818、US 2005/0197403及びUS 6,673,917)。

20

【 0 0 5 2 】

本明細書中で「B 細胞表面マーカー」又は「B 細胞表面抗原」とは、B 細胞の表面上に発現する抗原であり、結合すべきアンタゴニストの標的となることができる。例示的 B 細胞表面上マーカーには、限定するものではないが、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD52、D53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86、CD180 (RP105)、FcRH2 (IRTA4)、CD79A、C79B、CR2、CCR6、CD72、P2X5、HLA-DOB、CXCR5 (BLR1)、FCER2、BR3 (aka BA FF-R)、TAC1、BTLA、NAG14 (aka LRRC4)、SLGC16270 (ala LOC283663)、FcRH1 (IRTA5)、FcRH5 (IRTA2)、ATWD578 (aka MGC15619)、FcRH3 (IRTA3)、FcRH4 (IRTA1)、FcRH6 (aka LOC343413)及びBCMA (aka TNFRSF17)、HLA-DO、HLA-Dr10及びMHC クラスIIが含まれる。

30

【 0 0 5 3 】

好適な実施態様では、本発明の抗体は、寄託されて、国際公開公報02/24909に記載される 9.1 抗体及び 2.1 抗体を含まない。

好適な実施態様では、本明細書中で用いる「見かけの K d 」又は「見かけの K d 値」は、一実施態様では、B I A c o r e (登録商標)アッセイを行うなどして表面プラスモン共鳴法によって測定される。ある好適な実施態様では、本発明の B R 3 結合抗体の見かけの K d 値は表面プラスモン共鳴法によって測定されるものであり、この方法では、例えば本明細書中の実施例 8 に記載のように、B R 3 E C D をセンサーチップに固定して、F a b 型の抗 B R 3 抗体を B R 3 E C D 固定チップに流すか、I g G 型の抗 B R 3 抗体をセンサーチップ上に固定して、B R 3 E C D を I g G 固定センサーチップに流すかのいずれかである。ある好適な実施態様では、センサーチップをタンパク質とともに固定して、チップ上の結合したタンパク質の反応単位(R U)がおよそ 10 となるようにした。他の好適な実施態様では、本発明の F c R n 結合抗体の見かけの K d 値は、表面プラスモン共鳴法を行って測定されるものであり、この方法では、実施例 16 に記載のように、F c R n

40

50

ポリペプチドをセンサーチップに固定して、抗体をチップに流す。

【0054】

本発明の「機能的エピトープ」は、抗体の結合にエネルギー的に関与する抗原のアミノ酸残基を意味する。エネルギー的に関与している抗原の残基の何れか一の変異(例えば、アラニン又はホモログ突然変異による野生型 B R 3 の突然変異)により、抗体の抗原への結合が破壊される。本発明の好適な実施態様では、抗 B R 3 抗体寿の機能的なエピトープ内に包含される残基は、B R 3 の a 1 a 突然変異ないしはその部位(例えば細胞外ドメイン又は研究中の所望領域の残基 17 - 42)を表出するファージを用いたショットガンアラニンスキャニングによって決定することができる。一実施態様では、機能的なエピトープは実施例 9 に記載の手順に従って決定する。

10

【0055】

「可変」という用語は、可変ドメインのある部分が、抗体間で配列が広く異なることを意味する。V 領域は抗原結合を仲介し、その特異的抗原に対する特異的抗体の特異性を規定するものである。しかし、可変性は可変ドメインの 110 アミノ酸長を通して均一に分布しているわけではない。それどころか、V ドメインは、各々 9 - 12 アミノ酸長の「高頻度可変領域」と呼ばれる高度可変性短領域により区分される 15 - 30 アミノ酸のフレームワーク領域(F R)と呼ばれる相対的不可変伸展からなる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各々 4 つの F R 領域を含み、これは主に -シート配置をとり、3 つの高頻度可変領域に結合してループ状結合を形成するが、-シート構造の一部を形成する場合もある。各鎖の高頻度可変領域は、F R 領域の直近に保持され、他の鎖からの高頻度可変領域と共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) を参照のこと)。定常ドメインは抗体の抗原への結合には直接関与しないが、抗体依存的細胞障害(A D C C)における抗体の関与のような様々なエフェクター機能を示す。

20

【0056】

ここで使用されるところの「高頻度可変領域」なる用語は、抗原結合に寄与する抗体のアミノ酸残基を意味する。高頻度可変領域は一般には「相補性決定領域」又は「C D R」からのアミノ酸残基(例えば、V_L の残基 24 - 34(L 1)、50 - 56(L 2) 及び 89 - 97(L 3) の周辺及び V_H の 31 - 35B(H 1)、50 - 65(H 2) 及び 95 - 102(H 3) の周辺(Kabat 等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)) 及び / 又は「高頻度可変ループ」の残基(例えば、V_L の残基 26 - 32(L 1)、50 - 52(L 2) 及び 91 - 96(L 3) 及び V_H の残基 26 - 32(H 1)、52A - 55(H 2) 及び 96 - 101(H 3)(Chothia 及び Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)) を含む。

30

高頻度可変領域は以下のような「延長した高頻度可変領域」を含む: V_L の 24 - 36 又は 24 - 34(L 1)、46 - 56 又は 50 - 56(L 2) 及び 89 - 97(L 3)、及び V_H の 26 - 35(H 1)、50 - 65 又は 49 - 65(H 2) 及び 93 - 102、94 - 102 又は 95 - 102(H 3)。可変ドメイン残基は、それぞれを定義するために上掲の Kabat 等に従って番号付けする。

40

【0057】

「フレームワーク」又は「F R」残基はここで定義するように高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。例えば、軽鎖フレームワーク 1(L C - F R 1)、フレームワーク 2(L C - F R 2)、フレームワーク 3(L C - F R 3) 及びフレームワーク 4(L C - F R 4) 領域は、それぞれ抗体の残基番号 1 - 23、35 - 49、57 - 88 及び 98 - 107(カバット番号付けシステム)を含む。他の例では、重鎖フレームワーク 1(H C - F R 1)、重鎖フレームワーク 2(H C - F R 2)、重鎖フレームワーク 3(H C - F R 3) 及び重鎖フレームワーク 4(H C - F R 4) は、それぞれ抗体の残基 1 - 25、36 - 48、66 - 92 及び 103 - 113(カバット番号付けシステム)を含む。

【0058】

50

一実施態様に従って、9.1、2.1及び11G9抗体由来の抗体の軽鎖のCDR領域内の大部分の残基に対応する残基を図1-3に下線で示す。他の実施態様に従って、V3抗体由来の抗体の重鎖及び軽鎖のCDR領域内の大部分の残基に対応する残基を図15に下線で示す。

ここで示すように、「コンセンサス配列」または定常Vドメイン配列は、公知のヒト免疫グロブリン可変領域配列の比較したアミノ酸配列由来の人工の配列である。この比較に基づいて、ヒトおよびヒトH鎖サブグループI I I Vドメイン由来のコンセンサス配列であるVドメインアミノ酸をコードする組み換え核酸配列を調製した。コンセンサスV配列は公知の抗体結合特異性も親和性も持たない。

【0059】

ここで使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を意味する、すなわち、一般的に少量で存在しうる突然変異などの、モノクローナル抗体の生成中に生じる可能性のある突然変異体を除いて、集団を含む個々の抗体が同一及び/又は同じエピトープに結合する。このようなモノクローナル抗体には典型的には、標的を結合するポリペプチド配列を含んでなる抗体が含まれ、この標的結合ポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列からの単一の標的結合ポリペプチド配列の選択を含む方法によって入手されたものである。例えば、選別方法は、ハイブリドーマクローニング、ファージクローニング又は組み換えDNAクローニングのプールなどの複数のクローニングからの特定のクローニングの選別でもよい。選別した標的結合配列は、例えば標的に対する親和性を改善するため、標的結合配列をヒト化するため、細胞培養物内での產生を改善するため、インビボの免疫原性を低減するため、多特異性抗体を作製するなどのためにさらに変更することができること、並びに変更した標的結合配列を含んでなる抗体も本発明のモノクローナル抗体であることは理解されるであろう。一般に、異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体調製物と比べて、各モノクローナル抗体調整物のモノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対するものである。その特異性に加えて、モノクローナル抗体調整物は、典型的に他のイムノグロブリンが混入する点で有利である。「モノクローナル」との修飾詞は、抗体の実質的に均一な集団から得られるという抗体の性質を示すものであり、抗体を何か特定の方法で生成しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明において用いられるモノクローナル抗体は、様々な技術、例えばハイブリドーマ法(例えばKohler等, *Nature*, 256:495 (1975); Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling等, : *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, (Elsevier, N.Y., 1981)、組み換えDNA法(例えば米国特許第4,816,567号を参照)、ファージディスプレイ技術(例えばClackson等, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991); Sidhu等, *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004); Lee等, *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34):12467-12472 (2004); 及びLee等 *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004)を参照)、及び一部ないしはすべてのヒトイムノグロブリン遺伝子座又はヒトイムノグロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物からヒトないしはヒト様抗体を生成するための技術(例えば、国際公開公報98/24893、国際公開公報/9634096、国際公開公報/9633735、及び国際公開公報/91 10741、Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits等, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggemann等, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); 米国特許第5,545,806号、同第5,569,825号、同第5,591,669号(すべてGenPharm); 同第5,545,807号; 国際公開公報97/17852米国特許第5,545,807号; 同第5,545,806号; 同第5,569,825号; 同第5,625,126号; 同第5,633,425号; 及び同第5,661,016、及びMarks等, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992); Lonberg等, *Nature*, 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996); 及びLonberg and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995))によって作製してもよい。

10

20

30

40

50

【0060】

ここで、モノクローナル抗体は、重鎖及び／又は軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体、あるいは特定の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同性があり、鎖の残りの部分が他の種由来の抗体、あるいは他の抗体クラス又はサブクラスに属する抗体の対応する配列と同一であるか又は相同である「キメラ」抗体、並びにそれが所望の生物的活性を有する限りこのような抗体の断片を特に含む(米国特許第4,816,567号；Morrison等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855(1984))。キメラ抗体の作製方法は当分野で公知である。

【0061】

非ヒト(例えばマウス)抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖又はその断片(例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂又は抗体の他の抗原結合サブ配列)である。いくつかの実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギなどの所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種のCDRの残基(ドナー抗体)によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。ある例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基が、対応する非ヒト残基によって置換される。更に、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくは導入したCDR又はフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性を更に洗練し、最大にするために行われる。一般に、ヒト化抗体は少なくとも1つの可変ドメインの実質的に全てを含むものであり、その可変ドメインは、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンに由来し、FR領域が結合親和性を改善しうる一ないし複数のアミノ酸置換を含みうるが、全てあるいは実質的に全てのFR領域がヒト免疫グロブリン配列のものである。FR内のアミノ酸置換の数は典型的には、H鎖内のたった6個と、L鎖内のたった3個である。ある好適な実施態様では、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)、一般的にはヒト免疫グロブリンのもの又はヒトコンセンサス定常配列の少なくとも一部も含む。更なる詳細については、Jones等, Nature, 321:522-525(1986)；Reichmann等, Nature 332:323-329(1988)；及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol., 2:593-596(1992)を参照のこと。ヒト化抗体には、抗体の抗原結合領域が、例えば対象の抗原でマカクザルを免疫化することによって產生した抗体由来のものであるPRIMATIZED(登録商標)抗体が含まれる。ヒト化抗体の作製方法は当分野において公知である。

【0062】

ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブリを含む従来技術に既知の様々な技術を用いて作成することができる。Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)；Marks等、J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。また、Cole等及びBoerner等の技術が、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用可能である。Cole等、Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)；Boerner等、J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)。また、Lonberg and Huszar, Int. Rev. Immunol. 13:65-93 (1995)を参照のこと。PCT国際公開公報98/24893；国際公開公報92/01047；国際公開公報96/34096；国際公開公報96/33735；欧州特許第0 598 877号；米国特許第5,413,923号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,569,825号；同第5,661,016号；同第5,545,806号；同第5,814,318号；同第5,885,793号；同第5,916,771号；及び同第5,939,598号。

【0063】

「抗体断片」には、全長の抗体の一部、一般的にその抗体の抗原結合領域又は可変領域が含まれる。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片；ダイアボディー(diabodies)；直鎖状抗体；单鎖抗体分子；及び抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

「Fv」は、完全な抗原認識および結合部位を含む最小限抗体断片である。この断片は、一重鎖と一軽鎖可変領域ドメインが密接に非共有結合した二量体よりなる。この2つのドメインのフォールディングから6つの高頻度可変性ループ(H鎖およびL鎖のそれぞれ

10

20

30

40

50

から3ループずつ)が生じ、それにより抗原結合にアミノ酸残基を寄与して抗体に抗原結合特異性をもたらす。しかしながら、単鎖可変ドメイン(または抗原特異的なCDRを3つしか含まないFvの半分)でさえ、結合部位全体より親和性は低いが、抗原を認識して結合する能力を持つ。

本発明のBR3結合抗体の「機能的断片」は、断片が由来する完全鎖分子と実質的に同じ親和性でBR3へに結合し、本明細書中で記載されるインビトロ又はインビボアッセイによって測定されるような、B細胞枯渇、B細胞増殖の抑制又はBR3へのBAFFの結合の抑制からなる群から選択される少なくとも一のアッセイにおいて活性である、断片である。

【0064】

10

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害；Fcレセプター結合性；抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC)；貪食作用；細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター)のダウンレギュレーション；及びB細胞活性化が含まれる。「天然配列Fc領域」は、天然に見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。Fc配列の例は、配列番号133、135-141に記載され、天然配列ヒトIgG1 Fc領域(非A及びAアロタイプ、それぞれ配列番号133及び135)；天然配列ヒトIgG2 Fc領域(配列番号136)；天然配列ヒトIgG3 Fc領域(配列番号137)；及び天然配列ヒトIgG4 Fc領域(配列番号138)並びに天然に生じるこれらの変異体が含まれる。天然配列マウスFc領域は配列番号139-142(それぞれIgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3)に記載される。

20

【0065】

20

「変異体Fc領域」は、少なくとも一つの「アミノ酸修飾」によって天然配列Fc領域のアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異体Fc領域は、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域と比較し、少なくとも一つのアミノ酸置換を有する、例えば、天然配列Fc領域又は親ポリペプチドのFc領域において、約1から約10アミノ酸置換、及び好ましくは約1から約5アミノ酸置換である。一実施態様では、本明細書中の変異体Fc領域は、天然配列Fc領域(例えば配列番号133)と少なくとも約80%同一性、少なくとも約85%同一性、少なくとも約90%同一性、少なくとも約95%同一性、又は少なくとも約99%同一性を有する。他の実施態様では、本明細書中の変異体Fc領域は、親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80%同一性、少なくとも約85%同一性、少くとも約90%同一性、少なくとも約95%同一性、又は少なくとも約99%同一性を有する。

30

【0066】

30

本明細書中で定義する抗体配列及びポリペプチド配列に対する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」又は「同一性(相同性)」は、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えて、配列を整列させ、比較するポリペプチド中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、アラインメントを測定するための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を用いて得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテク社によって作成され、ソースコードは米国著作権庁、Washington D.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087の下で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテク社、South San Francisco, Californiaを通して公的に入手可能である。ALIGN-2プログラムは、

40

50

UNIXオペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

【0067】

「Fc領域を含んだポリペプチド」という用語は、Fc領域を含む抗体もしくはイムノアドヘンシン(下記記載の定義を参照)などのポリペプチドのことを指す。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムに従うと残基447)は、例えば、ポリペプチドの精製中又はポリペプチドをコードする核酸を組み換え操作することによって除去してもよい。したがって、本発明のFc領域を有する、抗体などのポリペプチドを含んでなる組成物は、すべてのK447残基が除去されたポリペプチド集団、除去されるK447残基のないポリペプチド集団又はK447残基を有するポリペプチドとK447を有さないポリペプチドが混合しているポリペプチド集団を包含する。

10

【0068】

本明細書及び特許請求の範囲すべてにわたって、一般的に、可変ドメインの残基を指す場合にはカバット番号付けシステムを用いる(およそ、軽鎖の残基1-107と重鎖の残基1-113)(例として、Kabat等, *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。一般的に、イムノグロブリン重鎖定常領域内の残基を指す場合には、「EU番号付けシステム」又は「EUインデックス」を用いる(EUインデックスはKabat等, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)において報告されており、出典明記によって本明細書中に特別に組み込まれる)。本明細書中で特に述べない限り、抗体の可変ドメイン内の残基の数の参照は、カバット番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する。本明細書中で特に述べない限り、抗体の定常ドメイン内の残基の数の参照は、EU番号付けシステムによって番号付けした残基を意味する(例として、米国特許仮出願番号60/640,323、EU番号付けについての図を参照)。

20

【0069】

「Fcレセプター」もしくは「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を指す。一実施態様では、本発明のFcRは、IgG抗体(ガンマ受容体)と結合するもので、FcR I、FcR I I およびFcR I I Iサブクラスを含み、これらレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされたものも含まれる。FcR I I受容体には、FcR I I A(「活性型受容体」)、FcR I I B(「阻害型受容体」)が含まれ、主として細胞質領域は異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型受容体FcR I I Aは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫受容体活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif ; ITAM)を含んでいる。阻害型受容体FcR I I Bは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫受容体阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif ; ITIM)を含んでいる(M. in Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997))。この用語には、Fc R IIIAアロタイプ:Fc R IIIA-Phe158、Fc R IIIA-Val158、Fc RIIA-R131及び/又はFc RIIA-H131などのアロタイプが含まれる。FcRsに関しては、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel等, *Immunomethods* 4:25-34 (1994); de Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)に総説されている。他のFcRs、ここでは、将来的に同定されるものも含めて、「FcR」という言葉によって包含される。また、「FcR」という言葉は、母性IgGsが胎児に受け継がれる要因となっている新生児性受容体「FcRn」(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976)およびKim等, *J. Immunol.* 24:249 (1994)も含まれる。

30

【0070】

「FcRn」なる用語は、新生児Fcレセプター(FcRn)を意味する。FcRnは主要組織適合性複合体(MHC)と構造的に類似しており、2ミクログロブリンに非共有的に結合した鎖からなる。新生児FcレセプターFcRnの複数の機能は、Ghetie and Ward (2000) *Annu. Rev. Immunol.* 18, 739-766に概説される。FcRnは母親から子への

40

50

イムノグロブリン Ig G の受動的な運搬と、血清 Ig G レベルの調節を担う。FcRn は、細胞内及び細胞間でピノサイトーシスされた完全な形の Ig G を結合して運搬し、標準の分解系経路から Ig G をレスキューするサルベージレセプターとして働くことができる。

国際公開公報00/42072(Presta)及びShieldsら, J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604(2001)には、FcR との結合が改良又は消滅した抗体変異体が記載されている。これらの文献は出典明記によって特別に本明細書中に組み込まれる。

ヒト Ig G Fc 領域の「CH1ドメイン」(「H1」ドメインの「C1」とも称される)は、通常およそアミノ酸 118 からおよそアミノ酸 215 (EU番号付けシステム)に伸展している。

10

【0071】

「ヒンジ領域」はヒト Ig G1 の Glu 216 から Pro 230 の伸展として一般に定義されている(Burton, Molec. Immunol. 22:161-206 (1985))。他の Ig G アイソタイプのヒンジ領域は、重鎖間 S-S 結合を形成する最初と最後のシステイン残基と同じ位置に配することにより、Ig G1 と整合させられる。

Fc 領域の「低ヒンジ領域」は、通常、カルボキシル末端からヒンジ領域、すなわち、Fc 領域の残基 233 から 239 までの伸展として定義されている。本発明に先立ち、FcR の結合には、一般に、Ig G Fc 領域の低ヒンジ領域内のアミノ酸残基が寄与しているとされていた。

20

【0072】

ヒト Ig G Fc 領域の「CH2ドメイン」(「H2」ドメインの「C2」とも呼ばれる)は通常およそアミノ酸 231 からおよそアミノ酸 340 まで伸展する。CH2ドメインは、他のドメインと密接には対をなさないという点で独特である。むしろ、2つのN-結合分岐炭水化物鎖が未変性の天然 Ig G 分子の2つのCH2ドメインの間に介在されている。炭水化物はドメイン-ドメイン対形成に対する代替物を提供し、CH2ドメインを安定化させるのに役立つと推測してきた。Burton, Molec. Immunol. 22: 161-206 (1985)。

「CH3ドメイン」(「H3」ドメイン又は「C2」とも呼ばれる)は、残基 C 末端から Fc 領域の CH2 ドメインへの伸長を含む(すなわち、およそアミノ酸残基 341 から抗体配列の C 末端まで、典型的には Ig G のアミノ酸残基 446 又は 447)。

30

【0073】

「機能的 Fc 領域」は、天然配列 Fc 領域の「エフェクター機能」を有する。模範的な「エフェクター機能」は、C1q 結合；補体依存性細胞障害性；Fc レセプター結合；抗体依存性細胞媒介障害活性；ファゴサイトーシス；細胞表層レセプターの下方制御(例えば、B 細胞レセプター；BCR)等を含む。このようなエフェクター機能は、一般的に、結合ドメインと結合する Fc 領域(例えば、抗体可変ドメイン)を必要とし、例えば本明細書中に記載の種々のアッセイを使用して評価することができる。

「C1q」は免疫グロブリンの Fc 領域に対する結合部位を含むポリペプチドである。C1q は二つのセリンプロテアーゼ C1r 及び C1s と共に、補体依存性細胞毒性(CDC)経路の最初の成分である複合体 C1 を形成する。ヒト C1q は例えば Quidel, San Diego, CA から市販されている。

40

「結合ドメイン」なる用語は、他の分子に結合するポリペプチドの領域を意味する。FcR の場合には、結合ドメインは Fc 領域の結合の原因であるそのポリペプチド鎖の一部(例えばその鎖)を含みうる。一つの有用な結合ドメインは FcR 鎖の細胞外ドメインである。

【0074】

「改変された」FcR 結合親和性または ADC C 活性を有するポリペプチド変異体を含むポリペプチドとは、親ポリペプチドもしくは天然配列 Fc 領域を有するポリペプチドと比較して強化または減弱化された FcR 結合活性(例えば FcR または FcRn)及び/又は ADC C 活性を持つものである。

FcR に対して「亢進した結合能を示す」変異形 Fc は、親ポリペプチド又は天然配列

50

の IgG Fc よりは高い親和性(例えば低い見かけの Kd 値又は IC50 値)を有する少なくとも一の FcR を結合する。いくつかの実施態様では、親ポリペプチドと比較したときの結合の改善はおよそ 3 倍、好ましくはおよそ 5、10、25、50、60、100、150、200、500 倍まで、またはおよそ 25% から 1000% の結合の改善である。FcR に対して「減弱した結合能を示す」ポリペプチド変異体は、親ポリペプチドよりも弱い親和性で少なくとも一の FcR に結合する。親ポリペプチドと比較したときの結合の減弱は、およそ 40% またはそれ以上の結合の減弱であってもよい。一実施態様では、FcR に対して減弱化した結合能を示す Fc 变異体は、ほとんどあるいは全く感知できないくらいの弱い FcR への結合能、例えば、天然配列の IgG Fc 領域と比較して 0 - 20% の FcR 結合能、または、ここで示される実施例のような結合能しか有していない可能性がある

10

【0075】

「抗体依存性細胞障害活性」または「ADCC」は、特定の細胞障害性細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球、及びマクロファージ)上に存在する Fc レセプター(FcR)に結合した分泌型 IgG が細胞障害性エフェクター細胞を抗原保持標的細胞に特異的に結合させ、続いて標的細胞を細胞障害性によって標的細胞を殺傷する細胞障害性の形態を指す。抗体は細胞障害性細胞「に対するものであり」、必ず細胞の殺傷に必要である。ADCC を媒介する一次細胞である NK 細胞は、FcR IIIのみを発現する一方、単球は FcR I、FcR II 及び FcR III を発現する。造血性細胞での FcR の発現は、Ravetch 及び Kinet, Annu. Rev. Immunol., 9:457-92(1991) の 464 頁の表 3 に要約されている。対象分子の ADCC 活性を評価するためには、米国特許第 5500362 号又は第 5821337 号、又は以下の実施例に記載されているようなインビトロ ADCC アッセイが実施される。そのようなアッセイのための有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞(PBMC) 及びナチュラルキラー細胞(NK) 細胞を含む。あるいは、又は付加的に、対象分子の ADCC 活性は、例えば Clynes 等, PNAS(USA), 95:652-656(1998) に開示されたような動物モデルにおいて、インビオで評価されてもよい。

20

【0076】

ヒトエフェクター細胞存在下において、野生型 IgG Fc を有するポリペプチドないし親ポリペプチドよりも効果的に「抗体依存性細胞傷害(ADCC)を媒介する」または「亢進した ADCC を示す」変異形 Fc 領域を含有するポリペプチドは、アッセイに用いる野生型 Fc 領域を有するポリペプチド(ないし親ポリペプチド)と変異形 Fc 領域を有するポリペプチドの量を実質的に同じにした場合、インビトロもしくはインビオにおいて実質的により効果的に ADCC を媒介する変異体のことである。一般にそのような変異体は、ここで開示するインビトロでの ADCC アッセイを用いる事で同定する事ができるであろう。しかし、ADCC を測定するその他のアッセイもしくは方法(例えば、動物モデルによるアッセイ)なども考慮すべき方法である。ある実施態様では、好適な変異体は、野生型 Fc よりも ADCC の媒介において約 5 倍から約 100 倍、例えば約 25 倍から約 50 倍の有効性である。

30

【0077】

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。古典的な補体経路の活性化は、補体活性化経路は補体系(C1q)の第 1 補体が、同族抗原と結合した(好適なサブクラスの)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDC アッセイを、例えば Gazzano-Santoro 等, J. Immunol. Methods 202:163 (1996) に記載されているように実施することができる。

40

変更した Fc 領域アミノ酸配列と亢進したないしは減弱した C1q 結合能を有するポリペプチド変異体は、米国特許第 6,194,551 号 B1 及び国際公開公報 99/51642 に記載される。これらの特許文献の内容は、出典明記によって特別に本明細書中に組み込まれる。また、Idusogie 等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000) を参照。

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又はそれ以上の FcRs を発現し、エフェクター機能を発揮する白血球のことである。一実施態様では、その細胞が少なくとも FcR I I

50

Iを発現し、ADC Cエフェクター機能を発揮する。ADC Cを媒介するヒト白血球の例として、末梢血単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞傷害性T細胞、好中球、が含まれるが、PBMCsとNK細胞が好適である。エフェクター細胞は天然の材料(例えば、ここで述べるように、血液やPMBCs)から単離してもよい。

【0078】

FcRnへの結合の測定方法は公知のもの(例としてGhetie 1997, Hinton 2004を参照)並びに、以下の実施例に記載のものである。インビオでのヒトFcRnへの結合とヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又はFc変異体を投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。一実施態様では、変異体IgGFcを有する本発明の具体的な抗体及びポリペプチドは、野生型IgGFcを有するポリペプチドよりも少なくとも2倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、少なくとも60倍、少なくとも70倍、少なくとも80倍、少なくとも100倍、少なくとも125倍、少なくとも150倍に亢進したヒトFcRnへの結合親和性を示す。具体的な実施態様では、ヒトFcRnに対する結合親和性はおよそ170倍亢進している。

10

【0079】

FcRnへの結合親和性について、一実施態様では、ポリペプチドのEC50又は見かけのKd(pH6.0での)は、1uMより小さい、より好ましくは100nM以下、より好ましくは10nM以下である。一実施態様では、FcRIII(F158;すなわち低親和性アイソタイプ)への亢進した結合親和性について、EC50又は見かけのKdは10nM以下であり、FcRIII(V158;高親和性アイソタイプ)について、EC50又は見かけのKdは3nM以下である。他の実施態様では、試験抗体とコントロール抗体の結合曲線の中間点における吸光度の値の比(例えば $A_{450\text{ nm}}(\text{抗体})/A_{450\text{ nm}}(\text{コントロールAb})$)が40%以下である場合に、コントロール抗体(例えばハーセプチン(登録商標)抗体)との相対的なFcレセプターに対する抗体結合の減少は、コントロール抗体と有意に相関しているとみなしうる。他の実施態様では、試験抗体とコントロール抗体の結合曲線の中間点における吸光度の値の比(例えば $A_{450\text{ nm}}(\text{抗体})/A_{450\text{ nm}}(\text{コントロールAb})$)が125%以上である場合に、コントロール抗体(例えばハーセプチン(登録商標)抗体)との相対的なFcレセプターに対する抗体結合の増加は、コントロール抗体と有意に相関しているとみなしうる。例として実施例16を参照。

20

【0080】

「親ポリペプチド」又は「親抗体」は、変異体ポリペプチドないし抗体が生じるアミノ酸配列及び変異体ポリペプチドないし抗体が比較されるアミノ酸配列を含んでなるポリペプチドないし抗体である。典型的には、親ポリペプチドないし親抗体は、ここに開示した又は複数のFc領域修飾を欠き、ここに開示したポリペプチド変異体と比較してエフェクター機能が異なる。親ポリペプチドは天然配列のFc領域又は(例えば付加、欠失及び/又は置換のような)本来存在するアミノ酸配列の修飾を有するFc領域を含みうる。

30

「融合タンパク質」および「融合ポリペプチド」は、共有結合で互いに結合した2つの部分を持つポリペプチドを指す。ほとんどの実施態様では、各部位は、典型的には天然では互いに結合しないポリペプチド配列であり、及び/又は異なる特性を有する。この特性は、例えばインビトロまたはインビオ活性などの生物学的性質でよい。この特性はまた、单一の化学的または物理的性質、例えば対象分子との結合、反応の触媒などかもしれない。この2つの部分は单一のペプチド結合によって直接、または1つまたは複数のアミノ酸残基を含んでいるペプチドリンカーを介して結合していてもよい。通常、この2つの部分とリンカーは同じ読み枠に存在する。

40

【0081】

「単離された」抗体ないしポリペプチドは、それが産生される環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものを意味する。その自然環境の汚染成分は、抗体の診断又は治療への使用を妨害しうる物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。一実施態様においては、抗体ないしポリペプチドは、(

50

1)ローリー(Lowry)法により定量して、95重量%の抗体より多くなるほど、最も好ましくは99重量%より多くなるまで、(2)スピニングカップシーケエネーターを使用することにより、N末端あるいは内部アミノ酸配列の少なくとも15の残基を得るのに充分な程度まで、あるいは、(3)クーマシープルーあるいは好ましくは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEによる均一性が得られるように充分な程度まで精製される。抗体の自然環境の少なくとも一つの成分が存在しないため、単離された抗体ないしポリペプチドには、組換え細胞内のインサツの抗体ないしポリペプチドが含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも1つの精製工程により調製される。

【0082】

「単離された」ポリペプチドコード化核酸ないし他のポリペプチドコード化核酸は、同定され、ポリペプチドコード化核酸の天然供給源に通常付随している少なくとも1つの汚染核酸分子から分離された核酸分子である。単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、天然に見出される形態あるいは設定以外のものである。故に、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、天然の細胞中に存在する特定のポリペプチドコード化核酸分子とは区別される。しかし、単離されたポリペプチドコード化核酸分子は、例えば、核酸分子が天然の細胞のものとは異なった染色体位置にあるポリペプチドを通常発現する細胞に含まれるポリペプチドコード化核酸分子を含む。

「コントロール配列」なる用語は、特定の宿主生物において作用可能に結合されたコード配列を発現するために必要なDNA配列を指す。例えば原核生物に好適なコントロール配列は、プロモーター、場合によってはオペレータ配列、及びリボソーム結合部位を含む。真核生物の細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナル及びエンハンサーを利用することができる。

【0083】

核酸は、他の核酸配列と機能的な関係にあるときに「作用可能に結合され」ている。例えば、プレ配列あるいは分泌リーダーのDNAは、ポリペプチドの分泌に寄与するプレタンパク質として発現されているならそのポリペプチドのDNAに作用可能に結合されている；プロモーター又はエンハンサーは、配列の転写に影響を及ぼすならばコード配列に作用可能に結合されている；又はリボソーム結合部位は、もしそれが翻訳を容易にするような位置にあるならコード配列と作用可能に結合されている。一般的に、「作用可能に結合される」とは、結合されたDNA配列が近接しており、分泌リーダーの場合には近接していて読み取り枠内にある。しかし、エンハンサーは必ずしも近接しているわけではない。結合は簡便な制限部位でのライゲーションにより達成される。そのような部位が存在しない場合は、通常の手法にしたがって、合成されたオリゴヌクレオチドアダプターあるいはリンクマーが使用される。

【0084】

「ベクター」はシャトルおよび発現ベクターを含む。一般的に、プラスミドコンストラクトも複製起源(例として、C_ol E 1複製起源)および選択マーカー(例として、アンピシリンまたはテトラサイクリン耐性)をそれぞれ細菌内のプラスミドの複製および選択を目的として含むであろう。「発現ベクター」は必要なコントロール配列または本発明の抗体断片を含む抗体の発現の調節因子を細菌または真核細胞内で含むベクターを表す。好適なベクターは以下に示す。

本発明のBR3結合抗体を産生する細胞には、抗体をコードする核酸が導入されている細菌細胞及び真核細胞が含まれるであろう。好適な宿主細胞を以下に開示する。

【0085】

ハイブリダイゼーション反応の「ストリンジエンサー」は、当業者によって容易に決定され、一般的にプローブ長、洗浄温度、及び塩濃度に依存する経験的な計算である。一般に、プローブが長くなると適切なアニーリングに必要な温度が高くなり、プローブが短くなるとそれに必要な温度は低くなる。ハイブリダイゼーションは、一般的に、相補鎖がその融点より低い環境に存在する場合に、変性DNAの再アニールする能力に依存する。プローブとハイブリダイゼーション配列の間で所望される相同性の程度が高くなればなるほど

10

20

30

40

50

ど、用いることができる相対温度が高くなる。その結果、より高い相対温度は、反応条件をよりストリンジエントにすることになり、低い温度はストリンジエントを低下させることになる。ハイブリダイゼーション反応のストリンジエンシーの更なる詳細及び説明については、Ausubel等、*Current Protocols in Molecular Biology*(Wiley Interscience Publishers, 1995)を参照のこと。

【0086】

ここで定義される「ストリンジエント条件」又は「高度なストリンジエンシー条件」は、(1)洗浄に低イオン強度及び高温度を用いる、例えば、50度、0.015Mの塩化ナトリウム/0.0015Mのクエン酸ナトリウム/0.1%のドデシル硫酸ナトリウム；(2)ハイブリダイゼーション中にホルムアミド等の変性剤を用いる、例えば、42度、50% (v/v)ホルムアミドと0.1%ウシ血清アルブミン/0.1%フィコール/0.1%のポリビニルピロリドン/50mMのpH 6.5のリン酸ナトリウムバッファー、及び750mMの塩化ナトリウム、75mMクエン酸ナトリウム；又は(3)42度、50%ホルムアミド、5×SSC (0.75MのNaCl、0.075Mのクエン酸ナトリウム)、50mMのリン酸ナトリウム(pH 6.8)、0.1%のピロリン酸ナトリウム、5×デンハード液、超音波処理サケ精子DNA (50 μg/ml)、0.1% SDS、及び10%の硫酸デキストラン溶液中で終夜ハイブリダイゼーションして、42度の0.2×SSC (塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム)中にて10分間洗浄し、ついで55度、EDTAを含む0.1×SSCからなる高ストリンジエンシー洗浄を10分間行うものによって同定される。

10

20

30

40

【0087】

「中程度のストリンジエント条件」は、Sambrook等、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (New York: Cold Spring Harbor Press, 1989)に記載されているように同定され、上記のストリンジエントより低い洗浄溶液及びハイブリダイゼーション条件(例えば、温度、イオン強度及び% SDS)の使用を含む。中程度のストリンジエント条件は、20%ホルムアミド、5×SSC (150mMのNaCl、15mMのクエン酸三ナトリウム)、50mMリン酸ナトリウム(pH 7.6)、5×デンハード液、10%硫酸デキストラン、及び20mg/mlの変性剪断サケ精子DNAを含む溶液中にて37度終夜インキュベーションし、次いで1×SSC中にて約37-50度フィルターを洗浄するといった条件である。当業者であれば、プローブ長などの因子に応じて、どのようにして温度、イオン強度等を調節するかは理解されるであろう。

【0088】

「エピトープタグ」なる用語は、ここで用いられるときは、「タグポリペプチド」と融合したポリペプチドを含んでなるキメラポリペプチドを意味する。タグポリペプチドは、その抗体が產生され得るエピトープを提供するのに十分な残基を有し、その長さは融合するポリペプチドの活性を阻害しないよう充分に短い。また、タグポリペプチドは、好ましくは抗体が他のエピトープと実質的に交差反応をしないようにかなり独特である。適切なタグポリペプチドは、一般に、少なくとも6のアミノ酸残基、通常は約8~50のアミノ酸残基(好ましくは、約10~20の残基)を有する。エピトープタグ化された本発明の抗体及びポリペプチドが包含される。

【0089】

本発明の抗BR3ポリペプチドないし抗体に関して「生物学的に活性」及び「生物学的な活性」及び「生物学的な特徴」とは、抗体ないしポリペプチドがBR3を結合することを意味する。ある好適な実施態様では、抗体はヒトBR3ポリペプチドを結合する。

更なる実施態様では、本発明の抗BR3ポリペプチドないし抗体は、以下の何れか一、何れかの組合せ又はすべての活性も有する：(1) 500nM以下、100nM以下、50nM以下、10nM以下、5nM以下又は1nM以下の見かけのKd値でヒトBR3細胞外ドメイン配列に結合する；(2) ヒトBR3細胞外ドメイン配列に結合し、500nM以下、100nM以下、50nM以下、10nM以下、5nM以下又は1nM以下の見かけのKd値でげっ歯動物のBR3細胞外ドメイン配列に結合する；(3) ヒトBAFF

50

へのヒト B R 3 の結合を阻害する。抗体の望ましい使用に応じて、さらに、抗体は以下の何れか一の活性を含みうる：(1) 野生型ないし天然配列の I g G F c と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて抗体依存性細胞性障害(A D C C)を有する；(2) 野生型ないし天然配列の I g G F c と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて A D C C を亢進している；又は(3) 野生型ないし天然配列の I g G F c と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて A D C C を減弱している。他の実施態様では、本発明の抗体は、野生型ないし天然配列の I g G F c を有するポリペプチドないし親ポリペプチドよりも高い親和性でヒト F c 新生児レセプター(F c R n)を結合する。

【 0 0 9 0 】

本発明のアンタゴニスト抗 B R 3 ポリペプチドないし抗体に関して「生物学的に活性」及び「生物学的な活性」及び「生物学的な特徴」とは、抗体ないしポリペプチドが以下の何れか一、何れかの組合せ又はすべての活性を有することを意味する：(1) B 細胞増殖を抑制する；(2) B 細胞生存を抑制する；(3) インビボの B 細胞を殺傷又は枯渇する。一実施態様では、このような抗 B R 3 抗体ないしポリペプチドで処理されていない適当なネガティブコントロール又は基準レベルと比較した場合に B 細胞の枯渇が少なくとも 20 % である。他の実施態様では、アンタゴニスト抗体は、野生型ないし天然配列の I g G F c と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて抗体依存性細胞性障害(A D C C)を有するか、野生型ないし天然配列の I g G F c と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて A D C C を亢進している。

本発明のアゴニスト抗 B R 3 ポリペプチドないし抗体に関して「生物学的に活性」及び「生物学的な活性」及び「生物学的な特徴」とは、抗体ないしポリペプチドが以下の何れか一、又は両方の活性を有することを意味する：(1) B 細胞増殖を刺激する；(2) B 細胞生存を刺激する。一実施態様では、アゴニスト抗体は、野生型ないし天然配列の I g G F c と比較してヒトエフェクター細胞存在下にて A D C C を減弱している。

【 0 0 9 1 】

本明細書中で具体的に開示されるアミノ酸配列は、特に定めない限り、近接するアミノ酸配列である。

本明細書中に記載した本発明のポリペプチドの変異は、例えば、保存的及び非保存的変異に関する技術及び指針のいずれかを用いて作成することができる。変異は、結果としてポリペプチドのアミノ酸配列の変化を生じる、ポリペプチドをコードする一又は複数のコドンの置換、欠失又は挿入であってもよい。アミノ酸置換は、一のアミノ酸を類似した構造及び/又は化学特性を持つ他のアミノ酸で置換すること、例えばロイシンのセリンへの置換、即ち保存的アミノ酸置換の結果であるとすることができる。挿入及び欠失は、場合によっては 1 から 5 のアミノ酸の範囲内であり得る。許容され得る変異は、配列にアミノ酸の挿入、欠失又は置換を系統的に作成し、生じた変異体を完全長又は成熟天然配列によって示される活性に関して試験することによって確かめられる。

【 0 0 9 2 】

本発明で使用される「保存的」アミノ酸置換という用語は、機能的に等価なアミノ酸を置換するアミノ酸置換を意味する。保存的アミノ酸変化により、結果として生じるペプチドのアミノ酸構造又は機能が最小限に変化する。例えば、類似の極性の一又は複数のアミノ酸は等価に作用し、ペプチドのアミノ酸配列に変化をもたらさない。一般に、グループ内での置換は、構造及び機能に関して保存的であるとみなす。しかしながら、特定の残基の役割はそれが存在している分子の 3 次元構造を背景に決定されることを当業者は認識しているであろう。例えば、C y s 残基は、還元された(チオール)形態よりも極性の低い酸化された(ジスルフィド)形態に存在する。Arg側鎖の長い脂肪性部位は、その構造的又は機能的役割の重大な特徴を構成し、これは他の塩基性残基よりも非極性の置換によって最も保存されうる。また、芳香族のグループ(T r p 、 T y r 、及び P h e)を含む側鎖は、イオン性-芳香族又は「カチオン-」相互作用に関与しうることが認識されるであろう。これらの場合、酸性又は荷電していない極性のグループのメンバーを有するこれら側鎖の 1 つの置換は、構造又は機能に関して保存的でありうる。 P r o 、 G l y 、及び C y s (

10

20

30

40

50

ジスルフィド形態)のような残基は、主鎖の高次構造に直接的な影響力を有し、構造上の変形なしに置換されないことがある。

【0093】

保存的置換には、側鎖の類似性に基づいた以下の具体的な置換と以下に列挙した例示的置換と好ましい置換が含まれる。アミノ酸はその側鎖の性質の類似性に応じて分類される (Biochemistry, 第2版., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975) 中の A. L. Lehninger) :

(1) 非極性 : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)

(2) 荷電のない極性 : Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)

(3) 酸性 : Asp (D), Glu (E)

(4) 塩基性 : Lys (K), Arg (R), His (H)

あるいは、天然に生じる残基は共通の側鎖性質に基づくグループに分けられる :

(1) 疎水性 : ノルロイシン, Met, Ala, Val, Leu, Ile ;

(2) 中性親水性 : Cys, Ser, Thr, Asn, Gln ;

(3) 酸性 : Asp, Glu ;

(4) 塩基性 : His, Lys, Arg ;

(5) 鎮配向に影響する残基 : Gly, Pro ;

(6) 芳香族 : Trp, Tyr, Phe.

10

20

【0094】

表 1

元の残基	例示的置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

50

【0095】

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。また、そのように置換された残基は、保存的置換部位、好ましくは残された(非保存)部位に導入され得る。

本発明の範囲内で用語「アミノ酸」とは、その最も広い意味で使用され、天然発生 L - アミノ酸または残基を意味する。天然発生アミノ酸に一般的に使用されている 1 文字及び 3 文字の略号がここでも使用される (Lehninger, A. L., Biochemistry, 2d ed., pp. 71-92 (1975), Worth Publishers, New York)。この用語は D - アミノ酸並びにアミノ酸類似物などの化学修飾アミノ酸、ノルロイシンなどの通常はタンパク質に組み込まれない天然発生アミノ酸、及びこの分野でアミノ酸の特徴であると知られた特性を持つ化学合成された化合物を含む。例えば、天然 Phe 又は Pro と同様のペプチド化合物のコンホメーション的制限を可能にするフェニルアラニン又はプロリンの類似物又は模倣物は、アミノ酸の定義に含まれる。このような類似物及び模倣物は、ここで、アミノ酸の「機能的等価物」と呼ばれる。アミノ酸の他の例は、Roberts 及び Vellaccio (The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology), Eds. Gross and Meienhofer, Vol. 5 p341, Academic Press, Inc, N.Y. 1983 に列挙されており、この文献を参考文献として本明細書に包含する。

【0096】

本明細書に記載する標準固相合成技術により合成されたペプチドは、例えば、アミノ酸に関する置換を行う遺伝子によってコードされるアミノ酸に限定されない。遺伝コードによってコードされていない一般的なアミノ酸には、例えば、国際公開WO 90/01940に記載のもの、並びに、例えばGlu及びAspの2-アミノアビジン酸(Aad)；Glu及びAspの2-アミノピメリン酸(Apm)；Met、Leu及びその他脂肪族アミノ酸の2-アミノブチル(Abu)酸；Met、Leu及びその他脂肪族アミノ酸の2-アミノヘプタン酸(Ahe)；Glyの2-アミノイソ酪酸(Aib)；Val、及びLeu及びIleのシクロヘクシリラニン(Cha)；Arg及びLysのホモアルギニン(Har)；Lys、Arg及びHisの2,3-二アミノプロピオン酸(Dpr)；Gly、Pro、及びAlaのN-エチルグリシン(EtGly)；Gly、Pro、及びAlaのN-エチルグリシン(EtGly)；Asn、及びGlnのN-エチルアスパラギン(EtAsn)；Lysのヒドロキシリジン(Hyl)；Lysのアロヒドロキシリジン(AHyl)；Pro、Ser、及びThrの3-(及び4)ヒドロキシプロリン(3Hyp、4Hyp)；Ile、Leu、及びValのアロ-イソロイシン(Alle)；Alaのアミジノフェニルアラニン；Gly、Pro、及びAlaのN-メチルグリシン(MeGly、サルコシン)；IleのN-メチルイソロイシン(Melle)；Met及びその他脂肪族のアミノ酸のノルバリン(Nva)；Met及びその他脂肪族のアミノ酸のノルロイシン(Nle)；Lys、Arg及びHisのオルニチン(Orn又はOr)；Thr、Asn及びGlnのシトルリン(Cit)及びメチオニンスルホキシド(MSO)；Pheの-メチルフェニルアラニン(MePhe)、トリメチルフェニルアラニン、ハロ(F、Cl、Br、及びI)フェニルアラニン、トリflourylフェニルアラニンが含まれる。

10

【0097】

変異は、オリゴヌクレオチド媒介(部位特異的)突然変異誘発、アラニンスキャニング、及びPCR突然変異誘発等のこの分野で知られた方法を用いてなすことができる。部位特異的突然変異誘発[Carter等, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986)；Zoller等, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)]、カセット突然変異誘発[Wells等, Gene, 34:315 (1985)]、制限的選択突然変異誘発[Wells等, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 (1986)]、又は他の知られた技術をクローニングしたDNAに実施して変異体DNAを作成することもできる。

20

また、隣接配列に沿って一つ又は複数のアミノ酸を同定するのにスキャニングアミノ酸分析を用いることができる。好ましいスキャニングアミノ酸は比較的小さく、中性のアミノ酸である。そのようなアミノ酸は、アラニン、グリシン、セリン、及びシステインを含む。アラニンは、ベータ炭素を越える側鎖を排除し変異体の主鎖構造を変化させにくいので、この群の中で典型的に好ましいスキャニングアミノ酸である[Cunningham及びWells, Science, 244:1081-1085 (1989)]。また、アラニンは最もありふれたアミノ酸であるため典型的には好ましい。更に、それは埋もれた及び露出した位置の両方に見られることが多い[Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.)；Chothia, J. Mol. Biol., 150:1(1976)]。アラニン置換が十分な量の変異体を生じない場合は、アイソテリック(isoteric)アミノ酸を用いることができる。

30

【0098】

「検出する」という用語は、分子の有無又は分子の定性的及び定量的量を測定することを包含することを意図する。ゆえに、この用語は、量的及び質的測定のための本発明の材料、組成物及び方法の使用を意味する。一般的に、検出のために使用される特定の技術は本発明の実施のうえで重要ではない。

40

例えば、本発明の「検出」には、分子の有無、ポリペプチドを発現する細胞数、標的に結合した分子又は分子に結合した標的の量又は分子レベルの変化；分子の生物学的機能/活性の変化(例えば、リガンド又はレセプター結合活性、細胞内シグナル伝達(NF-kB活性化など)、腫瘍細胞増殖、B細胞増殖ないし生存など)を、例えば当分野で公知の方法を用いるなどして検出することが含まれる。いくつかの実施態様では、「検出する」には、野生型分子(例えばmRNAやポリペプチドレベル)のレベルを検出することが含まれる。検出には、コントロールと比較して、10%から90%の何れかの値、又は30%から60%の何れかの値、又は100%以上の変化(亢進又は減弱)を数量化することが含まれる。検出には、2倍から10倍のいずれかの値、包括的にはそれ以上、例えば100

50

倍の変化を数量化することが含まれうる。したがって、例えば、B R 3 分子を指す用語はそのm R N A又はタンパク質などを意味する。

【0099】

本明細書中で用いる「B R 3 分子」は、B R 3 ポリペプチド；B R 3 ポリペプチドをコードする核酸分子；並びにポリペプチド又は核酸分子のアイソフォーム、断片、アナログ(類似体)又は変異体と実質的に同一な分子を意味する。例えば、B R 3 分子には、哺乳動物に由来するB R 3 ポリペプチドのアイソフォーム、断片、アナログ又は変異体が含まれ、B R 3 分子はB A F Fを結合する能力を有する。

本明細書中で用いる「B A F F 分子」は、B A F F ポリペプチド；B A F F ポリペプチドをコードする核酸分子；並びにポリペプチド又は核酸分子のアイソフォーム、断片、アナログ(類似体)又は変異体と実質的に同一な分子を意味する。例えば、B A F F 分子には、哺乳動物に由来するB A F F ポリペプチドのアイソフォーム、断片、アナログ又は変異体が含まれ、B A F F 分子はB R 3 を結合する能力を有する。

本明細書中で用いる処置される被検体は哺乳動物(例えばヒト、非ヒト靈長類、ラット、マウス、ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコなど)である。被検体は、臨床患者、臨床試験ボランティア、実験動物などであってもよい。被検体は、癌ないし免疫系疾患に罹ることが予測されるか、罹るリスクを有する、癌ないし免疫系疾患と診断された、あるいは、癌を持たないことが確認されているコントロール被検体でありうる。癌ないし免疫系疾患の多くの診断方法及び癌ないし免疫系疾患の臨床像は当分野で公知である。ある好適な実施態様では、本発明の処置される被検体はヒトである。

10

20

30

40

50

【0100】

「治療すること」または「処置」または「寛解」は、この目的は標的とした病態または疾患を予防または衰退(減少)するか、ないしは疾患の症状をいくらか軽減することである。処置を必要とするものには、既に疾患を有するもの並びに疾患に罹りやすいもの、又は予防すべき疾患を有するものが含まれる。本発明のポリペプチドないし抗体の治療的有効量を取り込んだ後、患者が以下の項目の一又は複数において観察可能及び／又は測定可能な程度の減少を示すか、消失を示す：癌細胞数の減少または癌細胞の消失；腫瘍の大きさの減少；軟組織及び骨への癌の播種を含む、周辺臓器への癌細胞浸潤の阻害(すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止)；腫瘍転移の阻害(すなわち、ある程度の遅延および好ましくは停止)；ある程度の腫瘍成長の阻害；および／または特定の癌が関与する一またはそれ以上の症状のある程度の軽減；罹患率および死亡率の減少、および生活の質の改善がある。本発明のポリペプチドが成長を阻害する及び／又は、存在する癌細胞を殺傷することができる点で、細胞増殖抑制性及び／又は細胞障害性であるといえる。また、兆候又は症状の減少は患者が感じるものでもよい。

【0101】

「治療的有効量」という用語は、被検体の疾患又は疾病を「寛解」又は「治療」するのに効果的な本発明の抗体または薬剤の量を指す。癌の場合は、治療的有効量の薬剤は、癌細胞の数を減少させ；腫瘍の大きさを小さくし；癌細胞の周辺臓器への浸潤を阻害(すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める)し；腫瘍の転移を阻害(すなわち、ある程度に遅く、好ましくは止める)し；腫瘍の成長をある程度阻害し；及び／又は癌に関連する一つ或いはそれ以上の症状をある程度和らげることが可能である。薬剤が存在する癌細胞の成長を阻害するおよび／または癌細胞を殺傷する点において、細胞増殖抑制性および／または細胞障害性であるといえる。

「慢性」投与は、長期間初期治療効果(活性)を維持するために、急性の状態とは対照的に連続的状態での薬剤投与を表す。「間欠的」投与は中断せずに継続して行わざむしろ自然的周期で行う治療である。

【0102】

ここで用いられる「担体」は、製薬的に許容されうる担体、賦形剤、又は安定化剤を含み、用いられる服用量及び濃度でそれらに曝露される細胞又は哺乳動物に対して非毒性である。生理学的に許容されうる担体は、水性p H緩衝溶液であることが多い。生理学的に

許容されうる担体の例は、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸塩のバッファー；アスコルビン酸を含む酸化防止剤；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；タンパク質、例えば血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン；疎水性ポリマー、例えばポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えばグリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストランを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；マンニトール又はソルビトール等の糖アルコール；ナトリウム等の塩形成対イオン；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEENTM、ポリエチレングリコール(PEG)、及びPLURONICSTMを含む。

【0103】

ここで用いられているように、「イムノアドヘシン」という用語は、免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能を持つ異種タンパク質(「アドヘシン」)の結合特異性を付与した抗体様分子を指す。構造的には、イムノアドヘシンは抗体の抗原認識及び結合部位以外の所望の結合特異性を持つアミノ酸配列(即ち「異種」)と免疫グロブリン定常ドメイン配列との融合物である。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型的には少なくともレセプター又はリガンドの結合部位を含む近接アミノ酸配列を含む。イムノアドヘシンの免疫グロブリン定常ドメイン配列は、IgG-1、IgG-2、IgG-3、又はIgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又はIgMなどの任意の免疫グロブリンから得ることができる。例えば、本発明に有用なイムノアドヘシンは、ポリペプチドのBAFF結合部位又はポリペプチドのBR3結合部位(例えば、TACIレセプター細胞外ドメイン-Fc又はBCMA細胞外ドメイン-Fc又はBR3細胞外ドメイン-Fc、Fc領域に融合した膜貫通配列又は細胞質配列を除くBAFFレセプターの一部)を含んでなるポリペプチドでありうる。一実施態様では、本発明のポリペプチド配列はイムノグロブリン配列の定常ドメインに融合している。

10

20

30

40

【0104】

「免疫不全性疾患」は、免疫応答が減少する疾患又は症状(例えば、重症複合免疫不全症(SCID)-X染色体連鎖、SCID-常染色体の、アデノシンデアミナーゼ欠損(ADA欠損症)、X染色体連鎖の無グロブリン血症(XLA)、プラットン病、先天性無グロブリン血症、X染色体連鎖幼児の無グロブリン血症、後天性無グロブリン血症、成人発症無グロブリン血症、遅発性無グロブリン血症、異常グロブリン血症、低グロブリン血症、乳児期の一過性低グロブリン血症、詳細不明の低グロブリン血症、無

グロブリン血症、一般的な可変性免疫不全症(CVID)(後天性)、ウィスコット-オールドリッチ症候群(WAS)、過剰IgMを有するX染色体連鎖免疫不全症、過剰IgMを有する非X染色体連鎖免疫不全症、選択的なIgA欠損症、IgGサブクラス欠損症(IgA欠損の有無にかかわらず)、通常であるか高い免疫グロブリンを有する抗体欠損症、胸腺腫を有する免疫不全症、Ig重鎖欠失、鎖欠損、B細胞リンパ増殖性疾患(BLPD)、選択的なIgM免疫不全症、劣性無グロブリン血症(スイスタイプ)、細網異形成症、新生児期好中球減少症、重症先天性白血球減少症、免疫不全を有する胸腺リンパ形成不全症-形成不全又は形成異常、運動失調-毛細管拡張症毛細管拡張症(小脳性運動失調、眼皮膚の毛細管拡張症及び免疫不全)、短い手足の低身長症、X染色体連鎖リンパ組織増殖性症候群(XLP)、免疫グロブリンを有するネゼロフ症候群混合性免疫不全(Nezelof syndrome-cumbined immunodeficiency with Igs)、ないしは、プリンヌクレオチドホスホリラーゼ欠損症(PNP)、MHCクラスII欠損症(裸リンパ球症候群)及び重症複合免疫欠損症)、免疫不全に関連する症状、ヤヌス関連キナーゼ3(JAK3)欠損症、ディジヨージ症候群(単離性T細胞欠損症)及び関連の症候群、例えば、ダウン症候群、慢性皮膚粘膜カンジダ症、過剰IgE徵候、慢性肉芽腫症、部分的な白化およびWHIM症候群(疣、低グロブリン血症、感染、及びmyelokathexis[過剰細胞性髄中の白血球の保持])である。

50

【0105】

本明細書中の「自己免疫疾患」は、個体の自己組織又は同時分離又はその徵候又は結果として生じるその症状に対する及びそれから生じる疾患又は症状である。自己免疫疾患

50

又は症状の例として、限定するものではないが、関節炎(関節リウマチ(例えば急性の関節炎、慢性の関節リウマチ、痛風性関節炎、急性の痛風性関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節症、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬の関節炎、椎骨関節炎及び若年性発症関節リウマチ、骨関節炎、関節炎慢性化、関節炎変形、関節炎慢性原発、反応性関節炎、及び強直性脊椎炎)、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例えはプレーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪乾癬)、皮膚炎、例として接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、ヘルペス状の皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、一次刺激物接触皮膚炎及び過敏性皮膚炎、X連鎖性過剰IgM症候群、蕁麻疹、例えは慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性特発性蕁麻疹、例として慢性自己免疫蕁麻疹、多発性筋炎/皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症(全身強皮症を含む)、硬化症、例えは全身性硬化症、多発性硬化症(MS)、例えは脊椎-眼(spino-optical) MS)、一次進行性MS(PPMS)及び再発性寛解MS(RRMS)、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、硬化症汎発、失調性硬化症、炎症性腸疾患(IBD)(例えはクローン病、自己免疫性胃腸疾患、大腸炎、例えは潰瘍性大腸炎、大腸性潰瘍、微細な大腸炎、膠原性大腸炎、大腸ポリープ、壞死性全腸炎及び経壁の大腸炎、及び自己免疫炎症性腸疾患)、膿皮症壞疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、上強膜炎、呼吸窮迫症候群、例として成人性又は急性の呼吸窮迫症候群(ARDS)、髄膜炎、葡萄膜の全部又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫血液疾患、リウマチ様脊椎炎、リウマチ様関節滑膜炎、突発性聴力障害、IgE媒介性疾患、例えはアナフィラキシー及びアレルギー性鼻炎及びアトピー性鼻炎、脳炎、例えはラスマッセンの脳炎及び辺縁及び/又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例として、前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有する又は有さない糸球体腎炎(GN)、例として、慢性又は急性の糸球体腎炎、例として原発性GN、免疫性GN、膜性GN(膜性ネフロパシ)、特発性膜性GN又は特発性膜性ネフロパシ、膜又は膜性増殖性GN(MPGN)(タイプI及びタイプIIを含む)、急速進行性GN、アレルギー性症状、アレルギー性反応、湿疹、例としてアレルギー性又はアトピー性湿疹、喘息、例えは喘息気管支炎、気管支喘息及び自己免疫喘息、T細胞の浸潤を伴う症状及び慢性炎症反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球粘着力欠損、全身性エリテマトーデス(SEL)又は全身性ループスエリテマトーデス、例えは皮膚SEL、亜急性の皮膚SEL、新生児期ループス症候群(NLE)、紅斑性狼瘡汎発、ループス(例としてループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、円板状ループス、脱毛症ループス)、若年性開始型(I型)真正糖尿病、例として小児インシュリン依存性真正糖尿病(IDDM)、成人発症型真正糖尿病(II型糖尿病)、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、サイトカイン及びTリンパ球によって媒介される急性及び遅発性過敏症と関係する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例としてリンパ腫肉芽腫症、ヴェゲナーの肉芽腫症、無顆粒球症、脈管炎、例として血管炎、大血管性血管炎(例えは大脈管脈管炎(リウマチ性多発性筋痛及び巨細胞(高安)動脈炎を含む)、中脈管脈管炎(川崎病及び結節性動脈周囲炎を含む)、微小多発動脈炎、CNS脈管炎、壞死性血管炎、皮膚性血管炎又は過敏性血管炎、全身性壞死性血管炎、及びANCA関連の脈管炎、例としてチャーグ-ストラウス脈管炎又は症候群(CSS))、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイアモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血又は免疫溶血性貧血、例として自己免疫溶血性貧血(AIHA)、悪性貧血(貧血症悪性熱)、アジソン病、純粹な赤血球貧血症又は形成不全(PRCA)、第VII因子欠損症、血友病A、自己免疫好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、CNS炎症性疾患、多器官損傷症候群、例えは敗血症、外傷又は出血の二次症状、抗原-抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、ベーチェット病、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスジョンソン症候群、類天疱瘡、例えは水疱性類天疱瘡及び類天疱瘡皮膚、天疱瘡(尋常性天疱瘡、落葉状天疱瘡、ベンフィグス粘液膜類天疱瘡及

10

20

30

40

50

び天疱瘡エリテマトーデスを含む)、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病又は症候群、免疫複合体腎炎、抗体媒介性腎炎、視神経脊髄炎、多発性神経炎、慢性神経障害、例えばIgM多発性神経炎又はIgM媒介性神経障害、血小板減少(例えば心筋梗塞患者によるもの)、例えば血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、及び自己免疫性又は免疫媒介性血小板減少、例えば慢性及び急性のITPを含む特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、自己免疫性精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫性疾患、一次甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)又は亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブ病、自己免疫多腺性症候群、例として多腺性症候群(又は、多腺性内分泌障害症候群)、腫瘍随伴症候群、例として神経系新生物関連症候群、例えばランパート-イートン筋無力症症候群又はイートンランパート症候群、スティッフマン又はスティッフマン症候群、脳脊髄炎、例として、アレルギー性脳脊髄炎又は脳脊髄炎性アレルギー及び実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クローヌス又は眼球クローヌス筋硬直症候群(OMS)及び感覚系神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、リンパ系間隙間質性肺炎(LIP)、閉塞性細気管支炎(非移植)対NSIP、ギランバレー症候群、ベルガー病(IgAネフロパシ)、特発性IgAネフロパシ、線状IgA皮膚病、原発性胆管萎縮症、肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアック病、コエリアック病、脂肪便症(グルテン腸疾患)、抵抗性スプレー、特発性スプレー、クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症(ALS；筋萎縮性側索硬化症(Lou Gehrig's disease))、冠状動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例として、自己免疫内耳疾患(AIED)、自己免疫聴力障害、眼球クローヌス筋硬直徵候(OMS)、多発性軟骨炎、例として、抵抗性又は再発性多発性軟骨炎、肺胞状蛋白症、アミロイドーシス、強膜炎、非癌性リンパ球增多症、一次リンパ球增多症、これにはモノクローナルB細胞リンパ球增多症(例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症及び未同定の有意なモノクローナル免疫グロブリン血症(monoclonal gammopathy of undetermined significance)、MGUS)が含まれる、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病、例として、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺及びCNSのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパシ、局所性分節性糸球体硬化症(FSGS)、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髓性疾患、例として、自己免疫脱髓性病、糖尿病性ネフロパシ、ドレスラー症候群、円形脱毛症、CREST症候群(石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症及び毛細管拡張症)、雌雄自己免疫性不妊性、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺胞炎、例えばアレルギー性肺胞炎及び纖維化肺胞炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、リーシュマニア症、キパノソミアシス(kypanosomiasis)、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カプラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、広汎性間隙肺線維形成、割込み肺線維形成、特発性の肺線維形成、囊胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎(eosinophilic faciitis)、シャルマン症候群、フェルティー症候群、フィラリア(filariasis)、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎又はFuchの毛様体炎)、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)感染、エコーウィルス感染、心筋症、アルツハイマー病、パルボウイルス感染、風疹ウイルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタインバーウィルス感染、耳下腺炎、エヴァンの症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞踏病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis obliterans)、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、内分泌性眼障害、慢性過敏性肺炎、乾性角結膜炎、流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化ネフロパシ、良性家族性及び乏血-再灌流障害、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道疾患、珪

10

20

30

40

50

肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症疾患、アスペルミオジエネース(aspermiogenese)、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、腸炎アレルギー、結節性紅斑、leprosum、特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハンマンリッチ病、感覚器性(sensoneural)聴力障害、血色素尿症発作(haemoglobinuria paroxysmata)、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、一次特発性の粘液水腫、ネフローゼ、眼炎sympathica、精巣炎肉芽腫症、膀胱炎、多発性神経根炎急性、膿皮症壞疽、Quer藤va in 甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、抗精子抗体による不妊性、非悪性胸腺腫、白斑、S C I D 及びエプスタインバーウイルス関連疾患、後天性免疫不全症候群(エイズ)、寄生虫病、例えばLesihmania、毒性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を伴う症状、白血球-粘着力欠損、サイトカイン及びTリンパ球に媒介される急性及び遅発性過敏症関連免疫応答、白血球血管外遊出を伴う疾患、多器官損傷症候群、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗糸球体基底膜疾患、アレルギー性神経炎、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、交感性眼炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、膀胱炎、多内分泌性不全、末梢性神経障害、自己免疫多腺性症候群I型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症(A O I H)、完全脱毛症、拡張型心筋症、後天性表皮水疱症(E B A)、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨又は蝶形骨副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症-筋肉痛症候群、レフラー症候群、慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギローム又は好酸球性を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、血清陰性脊椎関節炎疹、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、プラットン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウィスコットアルドリッヂ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、膠原病と関係する自己免疫疾患、リウマチ、神経病学的疾患、虚血性再灌流障害、血圧応答の減退、血管機能不全、antgiectasis、組織損傷、心血管乏血、痛覚過敏、脳虚血、及び脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、

心筋又は他の組織の再灌流損傷、急性炎症性成分を有する皮膚病、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性疾患、眼性及び眼窓の炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎孟炎、肺線維症、糖尿病性網膜症、糖尿病性大動脈疾患、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、及び子宮内膜症などがある。

【0106】

ここで用いいる「B細胞枯渇」は、処置前のB細胞レベルと比較して薬剤または抗体処置後に動物またはヒトにおいてB細胞レベルが減少することを表す。B細胞レベルは、実験的実施例に示した方法などの公知のアッセイを用いて測定可能である。B細胞枯渇は完全または部分的なものであり得る。一実施態様では、B R 3 発現 B細胞の枯渇は少なくとも 25% である。何れか一のメカニズムに限定されるものではなく、B細胞枯渇の考えられるメカニズムには、A D C C、C D C、アポトーシス、カルシウム流動の調整又は前述の2以上の組合せが含まれる。

本明細書中の「B細胞表面マーカ」又は「B細胞表面抗原」はB細胞表面上に発現される抗原である。

「B細胞枯渇薬剤」は、末梢のB細胞を少なくとも 25% 減少する薬剤を指す。他の実施態様では、末梢のB細胞の枯渇は少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、80% 又は 90% である。ある好適な実施態様では、B細胞枯渇薬剤は白血球に特異的に結合し、他の細胞型には結合しない。他の実施態様では、B細胞枯渇薬剤はB細胞に特異的に結合して、他の細胞型には結合しない。ある実施態様では、B細胞枯渇薬剤は抗体である。ある好適な実施態様では、抗体はモノクローナル抗体である。他の実施態様では、抗体は化学療法剤又は細胞障害性剤にコンジュゲートしている。B細胞枯渇薬剤の具体的な例には、限定するものではないが、前述の抗 C D 20 抗体が含まれる。

10

20

30

40

50

【0107】

B細胞悪性腫瘍には、リンパ球支配的ホジキン病(L P H D)を含むホジキン病；非ホジキンリンパ腫(N H L)；濾胞性中心細胞(F C C)リンパ腫；急性リンパ球性白血病(A L L)；慢性リンパ球性白血病(C L L)；毛様細胞白血病及び B R 3 陽性腫瘍が含まれる。非ホジキンリンパ腫には、軽度の / 濾胞性非ホジキンリンパ腫(N H L)、小リンパ球(S L) N H L 、中程度の / 濾胞性 N H L 、中程度の拡散性 N H L 、重度の免疫芽細胞 N H L 、重度のリンパ芽球 N H L 、重度の非正円形細胞でない小細胞性 N H L 、バルキー疾患(bulky disease)性 N H L 、形質細胞様リンパ球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、 A I D S 関連リンパ腫およびワルデンシュトレームマクログロブリン血症が含まれる。これら癌再発の治療も包含する。 L P H D は、放射線照射や化学療法にも関わらずたびたび再発するホジキン疾患のタイプであえ、 B R 3 陽性悪性腫瘍細胞に特徴があるものである。 C L L は白血病の主要な 4 タイプのうちの一つである。リンパ球と呼称される成熟した B 細胞の癌である C L L は、血液、骨髄およびリンパ系組織での細胞の蓄積によって確認される。無痛性リンパ腫は、低成長性で難治性であり、多くの緩解と再発を繰り返して患者の平均生存率は 6 ~ 10 年となる。

10

【0108】

本明細書で使用する「非ホジキンリンパ腫」又は「 N H L 」という用語は、ホジキンリンパ腫以外のリンパ系の癌を意味する。通常、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫とは、ホジキンリンパ腫にはリードシュテルンベルク細胞が存在し、非ホジキンリンパ腫には前記細胞が不在であることにより区別することができる。本明細書で使用する用語に含まれる非ホジキンリンパ腫の例は、従来技術に既知の分類方式、例えば *Color Atlas of Clinical Hematology* 第 3 版； A. Victor Hoffbrand 及び John E. Pettit (編) (Harcourt Publishers Limited 2000) (特に図 11.57, 11.58 及び / 又は 11.59 参照) に記載の改訂版 *European-American Lymphoma (REAL)* 方式に従って当業者 (腫瘍学者または病理学者) によって認識されるあらゆるものを含む。より具体的な例としては、限定するものではないが、再発性又は抵抗性 N H L 、前線低悪性度 N H L 、第 III / IV 期 N H L 、化学療法に抵抗性の N H L 、前駆体 B リンパ芽球性白血病及び / 又はリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、 B 細胞慢性リンパ性白血病及び / 又は前リンパ球性白血病及び / 又は小リンパ球リンパ腫、 B 細胞前リンパ球性白血病、 *immunocytoma* 及び / 又はリンパ形質細胞性リンパ腫、周辺帯 B 細胞リンパ腫、脾周辺帯リンパ腫、結節外周辺帯 - M A L T リンパ腫、結節周辺帯リンパ腫、有毛細胞白血病、プラズマ細胞腫及び / 又は形質細胞骨髄腫、低悪性度 / 濾胞性リンパ腫、中悪性度 / 濾胞性 N H L 、マントル細胞リンパ腫、濾胞性中心リンパ腫 (濾胞性) 、中悪性度拡散性 N H L 、広汎性大 B 細胞リンパ腫、高悪性度 N H L (高悪性度前線 N H L 及び高悪性度再発性 N H L を含む) 、自己幹細胞移植後の又は自己肝細胞移植に抵抗性の N H L 再発、原発性縦隔大 B 細胞リンパ腫、原発性浸出リンパ腫、高悪性度免疫芽細胞性 N H L 、高悪性度リンパ芽球性 N H L 、高悪性度非切斷小細胞性 N H L 、巨大病変 N H L 、バーキットリンパ腫、前駆体 (周辺性) T 細胞リンパ芽球性白血病及び / 又はリンパ腫、成人 T 細胞リンパ腫及び / 又は白血病、 T 細胞慢性リンパ球性白血病及び / 又は前リンパ球性白血病、大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫及び / 又はセザリー症候群、結節外ナチュラルキラー / T 細胞 (鼻腔型) リンパ腫、超疾患型 T 細胞リンパ腫、肝脾 T 細胞リンパ腫、皮下脂肪組織炎様 T 細胞リンパ腫、皮膚 (皮膚性) リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管動原体リンパ腫、腸 T 細胞リンパ腫、末梢 T 細胞 (特に断らない限り) リンパ腫及び血管免疫芽細胞性 T 細胞リンパ腫が挙げられる。

20

【0109】

「癌」及び「癌性」という用語は、典型的には調節されない細胞成長を特徴とする、哺乳動物における生理学的状態を指すか記述する。癌の例には、これらに限定されるものではないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、及び白血病が含まれる。このような癌のより特定の例には、扁平細胞癌、肺癌 (小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、及び肺の扁平癌腫 (squamous carcinoma) を含む) 、腹膜癌、肝細胞癌、胃 (gastric) 又は腹部 (stomach) 癌 (胃腸癌を含む) 、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸管癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、

40

50

肝癌、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓(kidney)又は腎(renal)癌、肝臓癌、前立腺癌、産卵口癌、甲状腺癌、肝臓癌及び様々なタイプの頭部及び頸部の癌、並びにB細胞リンパ腫(低級 / 濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)；小リンパ球(SL)NHL；中級 / 濾胞性NHL；中級びまん性NHL；高級免疫芽細胞性NHL；高級リンパ芽球性NHL；高級小非分割細胞NHL；バルキー疾患NHL；外套細胞リンパ腫；エイズ関連リンパ腫；及びワルデンストロームのマクログロブリン病を含む)；慢性リンパ性白血病(CLL)；急性リンパ芽球白血病(ALL)；ヘアリー細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；及び移植後リンパ増殖性疾患(PTLD)を含む。ある好適な実施態様では、癌はBR3ポリペプチドをその表面に発現する腫瘍(BR3陽性(ポジティブ))を含む。他の実施態様では、BR3発現癌はCLL癌である。

10

【 0 1 1 0 】

具体的な実施態様では、本発明の抗 B R 3 抗体ないしポリペプチドは、非ホジキンリンパ腫(N H L)、リンパ球優性ホジキン病(L P H D)、慢性リンパ球性白血病(C L L)、急性リンパ球性白血病(A L L)、小リンパ球性リンパ腫(S L L)、広汎性大 B 細胞リンパ腫(D L B C L)、ろ胞性リンパ腫、これは非ホジキンリンパ腫(N H L)の種類である、関節リウマチ及び若年性関節リウマチ、ループス腎炎を含む全身性エリテマトーデス(S L E)、ヴェゲナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病(I T P)、血栓性血小板減少性紫斑病(T T P)、自己免疫性血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、I g A ネフロパシ、I g M 多発性神経炎、重症筋無力症、血管炎、真正糖尿病、レイノー症候群、シェーグレン症候群、糸球体腎炎及び多発性骨髄腫からなる群から選択される疾患の何れか一ないし複数を治療するために用いられる。

20

【 0 1 1 1 】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び、又は細胞破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、 ^{211}At 、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{153}Sm 、 ^{212}Bi 、 ^{133}Bi 、 ^{32}P 及び ^{177}Lu の放射性同位体)、化学治療薬、及び小分子毒素などの毒素、又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含むものを含むことを意図する。ある実施態様では、細胞障害性剤は内部移行することができる。他の実施態様では、細胞障害性剤の活性部位は 1100kD 以下である。ある実施態様では、化学療法剤は、メトトレキセート、アドリアマイシン、ビンカアルカロイド(ビンクリスチン、ビンプラスチン、エトボシド)、ドキソルビシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロランブシル、ダウノルビシン又はその他インター-カレート剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び小分子毒素などの毒素、又は細菌、糸状菌、植物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、例えばモノメチルオーリスタチン(MMAE)、その断片及び/又は変異体を含むもの、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤又は成長阻害剤からなる群から選択される。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。

30

【 0 1 1 2 】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化学的化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びシクロスホスファミド(CYTOXAN(登録商標))のようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピポスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(altretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(trimethylenethiophosphaoramide)及びトリメチローロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(acetogenins)(特にプラタシン(bullatacin)及びプラタシンone(bullatacinone))；カンプトセシン(合成類似体トポテカン(topotecan)を含む)；ブリオスタチン；カリスタチン(callystatin)；C C - 1 0 6 5(そのアドゼレシン(adozelesin)、カルゼレシン(carzelesin)及びバイゼレシン(bizelesin)合成類似体を含む)；クリプトフィシン(cryptophycin)(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン

40

50

ン(dolastatin)；デュオカルマイシン(duocarmycin)(合成類似体、KW-2189及びCBI-TM1を含む)；エレトロビン(eleutherobin)；パンクラチスタチン(pancratistatin)；サルコディクチン(sarcodictyin)；スponジスタチン(spongistatin)；クロランプシル、クロルナファジン(chlornaphazine)、チヨロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチソム、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンビチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチソム(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスター等のナイトロジエンマスター；ニトロスレアス(nitrosureas)、例えばカルムスチソム(carmustine)、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチソム(fotemustine)、ロムスチソム(lomustine)、ニムスチソム、ラニムスチソム；エネジイン(enediine)抗生物質等の抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシンガンマ1I及びカリケアマイシンオメガI1、例えば、Agnew Chem Int'l. Ed. Engl., 33: 183-186(1994)を参照のこと；ダイネミシンA(dynemicinA)を含むダイネミシン(dynemicin)；クロドロネート(iodronate)などのビスホスホネート(bisphosphonates)；エスペラマイシン(esperamicin)；同様にネオカルチノスタチン発光団及び関連色素蛋白エネジイン(enediine)抗生物質発光団)、アクラシノマイシン(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン(bleomycins)、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabacin)、カルミノマイシン(carminomycin)、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン(detorubicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキソルビシン(モルフォリノ-ドキソルビシン、シアノモルフォリノ-ドキソルビシン、2-ピロリノ-ドキソルビシン及びデオキシドキソルビシンを含む)、エピルビシン、エソルビシン(esorubicin)、イダルビシン、マセロマイシン(marcellomycin)、マイトイマイシンCなどのマイトイマイシン(mitomycins)、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(photifromycin)、ピューロマイシン、クエラマイシン(quelamycin)、ロドルビシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルビシン(zorubicin)；メトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)のような抗-代謝産物；デノブテリン(denopterin)、メトレキセート、ブテロブテリン(pteropterin)、トリメトレキセート(trimetrexate)のような葉酸類似体；フルダラビン(fludarabine)、6-メルカブトプリン、チアミプリン、チオグアニンのようなプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモフルール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)のようなピリミジン類似体；カルステロン(calusterone)、プロピオニ酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)のようなアンドロゲン類；アミノグルテミド、ミトタン、トリロスタンのような抗副腎剤；フロリン酸(frolinic acid)のような葉酸リプレニッシャー(replenisher)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレブリン酸；エニルウラシル(eniluracil)；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ビサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziquone)；エルフォルニチン(el fornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium acetate)；エポチロソム(epothilone)；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシン(maytansine)及びアンサマイトシン(amsamitocin)のようなメイタンシノイド(maytansinoid)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phena met)；ピラルビシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K(登録商標)多糖類複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサン(razoxane)；リゾキシン(rhizoxin)；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニュアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triazi-

10

20

30

40

50

quone) ; 2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン ; トリコテセン(trichothecenes)(特に、T-2トキシン、ベラキュリンA(verrucarin A)、ロリデンA(roridin A)及びアンギイデン(anguidine)) ; ウレタン ; ビンデシン ; ダカルバジン ; マンノムスチン(mannomustine) ; ミトプロニトール ; ミトラクトール(mitolactol) ; ピポブロマン(pipobroman) ; ガシトシン(gacytosine) ; アラビノシド('Ara-C') ; シクロホスファミド ; チオテパ ; タキソイド、例えばタキソール(登録商標)パクリタキセル、(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、ABRAXANETM クレモフォール(Cremophor)を含まない、アルブミン設計のナノ粒子形状のパクリタキセル(American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Illinois)及びタキソテア(登録商標)ドキセタキセル、(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France) ; クロランブシル；GEMZAR(登録商標)ゲンシタビン(gemcitabine)；6-チオグアニン；メルカブトプリン；メトトレキセート；シスプラチン及びカルボプラチンのようなプラチナ類似体；ビンプラスチン；プラチナ；エトポシド(VP-16)；ミトキサントン；ビンクリスチン；NAVELBINE(登録商標)ビノレルビン；ナベルビン(Navelbine)；ノバントロン(novantrone)；テニボシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノブテリン；キセローダ(xeloda)；イバンドロナート(ibandronate)；CPT-11；トポイソメラーゼインヒビターRFS2000；ジフルオロメチロールニチニ(DMFO)；レチノイン酸などのレチノイド類；カペシタビン(capecitabine)；並びに上述したものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0113】

また、この定義には、腫瘍に対するホルモン作用を調節又は阻害するように働く抗ホルモン剤、抗エストロゲン及び選択的エストロゲンレセプターモジュレーター(SERM)など、例えばタモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、LY117018、オナブリストーン(onapristone)、及びFARESTONトレミフェン(Fareston)；アロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼ阻害物質、それらは副腎でのエストロゲン産生を調節するものであり、例えば4(5)-イミダゾール類、アミノグルテチミド、MEGASE(登録商標)メゲストロールアセテート、AROMASIN(登録商標)エキセメスタン、ホルメスタン(formestan)、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)ゾロゾール(vorozole)、FEMARA(登録商標)レトロゾールおよびARIMIDEX(登録商標)アナストロゾール；；及び抗アンドロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；並びにトロキサシタビン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に不粘着性細胞増殖に関するシグナル伝達経路の遺伝子の発現を抑制するもの、例えばPKC-*a*1ph_a、ラルフおよびH-Ras；VEGF発現インヒビター(例えばANGIOZYME(登録商標)リボザイム)及びHER2発現インヒビターなどのリボザイム；遺伝子治療ワクチンなどのワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン及びVAXID(登録商標)ワクチン)；PROLEUKIN(登録商標)rIL-2；LURTOTECAN(登録商標)トポイソメラーゼ1インヒビター；ABARELIX(登録商標)rmRH並びに上記のものの製薬的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

【0114】

ここで用いられる際の「成長阻害剤」は、細胞の成長をインビトロ及び/又はインビボで阻害する化合物又は組成物を意味する。即ち、成長阻害剤は、S期の細胞の割合を有意に減少させるものである。成長阻害剤の例は、細胞周期を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ビンカス(ビンクリスチン及びビンプラスチン)、タキソール(登録商標)パクリタキセル、及びトポI阻害剤、例えばドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド及びブレオマイシンを含む。G1を停止するこれらの薬剤は、S期停止にも溢流し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、ブレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びara-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, Cha

10

20

30

40

50

pter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakamiら, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に 13 頁に見出すことができる。

【0115】

「細胞死を誘発」する抗体は、生存している細胞を生存不能とさせるものである。該細胞は一般に、抗体が結合する抗原を発現するもので、特に該細胞は該抗原を過剰発現する。好ましくは細胞は癌細胞、例えば乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓又は膀胱細胞である。インビトロでは、細胞はSKBR3、BT474、Calu3、MDA-MB-453、MDA-MB-361又はSKOV3細胞でありうる。インビトロでの細胞死は、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で決定され、抗体依存性細胞障害活性(ADC)又は補体依存性細胞障害活性(CDC)により誘発される細胞死と区別される。よって、細胞死に対するアッセイは、熱不活性化血清(すなわち補体の不在下)を使用し、免疫エフェクター細胞の不在下で行うことができる。抗体が細胞死を誘発可能であるか否かを決定するために、ヨウ化プロピジウム(PI)、トリパンブルー(Moreら, Cytotechnology 17:1-11(1995)を参照)又はTAAの取込みにより評価される膜インテグリティの損失を未処理細胞と比較して評価される。

10

【0116】

「アポトーシスを誘発する」抗体は、アネキシンVの結合、DNAの断片化、細胞収縮、小胞体の拡張、細胞断片化及び/又は膜小胞(アポトーシス体と称する)の形成によって測定されるプログラムされた細胞死を誘発するものである。細胞は、抗体が結合する抗原を過剰発現するものであり、抗原を過剰発現するものであってもよい。細胞は、腫瘍細胞、例として乳房、卵巣、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、大腸、甲状腺、膵臓又は膀胱の細胞である。インビトロでは、細胞は、SKBR3、BT474、Calu3細胞、MDA-MB-453、MDA-MB-361又はSKOV3細胞でもよい。アポトーシスを伴う細胞性現象を評価するために様々な方法が有用である。例えば、ホスファチジルセリン(PS)転座は、アネキシン結合によって測定することができる; 本明細書中の実施例に開示されるように、DNA断片化はDNAラダリングで評価することができる; そして、DNA断片化とともに核/クロマチン凝集は、低二倍体細胞における任意の増加によって評価することができる。好ましくは、アポトーシスを誘発する抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞を用いたアネキシン結合アッセイにおいて無処置の細胞と比較してアネキシン結合の誘導が約2~50倍、好ましくは約5~50倍及び最も好ましくは約10~50倍誘導されるものである。

20

【0117】

アポトーシスを誘導する抗体の例には、抗DR5抗体3F1 1.39.7(ATCC H B-12456); 3H3.14.5(ATCC HB-12534); 3D5.1.10(ATCC HB-12536); 及び、3H3.14.5(ATCC HB-12534)、そのヒト化及び/又は親和性成熟変異体を含む; ヒト抗DR5レセプター抗体16E2及び20E6、その親和性成熟変異体を含む(国際公開公報98/51793、出典明記により特別に本明細書中に組み込まれる); 抗DR4抗体4E7.24.3(ATCC HB-12454); 4H6.17.8(ATCC HB-12455); 1H5.25.9(ATCC HB-12695); 4G7.18.8(ATCC PTA-99); 及び、5G1 1.17.1(ATCC HB-12694)、そのヒト化及び/又は親和性成熟変異体を含む; が含まれる。

30

対象とする抗体に結合する抗原上のエピトープに結合する抗体をスクリーニングするために、Antibodies, A Laboratory Manual, eds. Harlow and Lane (New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1988)に記載のような慣例的な交差プロックアッセイを行うことができる。

40

【0118】

「抱合(コンジュゲート)」は、融合タンパク質、並びにアミノ酸ないしタンパク質部位と非タンパク質部位の両方を含む分子を含む任意のハイブリッド分子(例えば、毒素-抗体コンジュゲート又はペグ化-抗体コンジュゲート)を意味する。抱合は、例えば組み換えDNA技術、固相合成法、液層合成法、有機化学的合成技術またはこれら技術を組み合わせ

50

るなどの、当分野の公知の様々な技術により合成又は操作してもよい。生成する特定の分子に応じて合成法を選択するであろう。例えば、天然では完全な「タンパク質」ではないハイブリッド分子は、組み換え技術と液層合成法を組み合わせて合成してもよい。

ある実施態様では、例えば米国特許第5739277号に記載のように、コンジュゲートは、サルベージレセプター結合エピトープ(特に抗体断片)に結合した所望の抗体ないしポリペプチドである。例えば、サルベージレセプター結合エピトープをコードする核酸分子は、操作した核酸分子によって発現される融合タンパク質が本発明のポリペプチド配列とサルベージレセプター結合エピトープを含むように、本発明のポリペプチド配列をコードする核酸のフレーム内に連結させることができる。ここで使用される場合の「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させるために有用なIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを意味する(例えば、Ghetie, Vら., (2000) Ann. Rev. Immunol. 18:739-766, 表1)。

【0119】

他の実施態様では、コンジュゲートは、血清アルブミンないしFcRnレセプターに結合する血清アルブミンの一部、又は血清アルブミン結合ペプチド又は非タンパク質ポリマー(例えばポリエチレングリコール分子)に(特に抗体断片を)結合することによって形成することができる。例としてこのようなポリペプチド配列は国際公開公報01/45746に開示されている。一実施態様では、接着した血清アルブミンペプチドはアミノ酸配列D1CLPRWGCLWを含む。他の実施態様では、本発明によるFabの半減期はこれら の方法によって増大する。血清アルブミン結合ペプチド配列については、Dennis, M.S., ら., (2002) JBC 277(38):35035-35043を参照のこと。

ここで使用される「標識」なる語句は、抗体に直接的に又は間接的に抱合した検出可能な化合物又は組成物を意味する。標識はそれ自体が検出可能(例えば、放射性標識又は蛍光標識)であり得、あるいは酵素標識の場合には、検出可能な基質化合物又は組成物の化学変化を触媒しうる。

【0120】

A. 本発明の組成物及び方法

本発明は、ヒトBR3、場合によっては、同様に他の靈長類のBR3を結合する抗体を提供する。ある実施態様では、H鎖は、非ヒト種抗ヒトBR3抗体(ドナー抗体)の少なくとも1、2又はすべてのCDRと、レシピエント抗体としてヒトコンセンサス抗体のフレームワーク残基の実質的にすべてを有する。ドナー抗体は、様々な非ヒト種、例えばマウス、ラット、モルモット、ヤギ、ウサギ、ウマ、靈長類由来のものでありうるが、典型的にはマウスの抗体である。ここで「実質的にすべて」とは、ヒト化抗体のレシピエントFR領域がヒトコンセンサスFR配列に元もと存在しないないし複数のアミノ酸置換を含んでいてもよいことを意味する。これらのFR変化は、レシピエントないしドナーの抗体にみられない残基を含有してもよい。

ある実施態様では、ドナー抗体はマウス9.1抗体であり、CDRを含むV領域とそのVH及びVL鎖のそれぞれのFR配列は配列番号19と配列番号20に示す。ある実施態様では、ヒトFabフレームワークの残基は、ヒトVサブグループI及びV_HサブグループIIIのコンセンサス配列に対応するか、由来する。ある実施態様では、本発明のヒト化BR3抗体は、マウスドナー抗体のH鎖内に少なくとも一のCDRを有する。ある実施態様では、ヒトBR3を結合するヒト化BR3抗体は、ドナー抗体のH鎖の重鎖CDRを含有する。

【0121】

完全長抗体では、本発明のヒト化BR3結合抗体は、ヒトイムノグロブリンのCDメインに結合するVドメイン、例えば配列番号132を含有する。好適な実施態様では、H鎖C領域はヒトIgG、例えばIgG1又はIgG3由来である。ある実施態様では、L鎖CDメインはヒト鎖由来である。他の実施態様では、完全長BR3結合抗体のFc配列は配列番号134であり、XはN、A、Y、F及びHからなる群から選択されるものであ

10

20

30

40

50

る。

B R 3 結合抗体は少なくともヒト B R 3 を結合するであろう。ある実施態様では、B R 3 結合抗体は、他の靈長類 B R 3 、例えばカニクイザル及びアカゲザルを含むサルやチンパンジーの B R 3 を結合するであろう。他の実施態様では、B R 3 結合抗体ないしポリペプチドは齧歯類の B R 3 タンパク質及びヒト B R 3 タンパク質を結合する。他の実施態様では、B R 3 ポリペプチドはマウス B R 3 ポリペプチド配列とヒト B R 3 ポリペプチド配列を結合する。

【 0 1 2 2 】

他の実施態様では、アンタゴニスト B R 3 結合抗体の生物学的活性は、(1) 5 0 0 n M 以下、1 0 0 n M 以下、5 0 n M 以下、1 0 n M 以下、5 n M 以下又は1 n M 以下の見かけの K d 値でヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合する；(2) ヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、5 0 0 n M 以下、1 0 0 n M 以下、5 0 n M 以下、1 0 n M 以下、5 n M 以下又は1 n M 以下の見かけの K d 値でマウス B R 3 細胞外ドメイン配列に結合する；(3) 残基 F 2 5 、V 3 3 及び A 3 4 を含有するヒト B R 3 上に機能的なエピトープを有する、このときのモノクローナル抗体が；(4) ヒト B A F F 及びヒト B R 3 結合を阻害する；(5) ヒトエフェクター細胞存在下にて抗体依存性細胞性障害(ADC C)を有するか、ヒトエフェクター細胞存在下にて ADC C を亢進している；(6) 野生型又は天然配列の I g G F c を有するポリペプチドないしは親ポリペプチドよりも高い親和性でヒト F c 新生児レセプター(F c R n)を結合する；(9) このような抗体で処理されていな 10 い適当なネガティブコントロール又は基準レベルと比較して好ましくは少なくとも 2 0 % インビボ又はインビトロの B 細胞を殺傷又は枯渇する；(10) インビトロ又はインビボの B 細胞増殖を阻害する；及び(11) インビトロ又はインビボの B 細胞生存を阻害する 20 からなる群から選択される何れか一、何れかの組合せ又はすべての活性である。本発明のポリペプチドないし抗体のある実施態様では、さらに、機能的エピトープは残基 R 3 0 を含有する。本発明の更なる他の実施態様では、さらに、機能的エピトープは残基 L 2 8 及び V 2 9 を含有する。

【 0 1 2 3 】

一実施態様では、B 細胞表面抗原に結合しないコントロール抗体による処置と比較して、又は処置前の基準レベルと比較して、m I g G 2 A の F c 領域に融合する本発明の抗体の可変ドメインは、マウスの以下の何れか一、何れかの組合せ又はすべての細胞集団中の B 細胞の少なくとも 2 0 % を枯渇しうる：(1) 血液 B 細胞、(2) リンパ節 B 細胞、(3) 脾臓濾胞性 B 細胞、(4) 脾臓周辺帯 B 細胞。他の実施態様では、B 細胞枯渇は 2 5 %、3 0 %、4 0 %、5 0 %、6 0 %、7 0 %、8 0 % 以上である。ある好適な実施態様では、枯渇は抗体で処理してから 1 5 日後に測定する。他の好適な実施態様では、枯渇アッセイは本明細書中の実施例 1 8 又は 1 9 に記載のように行う。他の好適な実施態様では、枯渇は処置の 1 5 日後のマウス中の末梢 B 細胞の集団を測定する。 30

他の実施態様では、本発明のアゴニスト B R 3 結合抗体の生物学的活性は、(1) 5 0 0 n M 以下、1 0 0 n M 以下、5 0 n M 以下、1 0 n M 以下、5 n M 以下又は1 n M 以下の見かけの K d 値でヒト B R 3 細胞外ドメイン配列に結合する；(2) 残基 F 2 5 、V 3 3 及び A 3 4 を含有するを含有するヒト B R 3 に機能的なエピトープを有する、このときモノクローナル抗体は 9.1 抗体や 2.1 抗体ではない；(3) インビトロで B 細胞増殖や生存を刺激する；(4) ヒト B A F F 及びヒト B R 3 結合を阻害する；(5) インビボで B 細胞増殖や生存を刺激する；(6) 野生型又は天然配列の I g G F c を有するポリペプチドないしは親ポリペプチドよりも高い親和性でヒト F c 新生児レセプター(F c R n)を結合する 40 からなる群から選択される何れか一、何れかの組合せ又はすべての活性である。

【 0 1 2 4 】

B 細胞枯渇の所望のレベルは疾患に依存するであろう。B R 3 陽性癌の治療では、本発明の抗 B R 3 抗体及びポリペプチドの標的である B 細胞の枯渇を最大限にすることが望まれうる。したがって、B R 3 陽性 B 細胞腫瘍の治療では、B 細胞枯渇が、例えば腫瘍成長(大きさ)、癌細胞型の増殖、転移、他の兆候及び特定の癌の症状をモニタリングすること

10

20

30

40

50

によって、当分野の技術者によって評価されうる疾患の進行を少なくとも予防するために十分であることが望ましい。ある好適な実施態様では、B細胞枯渇は、少なくとも2か月、より好ましくは3か月、さらにより好ましくは4か月、より好ましくは5か月、さらにより好ましくは6か月以上の間、疾患の進行を予防するために十分である。さらにより好適な実施態様では、B細胞枯渇は、少なくとも6か月、より好ましくは9か月、より好ましくは1年、より好ましくは2年、より好ましくは3年、さらにより好ましくは5年以上、寛解期を増やすために十分である。最も好適な実施態様では、B細胞枯渇は、疾患を治癒するために十分である。好適な実施態様では、癌患者のB細胞枯渇は、治療前の基準レベルの少なくともおよそ75%、及びより好ましくは80%、85%、90%、95%、99%及びさらに100%である。

10

【0125】

自己免疫性疾患の治療では、BR3結合抗体ないしポリペプチドの用量を調整することによって、個々の患者の症状の重症度及び/又は疾患に応じてB細胞枯渇の程度を調節することが望ましい。したがって、B細胞枯渇は完全でなくてはならないことはない。総B細胞枯渇は、その後の処置でなく初回処置において望まれるが、用量を調節して部分的な枯渇のみを達成するようにしてもよい。一実施態様では、B細胞枯渇は少なくとも20%、すなわち処置前の基準レベルと比較してBR3陽性B細胞の80%以下が残っている。他の実施態様では、B細胞枯渇は25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%以上である。ある好適な実施態様では、B細胞枯渇は疾患の進行を中断するため、より好ましくは治療下にある特定の疾患の兆候及び症状を寛解するため、さらにより好ましくは疾患を治癒するために十分である。

20

また、本発明は、抗体の一アームが本発明のBR3結合抗体のヒト化H鎖及びL鎖を有し、他のアームが第二抗原に対してV領域結合特異性を有する、二特異性BR3結合抗体を提供する。具体的な実施態様では、第二抗原は、CD3、CD64、CD32A、CD16、NKGD2D又は他のNK活性化リガンドからなる群から選択されるものである。

20

【0126】

抗BR3抗体の適切な高次構造を維持するために関与しない任意のシステイン残基も、一般的には、セリンと置換して、分子の酸化的安定性を改善して、異常な交差を防いでもよい。逆に、システイン結合を抗体に付加して、その安定性を改善してもよい(特にこの場合、抗体はFv断片などの抗体断片である)。

30

特に好ましい型の置換変異体は、親抗体の一つは複数の高頻度可変領域残基の置換を含む(例えば、ヒト化抗体又はヒト抗体)。一般的に、さらなる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して向上した生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法には、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異がある。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位(例えば6-7部位)を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された多価抗体は、纖維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたM13の遺伝子II産物への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、ここに開示されるようなそれらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、アラニンスキャニング突然変異誘発を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体とヒトBR3の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載するようなスクリーニングを施し、一つは複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

40

抗体のアミノ酸変異の他の型は、抗体の元のグリコシル化パターンを変更する。変更とは、抗体に見い出される一つは複数の糖鎖部分の欠失、及び/又は抗体に存在しない一つは複数のグリコシル化部位の付加を意味する。

【0127】

50

抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合又はO結合の何れかである。N結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここでXはプロリンを除く任意のアミノ酸)のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

抗体へのグリコシル化部位の付加は、アミノ酸配列を、それが一又は複数の上述したトリペプチド配列(N結合グリコシル化部位のもの)を含むように変化させることによって簡便に達成される。該変化は、元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。

【0128】

抗B R 3抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された抗B R 3抗体の変異体又は非変異体のオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

エフェクター機能、例えば抗体の抗原依存性細胞媒介性細胞障害性(ADC)及び/又は補体依存性細胞障害性(CDC)を向上させるために、本発明の抗体を修飾することが望ましい。このことは、抗体のFc領域に一又は複数のアミノ酸修飾を導入することで達成される。代わりにまたは加えて、Fc領域にシステイン残基を導入することによってこの領域での鎖間のジスルフィド結合形成が起こりうる。故に、生成されたホモ二量体抗体は内部移行能を向上および/または補体媒介性細胞障害および抗体依存性細胞障害(ADC)を増強する。Caron等、J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) およびShopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992)を参照。抗腫瘍活性が亢進されたホモ二量体抗体もまた、Wolffら Cancer Research 53:2560-2565 (1993)に記載されているような異種性二機能性交差結合を用いて調製されうる。または、抗体を二重のFc領域を持つように操作して、それによって補体媒介性溶解およびADC能を亢進した。StevensonらAnti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989)を参照。

抗体の血清半減期を延長するために、例として米国特許第5739277号に記載されているように抗体(特に抗体断片)内にサルベージレセプター結合エピトープを組み込む方法がある。ここで用いる、「サルベージレセプター結合エピトープ」は、IgG分子のインビボ血清半減期延長に関するIgG分子(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃又はIgG₄)のFc領域のエピトープを表す。

【0129】

他の抗体修飾

抗体の他の修飾がここで考えられる。例えば、抗体は様々な非タンパク様ポリマー、例えばポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレン、又はポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールのコポリマーの一つに結合されてもよい。抗体はまた例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル中に(例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中に)、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミンミクロスフィア、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中に、又はマイクロエマルション中に捕捉されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science 16版, Oslo, A編(1980)に開示されている。

【0130】

所望の性質を有する抗体のスクリーニング

実験的実施例に示すようにある生物学的特徴を有する抗体を選択する。例えば、B R 3

10

20

30

40

50

を結合する抗体は、ELISAアッセイでのBR3への結合、又はより好ましくは、細胞(例えばBJAB細胞株)の表面上に発現されるBR3への結合によって選択することができる。例として実施例5を参照のこと。

本発明の抗BR3抗体の成長阻害効果は、実施例又は当業者に知られた方法、例として、BR3遺伝子を内因性または形質移入してBR3を発現する細胞を用いるなどの方法によって評価しうる。例えば、ある好適な実施態様では、BR3を発現する一次B細胞を増殖アッセイ及び生存アッセイに用いることができる(例えば実施例7)。他の例では、腫瘍細胞株およびBR3形質移入細胞を、様々な濃度の本発明の抗BR3モノクローナル抗体で2、3(例として2-7)日間処理し、クリスタル・バイオレットまたはMTTで染色、または他の比色アッセイ法によって分析した。増殖を測定する他の方法には、本発明の抗BR3抗体存在または非存在下にて処理した細胞による³H-チミジン取り込みを比較することによる。抗体処理後、細胞を回収して、DNA内に取り込まれた放射線量をシンチレーションカウンターで定量した。細胞株の成長を阻害することが知られている成長阻害抗体で選択した細胞株を処理して適当な陽性対照とする。

【0131】

細胞死を誘導する抗体を選択するために、プロピジウムヨウ素化物(PI)、トリファンブルーまたは7AAD取り込みなどにより表される膜の完全性の欠損を対照と相対的に評価した。補体および免疫エフェクター細胞非存在下でPI取り込みアッセイを行う。BR3発現腫瘍細胞を単独培地または例として約10μg/mlの適当なモノクローナル抗体を含む培地で培養する。それぞれの処理後、細胞を洗浄して、細胞塊を除去するために35mm濾過器をかぶせた12×75チューブ(1チューブ当たり1ml、各処理群につき3チューブ)に分注する。その後、PI(10μg/ml)をチューブに加える。試料をFACSCAN™フローサイトメーターおよびFACSCONVERT™CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)により分析しうる。PI取り込みにより決定されるような統計学上有意なレベルの細胞死を引き起こす抗体を細胞死誘導抗体として選択しうる。

【0132】

対象の抗体により結合されるBR3上のエピトープに結合する抗体を検索するために、例としてAntibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に示されているように平凡なクロスブロッキングアッセイを行うことができる。このアッセイは、試験抗体が本発明の抗BR3抗体として同じ部位に結合するかエピトープに結合するかを決定するのに用いられる。代わりにまたは加えて、エピトープマッピングはこの分野でよく知られた方法によって行うことができる。例えば、接触する残基を同定するためにアラニンスキャニングによるように抗体の配列に突然変異が誘発される。変異した抗体は確実にフォールディングされるように初めにポリクローナル抗体との結合を試験する。異なる方法では、BR3の異なる領域に一致するペプチドを用いて、試験抗体の競合アッセイ、または試験抗体と特徴のあるまたは既知のエピトープを持つ抗体の競合アッセイを行うことができる。

【0133】

具体的な抗BR3抗体の例

本発明の抗体は、具体的に、表2(下記)に開示される何れか一の抗体の可変重鎖配列を含んでなる抗体と、ハイブリドーマ細胞によって產生されないそのBR3結合断片を包含する。本発明の抗体は、具体的には、配列番号4-13、15-18、22、24、26-73、75-76、78、80-85、87-96、98、100、102、104、106-107、109-110、112、114、116、118、120、122、124、126及び127の何れか一の配列を含有する可変重鎖配列を含んでなる抗体と、そのBR3結合断片を包含する。更なる実施態様では、本発明の抗体は、表2に開示される何れか一の抗体の可変重鎖領域及び可変軽鎖領域配列を含んでなる抗体と、そのBR3結合断片を包含する。一実施態様では、抗体はさらに、排列番号134の配列を含有するFc領域を含んでなり、Xは、N、A、W、Y、F及びHからなる群から選択されるアミノ酸である。他の実施態様では、抗体は、配列番号76又は配列番号131の配列を含

10

20

30

40

50

んでなり、Xは、N、A、W、Y、F及びHからなる群から選択されるアミノ酸である。

【0 1 3 4】

表2 抗体配列の例

抗体	配列番号:	配列番号:	フレームワーク
2.1	1 (VL)	2 (VH)	マウス
hu2.1-Graft	3 (VL)	4 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu2.1-RL	3 (VL)	5 (VH)	RL
Hu2.1-RF	3 (VL)	6 (VH)	RF
Hu2.1-40	3 (VL)	7 (VH)	RF
Hu2.1-46	3 (VL)	8 (VH)	RF
Hu2.1-30	3 (VL)	9 (VH)	RF
Hu2.1-93	3 (VL)	10 (VH)	RL
Hu2.1-94	3 (VL)	11 (VH)	RL
Hu2.1-40L	3 (VL)	12 (VH)	RL
Hu2.1-89	3 (VL)	13 (VH)	RL
Hu2.1-46.DANA-IgG	14 (LC)	15 (HC)	RF
Hu2.1-27	3 (VL)	16 (VH)	RF
Hu2.1-36	3 (VL)	17 (VH)	RF
Hu2.1-31	3 (VL)	18 (VH)	RF
9.1	19 (VL)	20 (VH)	マウス
Hu9.1-graft	21 (VL)	22 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-73	23 (VL)	24 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-70	25 (VL)	26 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-56	21 (VL)	27 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-51	21 (VL)	28 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-59	21 (VL)	29 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-61	21 (VL)	30 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-A	21 (VL)	31 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-B	21 (VL)	32 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-C	21 (VL)	33 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-66	21 (VL)	34 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu9.1-RF	21 (VL)	35 (VH)	RF

10

20

30

抗体	配列番号:	配列番号:	フレームワーク
Hu9.1-48	21 (VL)	36 (VH)	RF
Hu9.1-RL	21 (VL)	37 (VH)	RL
Hu9.1-91	21 (VL)	38 (VH)	RL
Hu9.1-90	21 (VL)	39 (VH)	RL
Hu9.1-75	21 (VL)	40 (VH)	RL
Hu9.1-88	21 (VL)	41 (VH)	RL
Hu9.1RL-9	21 (VL)	42 (VH)	RL
Hu9.1RL-44	21 (VL)	43 (VH)	RL
Hu9.1RL-13	21 (VL)	44 (VH)	RL
Hu9.1RL-47	21 (VL)	45 (VH)	RL
Hu9.1RL-28	21 (VL)	46 (VH)	RL
Hu9.1RL-43	21 (VL)	47 (VH)	RL
Hu9.1RL-16	21 (VL)	48 (VH)	RL
Hu9.1RL-70	21 (VL)	49 (VH)	RL
Hu9.1RL-30	21 (VL)	50 (VH)	RL
Hu9.1RL-32	21 (VL)	51 (VH)	RL
Hu9.1RL-37	21 (VL)	52 (VH)	RL
Hu9.1RL-29	21 (VL)	53 (VH)	RL
Hu9.1RL-10	21 (VL)	54 (VH)	RL
Hu9.1RL-24	21 (VL)	55 (VH)	RL
Hu9.1RL-39	21 (VL)	56 (VH)	RL
Hu9.1RL-31	21 (VL)	57 (VH)	RL
Hu9.1RL-18	21 (VL)	58 (VH)	RL
Hu9.1RL-23	21 (VL)	59 (VH)	RL
Hu9.1RL-41	21 (VL)	60 (VH)	RL
Hu9.1RL-95	21 (VL)	61 (VH)	RL
Hu9.1RL-14	21 (VL)	62 (VH)	RL
Hu9.1RL-57	21 (VL)	63 (VH)	RL
Hu9.1RL-15	21 (VL)	64 (VH)	RL
Hu9.1RL-54	21 (VL)	65 (VH)	RL
Hu9.1RL-12	21 (VL)	66 (VH)	RL
Hu9.1RL-34	21 (VL)	67 (VH)	RL
Hu9.1RL-25	21 (VL)	68 (VH)	RL
Hu9.1RL-71	21 (VL)	69 (VH)	RL
Hu9.1RL-5	21 (VL)	70 (VH)	RL
Hu9.1RL-79	21 (VL)	71 (VH)	RL
Hu9.1RL-66	21 (VL)	72 (VH)	RL
Hu9.1RL-69	21 (VL)	73 (VH)	RL
9.1RF-IgG	74 (LC)	75 (HC)	RF
9.1RF-IgG (N434X)	74 (LC)	76 (HC)	RF
11G9	77 (VL)	78 (VH)	マウス
Hu11G9-graft	79 (VL)	80 (VH)	R71A/N73T/L78A
Hu11G9-RF	79 (VL)	81 (VH)	RF
Hu11G9-36	79 (VL)	82 (VH)	RF
Hu11G9-46	79 (VL)	83 (VH)	RF
Hu11G9-35	79 (VL)	84 (VH)	RF
Hu11G9-29	79 (VL)	85 (VH)	RF
V3-Fab	86 (LC)	87 (HC)	
V24	86 (VL)	88 (VH)	
V44	86 (VL)	89 (VH)	
V89	86 (VL)	90 (VH)	
V96	86 (VL)	91 (VH)	

10

20

30

40

抗体	配列番号:	配列番号:	フレームワーク
V46	86 (VL)	92 (VH)	
V51	86 (VL)	93 (VH)	
V75	86 (VL)	94 (VH)	
V58	86 (VL)	95 (VH)	
V60	86 (VL)	96 (VH)	
V3-1	97 (VL)	98 (VH)	
V3-11	99 (VL)	100 (VH)	
V3-12	101 (VL)	102 (VH)	
V3-13	103 (VL)	104 (VH)	
V3-3	105 (VL)	106 (VH)	
V3-5	97 (VL)	107 (VH)	
V3-9	108 (VL)	98 (VH)	
V3-16	97 (VL)	109 (VH)	
V3-19	97 (VL)	110 (VH)	
V3-24	111 (VL)	112 (VH)	
V3-27	113 (VL)	114 (VH)	
V3-34	115 (VL)	116 (VH)	
V3-35	117 (VL)	118 (VH)	
V3-37	119 (VL)	120 (VH)	
V3-41	121 (VL)	122 (VH)	
V3-46	123 (VL)	124 (VH)	
V3-46a	123 (VL)	125 (VH)	
V3-46q	123 (VL)	126 (VH)	
V3-46s	123 (VL)	127 (VH)	
V3-46sFab	128 (LC)	129 (HC)	
V3-46s IgG	128 (LC)	130 (HC)	
V3-46s IgG (N434X)	128 (LC)	131 (HC)	
V3-46s-1	194 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-7	195 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-9	196 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-10	197 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-12	198 (LC)	193 (VH)	
V3-46s-13	199 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-29	200 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-31	201 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-33	202 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-34	203 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-37	204 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-40	205 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-42	206 (LC)	127 (VH)	
V3-46s-45	207 (LC)	127 (VH)	

【0135】

本発明の抗体は、配列番号4-13、15-18、22、24、26-73、75-76、78、80-85、87-96、98、100、102、104、106-107、109-110、112、114、116、118、120、122、124、126及び127の何れか一の配列のH3配列に、少なくともおよそ70%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくともおよそ71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性があるH3配列を有するBR3結合抗体と、これら抗体のBR3結合断片が含まれる。

【0136】

10

20

30

40

50

本発明の抗体は、図に記載の何れか一の抗体配列の下線部又は配列表に記載の高頻度可変領域の C D R に、少なくとも 70 % の同一性、あるいは少なくともおよそ 71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % のアミノ酸同一性がある H 1、H 2 及び H 3 配列を有する B R 3 結合抗体が包含される。

本発明の抗体は、図に記載の何れか一の抗体配列の下線部又は配列表に記載の高頻度可変領域ないしは C D R に、少なくとも 70 % の同一性、あるいは少なくともおよそ 71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % のアミノ酸同一性がある L 1、L 2 及び L 3 配列を有する B R 3 結合抗体が包含される。
10

【 0 1 3 7 】

本発明の抗体は、表 2 の何れか一の抗体の V H ドメインに、少なくとも 70 % の同一性、あるいは少なくともおよそ 71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % のアミノ酸同一性を有する V H ドメインを有する B R 3 結合抗体が包含される。

本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞によって產生されていない表 2 に記載の抗体配列の重鎖 C D R 3 配列を含んでなる任意の B R 3 結合抗体を包含する。本発明の抗体は、配列番号 7 - 13、15 - 18、36、38 - 73、78、82 - 85、87 - 96、98、100、102、104、106 - 107、109 - 110、112、114、116、118、120、122、124、126 及び 127 の何れか一の重鎖 C D R 3 配列を含んでなるか、配列番号 7 - 13、15 - 18、36、38 - 73、78、82 - 85、87 - 96、98、100、102、104、106 - 107、109 - 110、112、114、116、118、120、122、124、126 及び 127 の何れか一の H 3 配列に由来する H 3 配列を含んでなる任意の B R 3 結合抗体を包含する。他の実施態様では、本発明の抗体は、配列番号 7 - 13、15 - 18、36、38 - 73、78、82 - 85、87 - 96、98、100、102、104、106 - 107、109 - 110、112、114、116、118、120、122、124、126 及び 127 からなる群から選択される何れか一の配列の C D R - H 1、C D R - H 2 及び C D R - H 3 を含んでなる任意の B R 3 結合抗体を包含するか、C D R - H 1、C D R - H 2 及び C D R - H 3 配列を含んでなる抗体由来のものである。本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞によって產生されていない表 2 の抗体の重鎖 H 1、H 2 及び H 3 配列を含んでなる任意の B R 3 結合抗体を包含する。
20

【 0 1 3 8 】

本発明の抗体は、2004年11月17日に A T C C 寄託番号PTA-6315として寄託される Hu9.1-RF-H-IgG 核酸配列によってコードされるポリペプチド配列を含んでなる抗体及び、Hu9.1-RF-H-IgG ポリペプチド配列の何れか一の可変領域配列に、少なくとも 70 % の同一性、あるいは少なくともおよそ 71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる抗 B R 3 結合抗体を包含する。本発明の抗体は、2004年11月17日に A T C C 寄託番号PTA-6316として寄託される Hu9.1-RF-L-IgG 核酸配列によってコードされるポリペプチド配列を含んでなる抗体及び、Hu9.1-RF-L-IgG ポリペプチド配列の可変領域配列に、少なくとも 70 % の同一性、あるいは少なくともおよそ 71 %、72 %、73 %、74 %、75 %、76 %、77 %、78 %、79 %、80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、又は 99 % のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる抗 B R 3 結合抗体を包含する。
40

10

20

30

40

50

6%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる抗B R 3結合抗体を包含する。

【0139】

本発明の抗体は、2004年11月17日にATCC寄託番号PTA-6313として寄託されるHu2.1-46.DANA-H-IgG核酸配列によってコードされるポリペプチド配列を含んでなる抗体及び、Hu2.1-46.DANA-H-IgGポリペプチド配列の可変領域配列に、少なくとも70%の同一性、あるいは少なくともおよそ71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる抗B R 3結合抗体を包含する。本発明の抗体は、2004年11月17日にATCC寄託番号PTA-6314として寄託されるHu2.1-46.DANA-L-IgG核酸配列によってコードされるポリペプチド配列を含んでなる抗体及び、Hu2.1-46.DANA-L-IgGポリペプチド配列の可変領域配列に、少なくとも70%の同一性、あるいは少なくともおよそ71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる抗B R 3結合抗体を包含する。

10

【0140】

本発明の抗体は、2004年11月17日にATCC寄託番号PTA-6317として寄託されるHuV3-46s-H-IgG核酸配列によってコードされるポリペプチド配列を含んでなる抗体及び、HuV3-46s-H-IgGポリペプチド配列の可変領域配列に、少なくとも70%の同一性、あるいは少なくともおよそ71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる抗B R 3結合抗体を包含する。本発明の抗体は、2004年11月17日にATCC寄託番号PTA-6318として寄託されるHuV3-46s-L-IgG核酸配列によってコードされるポリペプチド配列を含んでなる抗体及び、HuV3-46s-L-IgGポリペプチド配列の可変領域配列に、少なくとも70%の同一性、あるいは少なくともおよそ71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%のアミノ酸同一性を有するアミノ酸配列を含んでなる抗B R 3結合抗体を包含する。

20

30

【0141】

本発明の抗体は、ATCC寄託番号PTA-6315の重鎖配列とATCC寄託番号PTA-6316の軽鎖配列を含んでなるHu9.1-RF-IgG抗体を包含する。本発明の抗体は、ATCC寄託番号PTA-6313の重鎖配列とATCC寄託番号PTA-6314の軽鎖配列を含んでなるHu2.1-46.DANA-IgG抗体を包含する。本発明の抗体は、ATCC寄託番号PTA-6317の重鎖配列とATCC寄託番号PTA-6318の軽鎖配列を含んでなるHuV3-46s-IgG抗体を包含する。

40

ある好適な実施態様では、本発明の抗体は、天然のヒトB R 3ポリペプチドの配列に特異的に結合する。さらに他の実施態様では、本発明の抗体は、9.1-RF Igとして公知の抗体と比較してpH 6.0でのFcRnレセプターへの結合を改善している。さらに他の実施態様では、本発明の抗体は、9.1-RF Igとして公知の抗体と比較してヒトエフェクターカélleの存在下でADC C機能を改善している。さらに他の実施態様では、本発明の抗体は、9.1-RF Igとして公知の抗体と比較してヒトエフェクターカélleの存在下でADC C機能を減弱している。

本発明のすべての抗体は、シグナル配列を欠く抗体及びFc領域のK447残基を欠く抗体を包含することは理解されるであろう。

【0142】

50

ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明はまた B R 3 結合抗体をコードしている単離された核酸又は B R 3 結合ポリペプチド、該核酸を含むベクター及び宿主細胞、及び抗体の生産に対する組換え方法を提供する。

B R 3 結合抗体及びポリペプチドの組換え生産のために、それをコードする核酸が単離され、さらなるクローニング(D N Aの増幅)又は発現のために、複製可能なベクター中に挿入される。モノクローナル抗体ないしポリペプチドをコードする D N A は直ぐに単離され、通常の手法を用いて(例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドを使用することによって)配列決定される。多くのベクターが公的に入手可能である。ベクター成分には、一般に、これらに制限されるものではないが、次のもののー又は複数が含まれる:シグナル配列、複製開始点、ー又は複数のマークー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列である。

【0143】

(i) シグナル配列成分

この発明の抗体ないしポリペプチドは直接的に組換え手法によって生産されるだけではなく、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいはポリペプチドの N 末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドである異種性ポリペプチドとの融合ペプチドとしても生産される。好ましく選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものである。天然 B R 3 結合抗体シグナル配列を認識せずプロセシングしない原核生物宿主細胞に対して、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、1 p p あるいは熱安定なエンテロトキシン I I リーダーの群から選択される原核生物シグナル配列により置換される。酵母での分泌に対して、天然シグナル配列は、例えば酵母インベルターゼリーダー、因子リーダー(酵母菌属(Saccharomyces)及びクルイベロマイシス(Kluyveromyces) 因子リーダーを含む)、又は酸ホスフォターゼリーダー、白体(C. albicans)グルコアミラーゼリーダー、又は国際公開第 90/13646 号に記載されているシグナルにより置換されうる。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペス g D シグナルが利用できる。

このような前駆体領域の D N A は、好ましくは、 B R 3 結合抗体をコードする D N A に読み替を一致させて結合される。

【0144】

(ii) 複製開始点

発現及びクローニングベクターは共にー又は複数の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターにおいて、この配列は宿主染色体 D N A とは独立にベクターが複製することを可能にするものであり、複製開始点又は自律的複製配列を含む。そのような配列は多くの細菌、酵母及びウイルスに対してよく知られている。プラスミド p B R 3 2 2 に由来する複製開始点は大部分のグラム陰性細菌に好適であり、2 μ プラスミド開始点は酵母に適しており、様々なウイルス開始点(S V 4 0、ポリオーマ、アデノウイルス、V S V 又は B P V)は哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である(S V 4 0 開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる)。

【0145】

(iii) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、典型的には、選択可能マークーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)栄養要求性欠陥を補い、又は(c)例えばバシリに対する遺伝子コード D -アラニンラセマーゼのような、複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首

10

20

30

40

50

尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、B R 3 結合抗体核酸を捕捉することができる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばD H F R、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン I 及び I I 、好ましくは、靈長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

例えば、D H F R 選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、D H F R の競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(M t x)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型D H F R を用いた場合の好適な宿主細胞は、D H F R 活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(C H O)株化細胞である(例として、A T C C C R L - 9 0 9 6)。

【 0 1 4 6 】

あるいは、B R 3 結合抗体をコードするD N A 配列、野生型D H F R タンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(A P H)のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性D H F R を含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG 4 1 8 のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第4 9 6 5 1 9 9 号を参照のこと。

酵母中での使用に好適な選択遺伝子は酵母プラスミドY R p 7 に存在するt r p 1 遺伝子である(Stinchcomb等, *Nature*, 282: 39(1979))。t r p 1 遺伝子は、例えば、A T C C 第4 4 0 7 6 号あるいはP E P 4 - 1 のようなトリプトファン内で成長する能力に欠ける酵母の突然変異株に対する選択マーカーを提供する。Jones, *Genetics*, 85:12 (1977)。酵母宿主細胞ゲノムにt r p 1 破壊が存在することは、ついでトリプトファンの不存在下における増殖による形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、L e u 2 欠陥酵母株(A T C C 2 0 6 2 2 あるいは3 8 6 2 6)は、L e u 2 遺伝子を有する既知のプラスミドによって補完される。

更に、1 . 6 μ mの円形プラスミドp K D 1 由来のベクターは、クルイヴェロマイシス(Kluyveromyces)酵母の形質転換に用いることができる。あるいは、組換え仔ウシのキモシンの大規模生産のための発現系がK. ラクティス(*lactis*)に対して報告されている。Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990)。クルイヴェロマイシスの工業的な菌株による、組換え体成熟ヒト血清アルブミンの分泌のための安定した複数コピー発現ベクターもまた開示されている。Fleer 等, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991)。

【 0 1 4 7 】

(iv) プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物体によって認識されB R 3 結合抗体核酸に作用可能に結合しているプロモーターを含む。原核生物宿主での使用に好適なプロモーターは、p h o A プロモーター、ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼ、トリプトファン(t r p)プロモーター系、及びハイブリッドプロモーター、例えばt a c プロモーターを含む。しかし、他の既知の細菌プロモーターも好適である。細菌系で使用するプロモータもまたB R 3 結合抗体をコードするD N A と作用可能に結合したシャイン・ダルガーノ(S. D.)配列を有する。

真核生物に対してもプロモーター配列が知られている。実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ2 5ないし3 0 塩基上流に見出されるA T リッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から7 0ないし8 0 塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるC N C A A T 領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加に対するシグナルであるA A T A A A 配列がある。これらの配列は全て真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

【 0 1 4 8 】

酵母宿主と共に用いて好適なプロモーター配列の例としては、3 - ホスホグリセラート

10

20

30

40

50

キナーゼ又は他の糖分解酵素、例えばエノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセレートムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオセリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ、及びグルコキナーゼが含まれる。

他の酵母プロモーターは、成長条件によって転写が制御される付加的効果を有する誘発的プロモーターであり、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC、酸ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、及びマルトース及びガラクトースの利用を支配する酵素のプロモーター領域である。酵母の発現に好適に用いられるベクターとプロモータは欧州特許73657に更に記載されている。また酵母エンハンサーも酵母プロモーターと共に好適に用いられる。

10

【0149】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの抗体の転写は、例えば、ポリオーマウィルス、伝染性上皮腫ウィルス、アデノウィルス(例えばアデノウィルス2)、ウシ乳頭腫ウィルス、トリ肉腫ウィルス、サイトメガロウィルス、レトロウィルス、B型肝炎ウィルス、サルウィルス40(SV40)などのウィルスのゲノムから得られるプロモーター、又は異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチングロブリンプロモーター、又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

20

SV40ウィルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウィルスの複製起点を更に含むSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウィルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウィルスを用いて哺乳動物宿主中でDNAを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。また、単純ヘルペスウィルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの調節下でのマウス細胞中でのヒトインターフェロンcDNAの発現について、Reyes等、Nature, 297: 598-601(1982)を参照のこと。あるいは、ラウス肉腫ウィルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

30

【0150】

(v) エンハンサー要素成分

より高等の真核生物によるこの発明の抗体をコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスター、アルブミン、

-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウィルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100-270塩基対)、サイトメガロウィルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウィルスエンハンサーが含まれる。真核生物プロモーターの活性化のための増強要素については、Yaniv, Nature, 297: 17-18 (1982)もまた参考のこと。エンハンサーは、抗体コード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、好ましくはプロモーターから5'位に位置している。

40

【0151】

(vi) 転写終結成分

真核生物宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)に用いられる発現ベクターは、また転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含む。このような配列は、真核生物又はウィルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94

50

/11026号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

【0152】

(vii) 宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、又は高等真核生物細胞である。この目的にとって適切な原核生物は、限定するものではないが、真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物体、例えばエシェリチアのような腸内菌科、例えば大腸菌、エンテロバクター、エルウィニア(*Erwinia*)、クレブシエラ、プロテウス、サルモネラ、例えばネズミチフス菌、セラチア属、例えばセラチア・マルセスキヤンス及び赤痢菌属、並びに桿菌、例えば枯草菌及びバシリ・リチエフォルミス(*licheniformis*)(例えば、1989年4月12日に公開されたDD266710に開示されたバシリ・リチエニフォルミス41P)、シュードモナス属、例えば緑膿菌及びストレプトマイセス属を含む。一つの好適な大腸菌クローニング宿主は大腸菌294(ATCC31446)であるが、他の大腸菌B、大腸菌X1776(ATCC31537)及び大腸菌W3110(ATCC27325)のような株も好適である。これらの例は限定するものではなく例示的なものである。

10

【0153】

全長抗体、抗体断片、および抗体融合タンパク質は細菌内で生成することができ、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能は必要でない、例として、治療的抗体が細胞障害性剤(例として、毒素)にコンジュゲートして、その免疫コンジュゲートが腫瘍細胞破壊に効果的である場合など。全長抗体は循環中で半減期が長い。大腸菌での生成がより早くよりコスト効率がよい。大腸菌における抗体断片およびポリペプチドの発現方法について、発現および分泌を最適化する転写開始領域(TIR)およびシグナル配列を記載している米国特許第5,648,237号(Carterら.)、同第5,789,199号(Jolyら.)、および同第5,840,523号(Simmonsら)を参照のこと。これらの特許文献はここ文献として組み込まれる。発現後、可溶性分画の大腸菌ペーストから抗体を単離し、例としてアイソタイプによるプロテインAまたはGカラムにより精製しうる。例としてCHO細胞での発現抗体精製工程と同様にして最終的精製を行う。

20

【0154】

原核生物に加えて、糸状菌又は酵母菌のような真核微生物は、BR3結合抗体をコードするベクターのための適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレヴィシア、又は一般的なパン酵母は下等真核生物宿主微生物のなかで最も一般的に用いられる。しかしながら、多数の他の属、種及び菌株も、一般的に入手可能でここで使用できる、例えば、シゾサッカロマイセスポンベ；クルイベロマイセス宿主、例えばK.ラクティス、K.フラギリス(ATCC12424)、K.ブルガリカス(ATCC16045)、K.ウィッケラミイ(ATCC24178)、K.ワルチイ(ATCC56500)、K.ドロソフィラルム(ATCC36906)、K.サーモトレランス、及びK.マルキシアナス；ヤローウィア(EP402226)；ピチアパストリス(EP183070)；カンジダ；トリコデルマ・リーシア(EP244234)；アカパンカビ；シュワニオマイセス、例えばシュワニオマイセスオクシデンタリス；及び糸状真菌、例えばパンカビ属、アオカビ属、トリポクラジウム、及びコウジカビ属宿主、例えば偽巣性コウジ菌及びクロカビが使用できる。

30

【0155】

グリコシル化BR3結合抗体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物から誘導される。無脊椎動物細胞の例としては植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウィルス株及び変異体及び対応する許容可能な昆虫宿主細胞、例えばスポットテラ・フルギベルダ(毛虫)、アエデス・アエジプティ(蚊)、アエデス・アルボピクトウス(蚊)、ドウロソフィラ・メラノガスター(ショウジョウバエ)、及びボンビクス・モリが同定されている。トランスフェクションのための種々のウィルス株、例えば、オートグラファ・カリフォルニアNPVのL-1変異体とボンビクス・モリNPVのBm-5株が公に利用でき、そのようなウィルスは本発明においてここに記載したウィルスとして使用でき、特にスポットテラ・

40

50

フルギペルダ細胞の形質転換に使用できる。

綿花、コーン、ジャガイモ、大豆、ペチュニア、トマト、及びタバコのような植物細胞培養を宿主として利用することができる。

【0156】

しかしながら、脊椎動物細胞におけるものが最も興味深く、培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、S V 40 によって形質転換されたサル腎臓 CV 1 株 (C O S - 7, A T C C C R L 1 6 5 1); ヒト胚腎臓株 (2 9 3 又は懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた 2 9 3 細胞、G raham 等, J. Gen Virol., 36:59 (1977)); ハムスター乳児腎細胞 (B H K, A T C C C C L 1 0); チャイニーズハムスター卵巣細胞 / - D H F R (C H O, Urlaub 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980)); マウスのセルトリ細胞 (T M 4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980)); サルの腎細胞 (C V 1 A T C C C C L 7 0); アフリカミドリザルの腎細胞 (V E R O - 7 6, A T C C C R L - 1 5 8 7); ヒト子宮頸癌細胞 (H E L A, A T C C C C L 2); イヌ腎細胞 (M D C K, A T C C C C L 3 4); パッファーラット肝細胞 (B R L 3 A, A T C C C R L 1 4 4 2); ヒト肺細胞 (W 1 3 8, A T C C C C L 7 5); ヒト肝細胞 (H e p G 2, H B 8 0 6 5); マウス乳房腫瘍細胞 (M M T 0 6 0 5 6 2, A T C C C C L 5 1); T R I 細胞 (Mather 等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982)); M R C 5 細胞; F S 4 細胞; 及びヒト肝癌株 (H e p G 2)である。

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

【0157】

(viii) 宿主細胞の培養

本発明の抗体を产生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム (H a m) の F 1 0 (シグマ)、最小必須培地 ((M E M), (シグマ)、R P M I - 1 6 4 0 (シグマ) 及びダルベッコの改良イーグル培地 ((D M E M), (シグマ)) が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham 等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes 等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第 4 7 6 7 7 0 4 号; 同 4 6 5 7 8 6 6 号; 同 4 9 2 7 7 6 2 号; 同 4 5 6 0 6 5 5 号; 又は同 5 1 2 2 4 6 9 号; 国際公開第 9 0 / 0 3 4 3 0 号; 国際公開第 8 7 / 0 0 1 9 5 号; 又は米国再発行特許第 3 0 9 8 5 号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び / 又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、パッファー(例えば H E P E S)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、G E N T A M Y C I NTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の必要な補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、p H 等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0158】

(ix) 精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内、細胞膜周辺腔に生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第 1 の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。Carter 等, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) は、大腸菌の細胞膜周辺腔に分泌された抗体の単離方法を記載している。簡単に述べると、細胞ペーストを、酢酸ナトリウム (p H 3 . 5)、E D T A、及びフェニルメチルスルホニルフルオリド (P M S F) の存在下で約 3 0 分間解凍する。細胞細片は遠心分離で除去できる。抗体が培地に分泌された場合

10

20

30

40

50

は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば *A m i c o n* 又は *P e l l i c o n* の限外濾過装置を用いて濃縮する。P M S F などのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

【0159】

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィ、疎水性相互作用クロマトグラフィ、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、とりわけアフィニティクロマトグラフィが好ましい精製工程である。アフィニティーリガンドとしてのプロテイン A の適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリン F c 領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテイン A は、ヒト 1、2 10 又は 4 重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる (Lindmark 等, *J. immunol. Met.* 62: 1-13 (1983))。プロテイン G は、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3 に推奨されている (Guss 等, *EMBO J.* 5: 1657-1575 (1986))。アフィニティーリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであることが最も多いが、他の材料も使用可能である。孔制ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体が C_H 3 ドメインを含む場合、*B a k e r b o n d* A B XTM 樹脂 (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ) が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相 H P L C、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上での S E P H A R O S ETM クロマトグラフィー (ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、S D S - P A G E、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。 20

予備的精製工程に統いて、目的の抗体および混入物を含む混合液を pH 約 2.5 - 4.5、好ましくは低塩濃度 (例として、約 0.0.25 M 塩) の溶出緩衝液を用いて低 pH 疎水性作用クロマトグラフィを行う。

【0160】

抗体コンジュゲート

抗体は細胞障害性剤、例として毒素または放射性同位体とコンジュゲートしうる。ある実施態様では、毒素はカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウリストチン E およびその類似体または誘導体が好ましい。

好ましい薬剤 / 毒素には、D N A 阻害剤、微小管重合化または脱重合化阻害剤および代謝阻害剤を含む。細胞障害性剤の好ましいものには、例えば、酵素阻害剤、例としてジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、およびチミジル酸合成酵素阻害剤、D N A 干渉物質、D N A 切断物質、トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリンファミリー剤、ビンカ剤、マイトイシン、ブレオマイシン、細胞障害性ヌクレオシド、ブテリジンファミリー剤、ジイネネス (diynenes)、ポドフィロトキシン、および分化誘導物質を含む。好ましい薬剤 / 毒素には、D N A 阻害剤、微小管重合化または脱重合化阻害剤および代謝阻害剤を含む。細胞障害性剤の好ましいものには、例えば、酵素阻害剤、例としてジヒドロ葉酸還元酵素阻害剤、およびチミジル酸合成酵素阻害剤、D N A 干渉物質、D N A 切断物質、トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリンファミリー剤、ビンカ剤、マイトイシン、ブレオマイシン、細胞障害性ヌクレオシド、ブテリジンファミリー剤、ジイネネス (diynenes)、ポドフィロトキシン、および分化誘導物質を含む。特に有用なものの中には、例としてメトレキサート、メトブテリン (methopterin)、ジクロロメトトレキセート (dichloromethotrexate)、5フルオロウラシルの、そして、6メルカプトプリンのシトシンアラビノシド、メルファラン、レウロシン (leurosine)、レウロシデイン (leurosidine)、アクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、N(5、5-ジアセトキシペンチル)ドキソルビシン、モルフォリノ-ドキソルビシン、1(2-クロエチル)-1、2-ジメタネスルホニル (dimethanesulfonyl) ヒドラジッド、N⁸-アセチルスペルミジン、アミノブテリンメトブテリン、エスペラマイシン、マイトイシン C、マイトイシン A、アクチノマイシン、ブレオマイシン、カルミノマイシン、アミノブテリン、タリソマイシン、ポドフィロトキシンおよびポドフ 40 50

イロトキシン誘導体、例としてエトボシドまたはエトボシドリン酸塩、ビンプラスチン、ビンクリスチン、ビンデシン、タキソール、タキソテレ、レチノイン酸、酪酸、N⁸-アセチルスペルミジン、カンプトテシン、カリケアマイシン、ブリオスタチン、セファロスタチン、アンサマイシン、アクトシン、メイタンシノイド、例としてDM-1、メイタンシン、メイタンシノール、N-デスマチル-4,5-デセボキシメイタンシノイド、C-19-デクロロメイタンシノイド、C-20-ヒドロキシメイタンシノール、C-20-デメトキシメイタンシノール、C-9-SH メイタンシノール、C-14-アルコキシメチルメイタンシノール、C-14-ヒドロキシまたはアセチルオキシメチルメイタンシノール、C-15-ヒドロキシ/アセチルオキシメイタンシノール、C-15-メトキシメイタンシノール、C-18-N-デメチルメイタンシノールおよび4,5-デオキシメイタンシノール、アウリスタチン、例としてアウリスタチンE、M、PHEおよびPE；ドロスタチン(dolostatin)、例としてドロスタチンA、ドロスタチンB、ドロスタチンC、ドロスタチンD、ドロスタチンE(20-epi and 11-epi)、ドロスタチンG、ドロスタチンH、ドロスタチンI、ドロスタチン1、ドロスタチン2、ドロスタチン3、ドロスタチン4、ドロスタチン5、ドロスタチン6、ドロスタチン7、ドロスタチン8、ドロスタチン9、ドロスタチン10、deo-ドロスタチン10、ドロスタチン11、ドロスタチン12、ドロスタチン13、ドロスタチン14、ドロスタチン15、ドロスタチン16、ドロスタチン17、and ドロスタチン18；セファロスタチン(cephalostatin)、例としてセファロスタチン1、セファロスタチン2、セファロスタチン3、セファロスタチン4、セファロスタチン5、セファロスタチン6、セファロスタチン7、25'-epi-セファロスタチン7、20-epi-セファロスタチン7、セファロスタチン8、セファロスタチン9、セファロスタチン10、セファロスタチン11、セファロスタチン12、セファロスタチン13、セファロスタチン14、セファロスタチン15、セファロスタチン16、セファロスタチン17、セファロスタチン18、およびセファロスタチン19を含む。

【0161】

メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラップMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3,896,111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えはメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4,151,042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えは米国特許第4,137,230号；同4,248,870号；同4,256,746号；同4,260,608号；同4,265,814号；同4,294,757号；同4,307,016号；同4,308,268号；同4,308,269号；同4,309,428号；同4,313,946号；同4,315,929号；同4,317,821号；同4,322,348号；同4,331,598号；同4,361,650号；同4,364,866号；同4,424,219号；同4,450,254号；同4,362,663号；及び同4,371,533号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。

【0162】

メイタンシン及びメイタンシノイドは、腫瘍細胞抗原に特異的に結合する抗体と結合している。メイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート及びそれらの治療用途は、例えは米国特許第5,208,020号、同5,416,064号、欧洲特許第0425235B1号に開示されており、その開示は出典を明示してここに取り込まれる。Liuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞毒性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chariら, Cancer Research, 52: 127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合し

10

20

30

40

50

ている免疫コンジュゲートが記載されている。

【0163】

例えば、米国特許第5208020号又は欧州特許第0425235号B1、及びChari等、Cancer Research, 52: 127-131(1992)に開示されているもの等を含む、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。結合基には、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれるが、上記特許文献に開示されているように、ジスルフィド及びチオエーテル基が好ましい。

【0164】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能価性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPD)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(ITT)、イミドエステル類の二官能価性誘導体(例えばジメチルアジビミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好ましいカップリング剤には、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPD)(Carlsson等, Biochem. J. 173: 723-737[1978])およびジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。好ましい実施態様において、結合はメイタンシノール又はメイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。

【0165】

カリケアマイシン

対象の他の免疫コンジュゲートには、1つ又は複数のカリケアマイシン分子とコンジュゲートしたBR3結合抗体が含まれる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、₁^I、₂^I、₃^I、N-アセチル-₁^I、PSAG及び₁^I(Hinman等, Cancer Research, 53: 3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58: 2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方とも、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

【0166】

放射性同位元素

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗BR3抗体を生成するために、種々の放射性同位元素が利用される。例には、²¹¹At、¹³¹I、¹²⁵I、⁹⁰Y、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁵³Sb、²¹²Bi、²³²Pa、²¹²Pb及び¹⁶⁶Luの放射性同位元素が含まれる。コンジュゲートが診断用に使用される場合、それはシンチグラフィー研究用の放射性原子、例えば

10

20

30

40

50

t_c^{99m} 又は I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば t_c^{99m} 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80: 49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

【0167】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート、イミノチオラン(IFT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スペリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MXTTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であつてよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52: 127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

【0168】

B R 3 結合抗体の医薬使用

本発明のB R 3結合抗体は、自己免疫疾患および関連症状、B細胞リンパ腫および白血病を含むB R 3陽性癌を含む悪性および非悪性疾患の治療に有用である。骨髄中の幹細胞(B細胞前駆細胞)はB R 3抗原を欠き、治療後健康なB細胞が生成され、数か月で正常レベルに戻る。

【0169】

自己免疫疾患又は自己免疫関連症状には、関節炎(リウマチ様関節炎、若年性関節リウマチ、骨関節炎、乾癬性関節炎)、乾癬、アトピーを含む皮膚炎；慢性の自己免疫性蕁麻疹、多発筋炎/皮膚筋炎、毒性の表皮壊死症、全身性硬皮症、および硬化症、炎症性腸疾患(IBD)(クローン病、潰瘍性大腸炎)関連反応、呼吸窮迫症候群、成人呼吸窮迫症候群(ARDS)、髄膜炎、アレルギー性鼻炎、脳炎、ぶどう膜炎、大腸炎、腎炎、アレルギー症状、湿疹、喘息、T細胞および慢性炎症性応答の浸潤に伴う症状、アテローム性動脈硬化症、自己免疫性心筋炎、白血球接着不全、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、ループス(腎炎、非腎臓性、円形脱毛症)、若年型糖尿病、多発性硬化症、アレルギー性脳脊髄炎、サイトカインおよびTリンパ球媒介性急性および遅延性過敏症に関連する免疫反応、結核、サルコイドーシス、ヴェグナー肉芽腫症を含む肉芽腫症、顆粒球減少症、脈管炎(ANCAを含む)、再生不良性貧血、クームス積極的な貧血、ダイアモンド-ブラックファン(Diamond Blackfan)貧血、自己免疫性溶血性貧血(AIHA)を含む免疫性溶血性貧血、悪性貧血、赤芽球病(PRCA)、第VIII因子欠乏、血友病A、自己免疫性好中球減少症、汎血球減少症、白血球減少症、白血

10

20

30

40

50

球血管外遊出に伴う病気、CNS炎症性疾病、複数の器官傷害症候群、重症筋無力症、抗原-抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜病、抗りん脂質抗体症候群、アレルギー性神経炎、ベーチェット病、カースルマン症候群、グッドパスチュア症候群、ランバート-イートン筋無力症症候群、レーノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンス-ジョンソン症候群、固体器官移植臓器拒絶反応(高パネルの反応抗体力値のための前処理、組織におけるIgA沈着症等を含む)、移植片対宿主病(GVHD)、類天疱瘡、天疱瘡(尋常性、落葉状をすべて含む)、自己免疫性多腺性内分泌障害、レイター病、スティフマン症候群、巨細胞動脈炎、免疫複合体性腎炎、IgA腎障害、IgM多発性神経炎又はIgM関連神経障害、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、自己免疫性血小板減少症、自己免疫性睾丸炎と卵巣炎を含む精巣および卵巣の自己免疫疾患、原発性甲状腺機能低下症；自己免疫性甲状腺炎、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)を含む自己免疫性内分泌疾患、亜急性甲状腺炎、特発性甲状腺機能低下症、アジソン病、グレーブス病、自己免疫性多腺性症候群(または、多腺性内分泌疾患症候群)、インスリン依存性糖尿病(IDDM)とも言われるI型糖尿病およびシーハン症候群；自己免疫性肝炎、リンパ様間質性肺炎(HIV)、閉塞性細気管支炎(非移植性)対NSIP、ギラン・バレー症候群、大血管脈管炎(リウマチ性多発筋痛と巨細胞(高安)動脈炎を含む)、中血管血管炎(川崎病および結節性多発性動脈炎を含む)、強直性脊椎炎、バーガー病(IgA腎症)、急速進行性糸球体腎炎、原発性胆汁性肝硬変、複腔熱帯性下痢(グルテン性腸症)、クリオグロブリン血症、ALS、冠動脈疾患が含まれる。
。

10

20

30

40

50

【0170】

B R 3 陽性癌は細胞表面上にB R 3 を発現する細胞の異常増幅を含むものである。B R 3 陽性B細胞腫瘍には、リンパ球優性ホジキン病(LPHD)を含むB R 3 陽性ホジキン病；非ホジキンリンパ腫(NHL)；濾胞性中心細胞リンパ腫(FCC)；急性リンパ性白血病(ALL)；慢性リンパ球性白血病(CLL)；ヘアリー細胞白血病が含まれる。非ホジキンリンパ腫には、低程度/濾胞性非ホジキンリンパ腫(NHL)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、中程度/濾胞性NHL、中程度びまん性NHL、高程度免疫芽細胞NHL、高程度リンパ芽球性NHL、高程度小正円形細胞(non-cleaved cell)NHL、龐大な病気のNHL、プラズマ細胞様リンパ球性リンパ腫、外套細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫およびワルデンストロームマクログロブリン血症が含まれる。これらの癌の再発治療を含む。LPHDは頻回の放射線又は化学療法にもかかわらず再発する傾向にあるホジキン型の疾患であり、B R 3 陽性悪性細胞の特徴がある。CL Lはリンパ球といわれる成熟B細胞の4つの主要な白血病A癌のうちの一つである。CL Lは血液、骨髄およびリンパ球組織における細胞の進行性蓄積が顕在化する。

【0171】

特定の実施態様では、B R 3 結合抗体およびその機能的断片は、非ホジキンリンパ腫(NHL)、リンパ球優性ホジキン病(LPHD)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、慢性リンパ球性白血病、リウマチ様関節炎、および若年性関節リウマチ、ループス腎炎を含む全身性紅斑性狼瘡(SLE)、ヴェゲナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、抗血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、自己免疫性血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、IgA腎症、IgM多発性神経炎、重症筋無力症、脈管炎、糖尿病、レーノー症候群、シェーグレン症候群、および腎炎の治療に使用される。

【0172】

B R 3 結合抗体またはその機能的断片は、例として再発または難治性低程度または濾胞性、B R 3 陽性、B細胞NHLのための単剤治療に有用であり、多剤療法の多剤と組み合わせて患者に投与可能である。

治癒の遅いリンパ腫は成長が遅い難病であり、患者は緩解と再発を繰返し6から10年生存するものである。一実施態様では、ヒト化B R 3 結合抗体またはその機能的断片は治癒の遅いNHLの治療に用いられる。

腫瘍治療の効率または効果を評価するパラメータが適当な疾患で医師に知られている。一般に、医師は特定の失陥の徵候および症状の減弱を求めるであろう。パラメータは疾患の進行の中央値時間、緩解、疾患の安定時間を含む。

【0173】

以下に示す文献は、リンパ腫およびCLL、その診断、治療および治療効果を評価するための標準的な医療手順について記載している。Canellas GP, Lister, TA, Sklar JL: The Lymphomas. W.B.Saunders Company, Philadelphia, 1998、van Besien KおよびCabanillas, F: Clinical Manifestations, Staging and Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma, Chap. 70, 1293-1338頁, in: Hematology, Basic Principles and Practice, 3rd ed. Hoffman 等. (editors). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000、およびRai, K およびPatel, D: Chronic Lymphocytic Leukemia, Chap. 72, 1350-1362頁, in: Hematology, Basic Principles and Practice, 3rd ed. Hoffmanら (editors). Churchill Livingstone, Philadelphia, 2000。

自己免疫または自己免疫関連疾患の治療の効率および成功率を評価するためのパラメータは、適当な疾患で医師に知られている。一般に、医師は特定の失敗の徴候および症状の減弱を求めるであろう。以下は、実施例の方法による。

【0174】

一実施態様では、本発明の抗体は、関節リウマチの治療に有用である。RAは多関節の炎症、軟骨の減少、骨侵食により関節の破壊および最終的に関節機能の減退をもたらす特徴がある。加えて、RAは全身性疾患であるため、他の組織、例として肺、眼および骨髄に影響しうる。10年以上患っているRA患者の50%弱は日常を基準として仕事を続けるまたは正常に機能し続けている。

初期RA(すなわち、メトトレキセート(MTX)未処理)患者の一次治療および単剤治療、または例としてMTXもしくはシクロフォスファミドとの組合せとして抗体が利用可能である。もしくは、DMARDおよび/またはMTX抵抗性患者の二次療法、および単剤療法および例としてMTXとの組合せとして治療に抗体が利用できる。ヒト化B R 3 結合抗体は関節傷害の予防と調節、機能傷害の遅延、RAの炎症に伴う痛みの軽減に有用である。RA治療に用いる多剤での処置の前、後、または同時にRA患者をヒト化B R 3 抗体で治療する(以下の混合治療参照)。一実施態様では、以前に病気を調整する抗リウマチ薬に失敗した患者および/またはメトトレキセート単独では効果が不十分な患者は本発明のヒト化B R 3 結合抗体で治療する。この治療の一実施態様では、ヒト化B R 3 結合抗体単独を17日間の投与計画(第1および15日目に1gを静脈注射)；B R 3 結合抗体+シクロフォスファミド(第3および17日目に750mg静脈投与)、またはB R 3 結合抗体+メトトレキセートで患者を治療する。

【0175】

RAの治療効果を評価するある方法は、American College of Rheumatology (ACR)診断基準に基づくものであり、圧痛および腫大した関節の改善の割合を測定するものである。RA患者は、無抗体治療(例として、治療前の基準)またはプラセボ治療と比較して例としてACR20(20パーセントの改善)でスコア付けをする。抗体治療の効果を評価する他の方法は、X線画像、例として骨の侵食および関節腔の狭小化等の構造的傷害のスコア付けに用いられる鋭X線スコアを含む。また、患者は、治療期間中または治療後にHealth Assessment Questionnaire [HAQ]スコア、AIMSスコア、SF-36に基づいて能力障害の予防または改善の評価をすることができる。ACR20診断基準は、圧痛(痛み)関節数と腫大関節数の両方に20%の改善があり、5つの追加測定のうち少なくとも3つに20%の改善があることを含む。

1. 視覚的類似尺度(VAS)による患者の痛み評価
2. 疾患活動性の患者の全体評価(VAS)
3. 疾患活動性の医師の全体評価(VAS)
4. Health Assessment Questionnaireにより測定した能力障害の患者の自己評価、および
5. 急性期反応、CRPまたはESR

ACR50および70も同様に定義する。好ましくは本発明のB R 3 結合抗体を少なくともACR20のスコア、好ましくは少なくともACR30、より好ましくは少なくともA

10

20

30

40

50

C R 5 0 、さらにより好ましくは少なくとも A C R 7 0 、最も好ましくは少なくとも A C R 7 5 より高いスコアに達する用量を患者に投与する。

【 0 1 7 6 】

乾癬性関節炎は特異的で明瞭なX線撮影像的特徴を有する。乾癬性関節炎の関節侵食および関節腔狭小化も同様にシャープ(sharp)スコアにより評価しうる。本発明のヒト化B R 3 結合抗体は関節傷害の予防だけでなく疾患の兆候および疾病の症状の減弱に利用可能である。

さらに、本発明の他の側面では、本発明のB R 3 結合抗体の治療的有効量をS L E 患者に投与することによるループスまたはS L E の治療方法である。S L E D A I スコアでは疾患の活動性を数量で表す。S L E D A I は疾患活動性に相關することが知られている24の臨床および治験の荷重指数であり、0 - 1 0 3 の数的範囲である。Bryan Gescuk & John Davis, "Novel therapeutic agent for systemic lupus erythematosus" in Current Opinion in Rheumatology 2002, 14:515-521を参照。二本鎖D N A に対する抗体は、血清クレアチニン、尿蛋白、または尿中の血液で顕著に生成され増加することで定義される腎性発赤および他のループスの症状を引き起こすと信じられている。代わりに、または加えて、抗核抗体および二本鎖D N A に対する抗体のレベルで患者をモニターする。S L E 治療は高用量の副腎皮質ステロイドおよび／またはシクロホスファミド(HDCC)を含む。

【 0 1 7 7 】

脊椎関節症は関節疾患のグループであり、硬直性脊椎炎、乾癬性関節炎、クローン病を含む。治療成果は、確認された患者および医師の全体的評価測定方法によって決定しうる。

様々な医薬が乾癬治療に用いられる；疾患重症度に関連して治療が異なる。より軽度な感染患者は一般的に局所治療、例として局所ステロイド、アンスラリン(anthralin)、カルシポトリエン(calcipotriene)、クロベタゾール(clobetasol)、およびタザロテン(tazarotene)が、全身的(メトレキセート、レチノイド、シクロスボリン、P U V A およびU V B)治療を行うと思われる中度および重症乾癬患者では疾患の管理に有効である。タルも利用される。これらの治療は、安全性の考慮、時間のかかる投与計画、または不便な治療過程を複合して有する。さらに、いくつかは高価な設備および設置のための場所を必要とする。全身性医薬は、高血圧、高脂血症、骨髄抑制、肝疾患、腎疾患、および消化器系不調を含む様々な副作用を引き起こしうる。また、光線療法の使用は皮膚癌の発症を増加させうる。局所療法の使用に伴う不便および不快感に加え、光線療法および全身性治療は患者を処置および非処置の周期におき、その副作用のために生涯曝露をモニターする必要がある。

【 0 1 7 8 】

乾癬の治療効果は、医師の包括的評価(PGA)変化、および乾癬領域および重症度指数(PA SI)スコア、乾癬症状評価(PSA)を含む臨床兆候および疾患の症状の変化をモニターし、基礎となる症状と比較することによって評価する。特定の時点で経験した搔痒の程度を表すために用いられる視覚的類似尺度の処置を通して定期的に患者を測定する。

患者は治療的抗体の初期注入時に注入反応または注入関連症状を経験するかもしれない。これらの症状は重症度が様々であり、一般的に医療処置に可逆的なものである。これらの症状はここに限るものではないが、インフルエンザのような熱、寒気/硬直、吐き気、蕁麻疹、頭痛、気管支炎、血管性水腫が含まれる。本発明の疾患治療方法には注入反応を最小限にすることが望まれる。ゆえに、本発明の他の側面では、B R 3 結合抗体を投与することによるここに開示された疾患の治療方法であり、ここでの抗体は補体依存性の細胞傷害性を減弱または全く持たないものである。

【 0 1 7 9 】

用量

当業の医師によく知られた治療効能および用量に関する因子次第で、毒素および副作用を最小限にする一方で治療効能を有効にする用量で本発明の抗体を投与するであろう。癌、自己免疫疾患又は免疫不全性疾患の治療のための治療的有効量は、5 0 m g / 用量 ~ 2

10

20

30

40

50

.5 g / m² の範囲でありうる。一実施態様では、投与される用量は約 250 mg / m² ~ 約 400 mg / m² または 500 mg / m² である。他の実施態様では、用量は約 250 ~ 375 mg / m² の範囲とする。更なる他の実施態様では、用量範囲は 275 - 375 mg / m² である。

本明細書中に記載の B R 3 陽性 B 細胞腫瘍(例えば、慢性リンパ球性白血病(C L L)、非ホジキンリンパ腫(N H L)、濾胞性リンパ腫(F L)又は多発性骨髄腫)の治療の一実施態様では、抗体は 50 mg / 用量 ~ 2.5 g / m² の範囲で投与する。B 細胞リンパ腫、例として非ホジキンリンパ腫患者の治療のための特定の実施態様では、本発明の抗 B R 3 抗体およびヒト化抗 B R 3 抗体は 10 mg / kg または 375 mg / m² の用量で患者に投与するであろう。N H L の治療のある用量投与計画では、治療の初めの 1 週間は 10 mg / kg の用量当たり抗体組成物一用量で投与し、2 週間の間隔の後、同量の第二用量抗体を投与する。一般に、N H L 患者は 1 年に 1 度リンパ腫の再発によってこのような治療を受けるが、このような治療は繰り返される。他の用量投与計画では、低程度 N H L 患者は 4 週間の抗 B R 3 抗体(週当たり 375 mg / m²)の後、5 週目には、3 追加投与過程の抗体 + C H O P(シクロフォスファミド、ドキソルビシン(doxorubicin)、ビンクリスチンおよびプレドニゾン)または C V P(シクロフォスファミド、ビンクリスチン、プレドニゾン)化学療法を 3 週ごとに 3 周期で投与する。

【 0 1 8 0 】

関節リウマチ治療の一実施態様では、抗 B R 3 抗体の用量範囲は 2 回の用量で 125 mg / m² (約 200 mg / 用量と当量) ~ 600 mg / m²、例として第 1 日目に初期用量 200 mg、その後第 15 日目には 200 mg の第二用量を投与する。異なる実施態様では、用量は 1 用量当たり 250 mg、275 mg、300 mg、325 mg、350 mg、375 mg、400 mg、425 mg、450 mg、475 mg、500 mg、525 mg、550 mg、575 mg、600 mg からなる群から選択される。

疾患の治療において、本発明の B R 3 結合抗体は疾患において医師によって決定されるように慢性的または間欠的に患者に投与する。

静脈注入または皮下中により薬剤を投与している患者は有害事象、例として熱、寒気、灼熱感、無力症、および頭痛を経験する。このような有害事象を軽減または最大限小さくするために、治療的用量に続いて初期調整用量の抗体を患者に投与する。調整用量はより多くの用量に耐えるように治療用量より少ないのである。

【 0 1 8 1 】

(1) A D C C 機能を欠くか野生型のヒト Ig G Fc を含んでなる抗体と比較して A D C C 機能を減弱している; (2) B A F F の B R 3 への結合を部分的でないしは完全に阻害する能力を欠く、又は(3) A D C C 機能を欠くか野生型のヒト Ig G Fc を含んでなる抗体と比較して A D C C 機能を減弱しており、B A F F の B R 3 への結合を部分的でないしは完全に阻害する能力を欠いている、本発明の B R 3 結合抗体は、例えば、B A F F 及び B R 3 結合を阻害して A D C C 機能を有する抗 B R 3 抗体による治療に有意な副作用を示すないしは示すことが予測される患者の置き換え療法、選択療法ないしは維持療法において有用であることが考慮される。例えば、患者は、B A F F 及び B R 3 結合を阻害して A D C C 機能を有する抗 B R 3 抗体にて始め治療され、その後(1) A D C C 機能を欠くか野生型のヒト Ig G Fc を含んでなる抗体と比較して A D C C 機能を減弱している; (2) B A F F の B R 3 への結合を部分的でないしは完全に阻害する能力を欠く、又は(3) A D C C 機能を欠くか野生型のヒト Ig G Fc を含んでなる抗体と比較して A D C C 機能を減弱しており、B A F F の B R 3 への結合を部分的でないしは完全に阻害する能力を欠いている抗 B R 3 抗体で治療されうることが考慮される。

【 0 1 8 2 】

投与経路

B R 3 結合抗体は、公知の方法、例えば静脈内投与、例としてボーラスまたは一定期間中の継続注入、皮下的、筋肉内、腹腔内、脳脊髄内、動脈血管内、滑膜内、クモ膜下腔内、または吸入、一般的には静脈内または皮下的投与によりヒト患者に投与される。

10

20

30

40

50

一実施態様では、抗 B R 3 抗体は注入溶媒として 0.9% 塩化ナトリウム溶液の静脈注入により投与される。他の実施態様では、抗 B R 3 抗体は予めシリングに充填させて投与される。

【 0 1 8 3 】

併用療法

この発明の B R 3 - 結合抗体ないしポリペプチドは、疾患を治療するために、第二治療薬と組み合わせて用いられる。第二治療薬なる用語は他の付加的な療法で被検体を治療することを除外するものではない。第二治療薬に対する用語は、用いられる特定の B R 3 - 結合抗体ないしポリペプチドと薬剤を区別するためのものである。一実施態様では、自己免疫性疾患又は癌のために B R 3 結合抗体ないしポリペプチドによって処置される患者は、生物学的応答調節剤(B R M)により同時に、連続的(前又は後)に、あるいは交互に処置して、多薬剤投与計画において疾患及び/又は感染と戦うための免疫系の能力を刺激するか回復することができる。 B R M には、モノクローナル抗体、例として、 T N F 又は I L -1 を標的とする抗体(例えばEnbrel(登録商標)、 Remicade(登録商標)及びHumira(登録商標))、インターフェロン、インターロイキン(例えば、 I L -2 、 I L -1 2)および様々なタイプのコロニー刺激因子(C S F 、 G M - C S F 、 G - C S F)が含まれる。例えば、 B R M は炎症性活動性を阻害して、関節損傷を減少させうる。

10

一実施態様では、第二治療剤は I A P インヒビターである。

他の実施態様では、自己免疫性疾患又は癌のために B R 3 結合抗体ないしポリペプチドによって処置される患者は、 B 細胞枯渇薬剤により同時に、連続的(前又は後)に、あるいは選択的に処置されうる。

20

一実施態様では、自己免疫性疾患又は癌のために B R 3 結合抗体によって処置される患者は、 B A F F アンタゴニストにより同時に、連続的(前又は後)に、あるいは選択的に処置されうる。

30

【 0 1 8 4 】

他の実施態様では、前述の癌及び腫瘍では、患者は、多薬剤投与計画において化学療法剤などの一又は複数の治療剤と組み合わせて本発明の B R 3 結合抗体で治療されうる。 B R 3 結合抗体は、化学療法剤と同時に、連続的(前又は後)に、あるいは交互に、又は他の療法で反応がないときに投与されうる。標準的なリンパ腫治療の化学療法は、シクロホスファミド、シタラビン(cytarabine)、メルファラン、ミトキサントロン(mitoxantrone) + メルファランを含む。 C H O P は非ホジキンリンパ腫治療の最も一般的な化学療法投与の一つである。 C H O P 投与に用いられる薬剤は以下のとおりである：シクロホスファミド(ブランド名シトキサン(cytosar)、ネオサル(neosar)); アドリアマイシン(ドキソルビシン/ヒドロキシドキソルビシン); ピンクリスチニン(オンコビン); および、プレドニゾロン(時々デルタゾン(Deltasone)またはオラゾン(Orasone)と呼ばれる)。特定の実施態様では、 C D 2 0 結合抗体は以下の化学療法剤、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ピンクリスチニン、およびプレドニゾロンの一またはそれ以上を組み合わせて必要とする患者に投与する。特定の実施態様では、リンパ腫患者(例として非ホジキンリンパ腫)は本発明の抗 B R 3 抗体を C H O P (シクロホスファミド、ドキソルビシン、ピンクリスチニン、およびプレドニゾン)療法と組み合わせて治療する。他の実施態様では、患者の癌又は腫瘍は本発明の B R 3 結合抗体を C V P (シクロホスファミド、ピンクリスチニン、およびプレドニゾン)化学療法と組み合わせて治療する。特定の実施態様では、 B R 3 陽性 N H L 患者は、ヒト化抗 B R 3 抗体を C V P と組み合わせて治療する。慢性リンパ球性白血病(C L L)治療の具体的な実施態様では、 B R 3 結合抗体は、一又は複数のヌクレオシド類似体、例えば、フルダラビン、Cladribine(2 -クロロデオキシアデノシン、 2 - C d A [ロイスタチン])、ペントスタチン(Nipent)とシクロホスファミドによる化学療法と組み合わせて投与される。

30

40

【 0 1 8 5 】

上述の自己免疫疾患または自己免疫関連症状の治療に、本発明の B R 3 結合抗体を第二治療剤、例として免疫抑制剤と組み合わせて、例として多剤投与計画で患者を処置する。

50

B R 3 結合抗体は連続的、同時、または化学療法剤と交代して、または他の治療に応答しないときに投与しうる。免疫抑制剤は分野常用と同じまたはより少ない用量で投与することが可能である。好適な免疫抑制剤は治療する疾患の型だけでなく患者の病歴を含めて多くの因子によるであろう。

【 0 1 8 6 】

補助剤療法についてここで用いられる「免疫抑制剤」は、患者の免疫系を抑制又はマスクするために作用する物質を意味する。このような薬剤には、サイトカイン生成を抑制する、自己抗原発現を下方制御又は抑制する、あるいはM H C 抗原をマスクする物質を含む。このような薬剤の例は、グルココルチコステロイド、例えばプレドニゾン、メチルプレドニゾロン、及びデキサメタゾンなどのステロイド；2 - アミノ - 6 - アリール - 5 - 置換ピリミジン(米国特許第4665077号参照)；アザチオプリン(アザチオプリンに抵抗性の場合はシクロホスファミド)、プロモクリプチン；グルタルアルデヒド(米国特許第4120649号に記載されているように、M H C 抗原をマスクする)；M H C 抗原及びM H C 断片に対する抗イディオタイプ抗体；シクロスボリンA；抗インターフェロン- 、- 又は- 抗体を含むサイトカイン又はサイトカインレセプターアンタゴニスト、抗腫瘍壞死因子-

抗体、抗腫瘍壞死因子- 抗体、抗インターロイキン- 2 抗体及び；抗 I L - 2 レセプター抗体；抗 L 3 T 4 抗体；異種性抗リンパ球グロブリン；全 T 抗体、好ましくは抗 C D 3 又は抗 C D 4 / C D 4 a 抗体；L F A - 3 結合ドメインを持つ可溶性ペプチド(1990年7月26日に公開された国際公開90/08187)；ストレプトキナーゼ；T G F - ；ストレプトドルナーゼ；宿主からのR N A 又はD N A ；F K 5 0 6 ；R S - 6 1 4 4 3 ；デオキシスペルグアリン(deoxyspergualin)；ラパマイシン(rapamycin)；T 細胞レセプター(米国特許第5114721号)；T 細胞レセプター断片(Offner等, Science, 251: 430-432 (1991)；国際公開90/11294；及び国際公開91/01133)；及びT 1 0 B 9 等のT 細胞レセプター抗体(欧州特許第340109号)を含む。

【 0 1 8 7 】

関節リウマチ治療に、本発明のB R 3 結合抗体を以下の薬剤のうちの一またはそれ以上と組み合わせて患者を治療する：D M A R D S(疾患変更姓抗リウマチ薬(例として、メトトレキセート))、N S A I またはN S A I D(非ステロイド性抗炎症薬)、HUMIRATM(アダリムマブ(adalimumab)；Abbott Laboratories)、ARAVA(登録商標)(レフノミド(leflunomide))、REMICADE(登録商標)(インフリキシマブ(infliximab)；Centocor Inc., of Malvern, Pa)、ENBREL(登録商標)(エターナルセプト(etanercept)；Immunex, WA)、COX-2阻害剤。一般にR A に用いられるD M A R D は、ヒドロキシクロロクイン(hydroxyclooroquine)、スルファサラジン、メトトレキサート、レフルノミド、エターナルセプト、インフリキシマブ、アザチオプリン、D ベニシラミン、ゴールド(Gold)(経口)、ゴールド(筋注)、ミノサイクリン、シクロスボリン、ブドウ球菌タンパク質A免疫吸着である。アダリムマブ(adalimumab)はT N F に結合するヒトモノクローナル抗体である。インフリキシマブはT N F に結合するキメラモノクローナル抗体である。エターナルセプトはヒトI g G 1 のF c 領域に結合するヒト75 k D (p75)腫瘍壞死因子受容体(T N F R)の細胞外リガンド結合部位からなる「免疫吸着」融合タンパク質である。R A の従来治療は、例として“Guidelines for the management of rheumatoid arthritis” Arthritis & Rheumatism 46(2): 328-346 (February, 2002)を参照。特定の実施態様では、R A 患者を本発明のB R 3 抗体をメトトレキセート(MTX)と組み合わせて治療する。M T X の例示的用量は、約7 . 5 - 2 5 m g / k g / w k である。M T X は経口および皮下的ににより投与される。

【 0 1 8 8 】

硬直性脊椎炎、乾癬性関節炎およびクローン病の治療には、本発明のB R 3 結合抗体を、例としてRemicade(登録商標)(インフリキシマブ；Centocor Inc., of Malvern, Pa より)、ENBREL(登録商標) (エターナルセプト；Immunex, WA)と組み合わせて患者を治療する。

S L E の治療には高用量副腎皮質ステロイドおよび/またはシクロスファミド(HDCC)を含む。

10

20

30

40

50

乾癬治療には、B R 3 結合抗体を局所的治療、例として局所的ステロイド、アンスラリン、カルシポトリエン、およびタザロテン、またはメトレキセート、レチノイド、シクロスボリン、PUVA および UVB 治療と組み合わせて患者を治療する。一実施態様では、乾癬患者はシクロスボリンに続いてまたはシクロスボリンと同時に B R 3 結合抗体を用いて治療する。

【0189】

治療的剤形

本発明に使用される B R 3 結合抗体の治療的剤形は、所望の純度を有する抗体を選択的に薬剤的許容可能な担体、賦形剤、安定剤と混合して凍結乾燥の剤形または液状溶液の形態の貯蔵に適するものである(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Oso I, A. Ed. (1980))。許容可能な担体、賦形剤、又は安定化剤は、用いられる用量及び濃度で受容者に非毒性であり、リン酸、クエン酸、及び他の有機酸などのバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；防腐剤(オクタデシルジメチルベンジルアシモニウムクロライド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンズアルコニウムクロライド；ベンズエトニウムクロライド；フェノール；ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサンオール；3-ペンタノール；及びm-クレゾールなど)；低分子量(約10残基未満)ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物EDTA等のキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトールなどの糖；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質錯体)又はトゥイーン(TWEEN)(商品名)、プルロニクス(PLURONICS)(商品名)、及びポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。

【0190】

例示的抗 B R 3 抗体の剤形は国際公開公報98/56418に記載されており、参考としてここに組み込まれる。他の剤形は液状の多用量剤形であり、2-8で2年間の最小限の貯蔵期間を持つように抗 B R 3 抗体 4.0 mg / mL、2.5 mM 酢酸塩、1.50 mM ロレハロース、0.9% ベンジルアルコール、pH 5.0 の 0.02% ポリソルベート 20 を含むものである。目的の他の抗 B R 3 剤形は、1.0 mg / mL の抗体、9.0 mg / mL 塩化ナトリウム、7.35 mg / mL クエン酸ナトリウム二水和物、0.7 mg / mL ポリソルベート 80、および注入用の滅菌水を含む pH 6.5 のものである。さらに、他の液状医薬剤形は、約 pH 4.8 ~ 約 pH 5.5、好ましくは pH 5.5 の 1.0 - 3.0 mM 酢酸ナトリウム、約 0.01 - 0.1% v / v 量の界面活性剤としてのポリソルベート、約 2 - 1.0% w / v 量のトレハロース、保存剤としてのベンジルアルコール(米国特許第6171586号)を含む。凍結乾燥剤形は国際公開公報97/04801に記載されるように、皮下的投与に適する。そのような凍結乾燥剤形は適当な希釈剤で高いタンパク質濃度に再編成されるかもしれない、また再編成された剤形はここで治療される哺乳動物に皮下注射される。

【0191】

ヒト化抗 B R 3 抗体の一剤形は、pH 5.8 の 1.0 mM ヒスチジン、6% ショ糖、0.02% ポリソルベート 20 中の抗体 1.2 - 1.4 mg / mL である。

特定の実施態様では、抗 B R 3 抗体および特に 9.1 RF、9.1 RF (N434 变異体)、又は V3-46 は、pH 5.8 の 1.0 mM ヒスチジン硫酸塩、6.0 mg / mL ショ糖、0.2 mg / mL ポリソルベート 20、および注入用の滅菌水中の抗体 2.0 mg / mL である。

また、ここでの剤形は治療を特異的に示すために必要な一以上の活性化合物、好ましくはお互い負に作用しない相補的活性を持つものを含みうる。例として、さらに細胞障害性剤、化学療法剤、サイトカインまたは免疫抑制剤(例として、シクロスボリンまたは T 細胞結合抗体、例として LFA-1 に結合するもの等の T 細胞作用性のもの)を提供すること

10

20

30

40

50

が望まれる。そのような多剤の有効量は剤形が存在する抗体量、疾患または疾病または治療の型、および上述した他の因子に依存する。これらは一般に同じ用量およびここに示した投与経路またはここで用いられる用量の1~99%量で用いられる。

【0192】

また、活性成分は、例としてコアセルベーション技術または界面重合化により調製したマイクロカプセル、例として、個々のコロイド状のドラッグデリバリーシステム(例として、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル)またはマクロエマルジョン中のヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ(メチルメタサイクリン)マイクロカプセル中に包まれているかもしれない。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

持続性徐放剤が調製される。持続性徐放剤の好適な例は、アンタゴニストを含む固体疎水性ポリマーの準透過性基質を含むものであり、基質は、造形品、例としてフィルム、またはマイクロカプセルの形である。持続性徐放基質の例として、ポリエステル、ヒドロゲル(例えは、ポリ(2ヒドロキシエチル-メタクリレート)、またはポリ(ビニルアルコール)、ポリ乳酸(米国特許3773919), L-グルタミン酸およびエチルL-グルタミン酸の共重合体、非分解性のエチレンビニール酢酸塩、分解性の乳酸グリコール酸共重合体、例としてLUPRON DEPOTTM(乳酸-グリコール酸共重合体およびロイプロリド酢酸塩で構成された注入可能ミクロスフェア)、およびポリD-(-)-3ヒドロキシブチリン酸を含む。

インビボ投与に用いる剤形は無菌でなければならない。これは滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成できる。

【0193】

製造品およびキット

本発明の他の実施態様は、自己免疫性疾患および関連症状およびBR3陽性癌、例えは非ホジキンリンパ腫の治療に有用な材料を含む製造品である。本発明の更なる他の実施態様は、免疫不全性疾患の治療に有用な材料を含んでなる製造品である。製造品は、容器とラベルまたは容器上にあるまたは容器に付属するパッケージ挿入物を含む。好適な容器は、例としてボトル、バイアル、シリンジ等を含む。容器はガラス又はプラスチックなどの様々な材料から形成されうる。容器は、症状の治療に有効な組成物を収容し、無菌のアクセスポートを有し得る(例えは、容器は皮下注射針による穴あきストッパーを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルであつてよい)。組成物中の少なくとも一の活性剤は本発明のBR3結合抗体である。ラベルまたはパッケージ挿入物は、組成物が特定の症状の治療のために使用されることを示している。さらに、ラベルまたはパッケージ挿入物は抗体組成物の患者への投与についての説明を含むであろう。本明細書中に記載の併用用治療法を含む製造品及びキットも包含される。

パッケージ挿入物は治療的製造品の商用パッケージに含まれる慣例的な説明書を示しており、効能、使用法、用量、投与法、禁忌および/または医薬製品に関する警告についての情報を含む。一実施態様では、パッケージ挿入物は、組成物が非ホジキンリンパ腫の治療に有用である。

【0194】

加えて、さらに製造品は、薬学的に許容可能な緩衝液、例として注射用静菌水(BWF)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、およびブドウ糖溶液を含む第二容器を含みうる。さらに、商業的および消費者視点で望まれる他の材料、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、およびシリンジを含みうる。

キットもまた様々な目的、例としてB細胞死滅分析に、アポトーシスアッセイのポジティブコントロールとして、細胞からのBR3の精製または免疫沈降に有用である。BR3を単離および精製するために、キットにビーズ(例としてセファロースビーズ)に結合した抗BR3抗体を含めることができる。インビトロでBR3を検出および定量する、例としてELISAまたはウェスタンプロット法のための抗体を含むキットが提供される。製造品として、キットは容器およびラベルまたは容器上または容器に付随したパッケージ挿入

10

20

30

40

50

物を含む。容器は本発明の少なくとも一の抗 B R 3 抗体を含む組成物を有する。付加的容器には、例として希釈剤および緩衝液、対照抗体を包含しうる。ラベルまたはパッケージ挿入物は組成物の解説と同様にインピトロまたは診断的使用を意図した指示書も含みうる。

【 0 1 9 5 】

モノクローナル抗体

抗 B R 3 抗体はモノクローナル抗体であってもよい。モノクローナル抗体は、Kohler及びMilstein, *Nature*, 256:495 (1975) に記載されているようなハイブリドーマ法を用いるなどして調製する、又は組み換え D N A 法(米国特許第4,816,567号)により作製する、又は実施例の項目に記載の方法によって生成することができる。ハイブリドーマ法では、マウス、ハムスター又は他の適切な宿主動物を典型的には免疫剤により免疫化することで、免疫剤に特異的に結合する抗体を生成するか或いは生成可能なリンパ球を誘発する。或いは、リンパ球をインピトロで免疫化することもできる。

免疫剤は、典型的には対象とする B R 3 ポリペプチド又はその融合タンパク質を含む。一般にヒト由来の細胞が望まれる場合には末梢血リンパ球(「 P B L 」)が使用され、或いは非ヒト哺乳動物源が望まれている場合は、脾臓細胞又はリンパ節細胞が使用される。次いで、ポリエチレンギリコール等の適当な融合剤を用いてリンパ球を不死化株化細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する [Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, New York, Academic Press, (1986) pp. 59-103]。不死化株化細胞は、通常は、形質転換した哺乳動物細胞、特に齧歯動物、ウシ、及びヒト由来の骨髄腫細胞である。通常、ラット又はマウスの骨髄腫株化細胞が使用される。ハイブリドーマ細胞は、好ましくは、未融合の不死化細胞の生存又は成長を阻害する一又は複数の物質を含有する適切な培地で培養される。例えば、親細胞が、酵素のヒポキサンチングアミニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(H G P R T 又は H P R T)を欠いていると、ハイブリドーマの培地は、典型的には、ヒポキサチニン、アミノブチリン及びチミジンを含み(「 H A T 培地」)、この物質が H G P R T 欠乏性細胞の増殖を阻止する。

【 0 1 9 6 】

好ましい不死化株化細胞は、効率的に融合し、選択された抗体生成細胞による安定した高レベルの抗体発現を支援し、 H A T 培地のような培地に対して感受性である。より好ましい不死化株化細胞はマウス骨髄腫株であり、これは例えばカリフォルニア州サンディエゴのSalk Institute Cell Distribution Centerやメリーランド州ロックビルのアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションより入手可能である。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髄腫及びマウス-ヒト異種骨髄腫株化細胞も開示されている [Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)、Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63]。

次いでハイブリドーマ細胞が培養される培養培地を、 B R 3 ポリペプチドに対するモノクローナル抗体の存在について検定する。好ましくは、ハイブリドーマ細胞によって生成されたモノクローナル抗体の結合特異性は免疫沈降又はラジオイムノアッセイ(R I A)や酵素結合免疫測定法(E L I S A)等のインピトロ結合検定法によって測定する。このような技術及びアッセイは、当該分野において公知である。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunson及びPollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)によるスキヤッチャード解析法によって測定することができる。

【 0 1 9 7 】

所望のハイブリドーマ細胞が同定された後、クローンを限界希釈法によりサブクローンングし、標準的な方法で成長させることができる [Goding, 上掲]。この目的のための適当な培地には、例えば、ダルベッコの変更イーグル培地及び R P M I - 1 6 4 0 倍地が含まれる。或いは、ハイブリドーマ細胞は哺乳動物においてインビボで腹水として成長させることもできる。

サブクローンによって分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテイン A - セファロース法、ヒドロキシルアバタイトクロマトグラフィー法、ゲル電気泳動法、透析法又は

10

20

30

40

50

アフィニティークロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製方法によって培養培地又は腹水液から単離又は精製される。

【0198】

また、モノクローナル抗体は、組換えDNA法、例えば米国特許第4,816,567号に記載された方法により作製することができる。本発明のモノクローナル抗体をコードするDNAは、常套的な方法を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用して)、容易に単離し配列決定することができる。本発明のハイブリドーマ細胞はそのようなDNAの好ましい供給源となる。ひとたび単離されたら、DNAは発現ベクター内に配することができ、これが宿主細胞、例えばサルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、或いは免疫グロブリンタンパク質を生成等しない骨髄腫細胞内に形質移入され、組換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成をすることができる。また、DNAは、例えば相同マウス配列に換えてヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード配列を置換することにより[米国特許第4,816,567号; Morrison等, 上掲]、又は免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の一部又は全部を共有結合することにより修飾することができる。このような非免疫グロブリンポリペプチドは、本発明の抗体の定常ドメインに置換でき、或いは本発明の抗体の一つの抗原結合部位の可変ドメインに置換でき、キメラ性二価抗体を生成する。

抗体は一価抗体であってもよい。一価抗体の調製方法は当該分野においてよく知られている。例えば、一つの方法は免疫グロブリン軽鎖と修飾重鎖の組換え発現を含む。重鎖は一般的に、重鎖の架橋を防止するようにFc領域の任意の点で切断される。或いは、関連するシステイン残基を他のアミノ酸残基で置換するか欠失させて架橋を防止する。

一価抗体の調製には、同じくインビトロ法が適している。抗体の消化による、その断片、特にFab断片の生成は、当該分野において知られている慣用的技術を使用して達成が可能である。

【0199】

ヒトおよびヒト化抗体

抗BR3抗体は、更にヒト化抗体又はヒト抗体を含む。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形とは、キメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖或いはその断片(例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂或いは抗体の他の抗原結合サブ配列)であって、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むものである。ヒト化抗体はレシピエントの相補性決定領域(CDR)の残基が、マウス、ラット又はウサギのような所望の特異性、親和性及び能力を有する非ヒト種(ドナー抗体)のCDRの残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)を含む。幾つかの例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基は、対応する非ヒト残基によって置換されている。また、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、移入されたCDRもしくはフレームワーク配列にも見出されない残基を含んでいてもよい。一般に、ヒト化抗体は、全て或いはほとんど全てのCDR領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全て或いはほとんど全てのFR領域がヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインの実質的に全てを含む。好ましくは、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域(Fc)、典型的にはヒトの免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部を含んでなる[Jones等, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann等, Nature, 332:323-329 (1988); 及びPresta, Curr. Op Struct. Biol., 2:593-596 (1992)]。

【0200】

非ヒト抗体をヒト化する方法には当分野及び以下の実施例に記載されるものがある。一般的に、ヒト化抗体には非ヒト由来の一つ又は複数のアミノ酸残基が導入される。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。一実施態様では、ヒト化は基本的に齧歯動物のCDR又はCDR配列でヒト抗体の該当する配列を置換することによりウィンター(Winter)及び共同研究者[Jonesら, Nature, 321:522-525 (1986); Riechmannら, Nature, 332:323-327 (1988); Verh

oeyenら, *Science*, 239:1534-1536 (1988)] の方法に従って、齧歯類 CDR 又は CDR 配列をヒト抗体の対応する配列に置換することにより実施される。よって、このような「ヒト化」抗体は、原型のヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の対応する配列で置換された抗体(米国特許第4,816,567号)である。実際には、ヒト化抗体は典型的には幾つかの CDR 残基及び場合によっては幾つかの FR 残基が齧歯類抗体の類似する部位からの残基によって置換されたヒト抗体である。

【0201】

ヒト化の別法として、ヒト抗体を生成することができる。例えば、現在では、免疫化することで、内因性免疫グロブリンの產生がなく、ヒト抗体の全レパートリーを產生することができるトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作ることが可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系突然変異体マウスにおける抗体重鎖結合領域(JH)遺伝子のホモ接合体欠失によって、結果として内因性抗体產生の完全な阻害が起こることが説明されてきた。ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子配列の、このような生殖細胞系突然変異体マウスへの転移によって、結果として抗原投与時にヒト抗体の產生が起こる。Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993) ; Jakobovits等, *Nature* 362:255-258 (1993) ; Bruggeman等, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993) ; 米国特許第5545806号、同5569825号、同5591669号(全てジェンファーム(GenPharm)) ; 同5545807号 ; 及び国際公開第97/17852号を参照。あるいは、ヒト抗体はヒト免疫グロブリン座位をトランスジェニック動物、例えば内在性免疫グロブリン遺伝子は部分的又は完全に不活性化されたマウスに導入することにより產生することができる。投与の際に、遺伝子再配列、組立、及び抗体レパートリーを含むあらゆる観点においてヒトに見られるものに非常に類似しているヒト抗体の生産が観察される。このアプローチは、例えば米国特許第5,545,807号 ; 同第5,545,806号 ; 同第5,569,825号 ; 同第5,625,126号 ; 同第5,633,425号 ; 同第5,661,016号、及び次の科学文献 : Marks等, *Bio/Technology* 10, 779-783 (1992) ; Lonberg等, *Nature* 368 856-859 (1994) ; Morrison, *Nature* 368, 812-813 (1994) ; Fishwild等, *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996) ; Neuberger, *Nature Biotechnology* 14, 826 (1996) ; Lonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13 65-93 (1995) に記載されている。

【0202】

別法として、ファージディスプレイ技術(McCafferty等, *Nature* 348 : 552-553[1990])を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロでヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術の一実施態様によれば、抗体Vドメイン配列を、フレーム単位で、纖維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの主要又は微量コートタンパク質遺伝子のどちらかでクローンし、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。ファージディスプレイは多様な形式で行うことができる ; 例えば、以下の実施例の項目に記載のもの、又はJohnson, Kevin S. 及びChiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3 : 564-571(1993)を参照。V-遺伝子セグメントのいくつかの供給源を、ファージディスプレイのために使用できる。Clackson等, *Nature*, 352 : 624-628(1991)は、免疫化したマウス脾臓由来のV遺伝子の小さいランダムなコンビナトリアルライブラリーから、多様で多くの抗-オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーのV遺伝子のレパートリーが構成可能であり、多様で多くの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体は、Marks等, *J. Mol. Biol.* 222 : 581-597(1991)、又はGriffith等, *EMBO J.* 12 : 725-734(1993)に記載の技術にそのまま従うことで単離することができる。また、米国特許第5565332号及び同5573905号を参照のこと。

【0203】

上述したように、ヒト抗体はインビトロで活性化したB細胞により產生することができる(米国特許第5567610号及び同5229275号)。

また、ヒト抗体は、ファージ表示ライブラリーを含むこの分野で知られた種々の方法を用いて作製することもできる。Hoogenboom及びWinter, *J. Mol. Biol.*, 227:381(1991) ; Marks等, *J. Mol. Biol.*, 222:381 (1991)。また、Cole等及びBoerner等の方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製に利用することができる。Cole等, *Monoclonal Antibodies and*

10

20

30

40

50

Cancer Therapy, Alan R. Liss. p.77 (1985) 及びBoerner等, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)。

【0204】

多特異性抗B R 3 抗体

多特異性抗体は、少なくとも二つの異なる抗原に対して結合特異性を有するモノクローナル抗体、好ましくはヒトもしくはヒト化抗体(例えば、少なくとも2つの抗原に対して結合特異性を有する二重特異性抗体)である。例えば、結合特異性の一方はB R 3 ポリペプチドに対するものあり、他方は任意の他の抗原に対するものである。好適な一実施態様では、他の抗原は、細胞表面タンパク質又はレセプター又はレセプターサブユニットである。例えば、細胞表面タンパク質はナチュラルキラー(N K)細胞レセプターでありうる。そして、一実施態様によると、本発明の二重特異性抗体はB R 3に結合して、N K細胞に結合し、場合によってはN K細胞を活性化することができる。

二重特異性抗体を作製する方法の例は当該技術分野において周知である。伝統的には、二重特異性抗体の組換え生産は、二つの重鎖が異なる特異性を持つ二つの免疫グロブリン重鎖/軽鎖対の同時発現に基づく [Milstein及びCuello, Nature, 305:537-539 (1983)]。免疫グロブリンの重鎖と軽鎖を無作為に取り揃えるため、これらハイブリドーマ(クアドローマ)は10種の異なる抗体分子の潜在的混合物を生成し、その内の一種のみが正しい二重特異性構造を有する。正しい分子の精製は、アフィニティーコロマトグラフィー工程によって通常達成される。同様の手順が1993年5月13日公開の国際公開公報93/08829、及びTraunecker等, EMBO J., 10:3655-3656 (1991)に開示されている。

10

20

30

40

【0205】

所望の結合特異性(抗体-抗原結合部位)を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合できる。融合は、好ましくは少なくともヒンジ部、C H 2 及びC H 3 領域の一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとのものである。少なくとも一つの融合には軽鎖結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域(C H 1)が存在することが望ましい。免疫グロブリン重鎖融合をコードするD N A、及び望むのであれば免疫グロブリン軽鎖を、別々の発現ベクターに挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。二重特異性抗体を作製するための更なる詳細については、例えばSuresh等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986)を参照されたい。

【0206】

また、組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作製し分離する様々な方法が記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産されている。Kostelny等, J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992)。F o s 及びJ unタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合させる。抗体ホモダイマーをヒンジ領域で還元してモノマーを形成し、ついで再酸化して抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, Proc.Natl.Acad.Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作製する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の二つのドメイン間の対形成を可能にするには十分に短いリンカーによりV L にV H を結合してなる。従って、一つの断片のV H 及びV L ドメインは他の断片の相補的V L 及びV H ドメインと強制的に対形成させられ、二つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v (s F v)ダイマーの使用により二重特異性抗体断片を製造する他の方策もまた報告されている。Gruber等, J. Immunol. 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等, J. Immunol. 147:60 (1991)。

【0207】

ヘテロコンジュゲート抗体

ヘテロコンジュゲート抗体は、二つの共有結合した抗体からなる。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせるため [米国特許第4,676,980号] 及びH I V 感染の治療のために [W091/00360; W092/200373; EP03089] 提案され

50

ている。この抗体は、架橋剤に関連したものを含む合成タンパク化学における既知の方法を使用して、インビトロで調製することができると考えられる。例えば、ジスルフィド交換反応を使用するか又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を作製することができる。この目的に対して好適な試薬の例には、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチリミデート、及び例えば米国特許第4,676,980号に開示されたものが含まれる。

【0208】

エフェクター機能の加工

本発明の抗体をエフェクター機能について改変し、例えば癌治療における抗体の有効性を向上させることができが望ましい。例えば、システイン残基を Fc 領域に導入し、それにより、この領域に鎖間ジスルフィド結合を形成するようにしてもよい。そのようにして生成された同種二量体抗体は、向上した内部移行能力及び/又は増加した補体媒介細胞殺傷及び抗体-依存性細胞性細胞障害性(ADC)を有する可能性がある。Caron 等, *J. Exp. Med.* 176: 1191-1195 (1992) 及び Shope, *J. Immunol.* 148: 2918-2922 (1992) 参照。また、向上した抗腫瘍活性を持つ同種二量体抗体は、Wolff 等, *Cancer research* 53: 2560-2565 (1993) に記載されている異種二官能性架橋を用いて調製することができる。或いは、抗体は、二つの Fc 領域を有するように加工して、それにより補体溶解及び ADC 能力を向上させることもできる。Stevenson 等, *Anti-Cancer Drug Design* 3: 219-230 (1989) 参照。

【0209】

Fc 配列内を変異又は変更して、FcR 結合を改善することができる(例えば FcR 、 FcRn)。ある実施態様では、本発明の抗体は、天然の IgG 又は親抗体と比較して、 ADC 、 CDC 及び改善した FcRn 結合からなる群から選択される少なくとも一のエフェクター機能を変更している。いくつかの有用な特定の変異の例は、例えば Shields, RL et al. (2001) *JBC* 276(6):6591-6604 ; Presta, L.G., (2002) *Biochemical Society Transactions* 30(4):487-490 ; 及び国際公開公報 00/42072 に記載される。

ある実施態様では、Fc レセプター変異は、Fc 領域内の残基の番号付けが EU 番号付けシステムに従った場合、Fc 領域の 238 、 239 、 246 、 248 、 249 、 252 、 254 、 255 、 256 、 258 、 265 、 267 、 268 、 269 、 270 、 272 、 276 、 278 、 280 、 283 、 285 、 286 、 289 、 290 、 292 、 293 、 294 、 295 、 296 、 297 、 298 、 301 、 303 、 305 、 307 、 309 、 312 、 315 、 320 、 322 、 324 、 326 、 327 、 329 、 330 、 331 、 332 、 333 、 334 、 335 、 337 、 338 、 340 、 360 、 373 、 376 、 378 、 382 、 388 、 389 、 398 、 414 、 416 、 419 、 430 、 434 、 435 、 437 、 438 及び 439 からなる群から選択される何れか一の位置の置換である。ある特定の実施態様では、置換が、N434A 、 N434F 、 N434Y 、 N434H からなる群から選択される 434 残基の置換である。他の実施態様では、置換は、D265A / N297A 变異である。他の実施態様では、置換は、S298A / E333A / K334A 又は S298A / K326A / E333A / K334A である。他の実施態様では、置換は K322A である。

天然配列のヒト IgG Fc 領域配列の例である、humIgG1 (非 A 及び A アロタイプ) (それぞれ配列番号 133 及び 135) 、 humIgG2 (配列番号 136) 、 humIgG3 (配列番号 137) 及び humIgG4 (配列番号 138) が既に記載されている。天然配列のマウス IgG Fc 領域配列の例である、 murIgG1 (配列番号 139) 、 murIgG2A (配列番号 140) 、 murIgG2B (配列番号 141) 及び murIgG3 (配列番号 142) も既に記載されている。

【0210】

免疫コンジュゲート

また、本発明は、化学治療薬、毒素(例えば、細菌、真菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)などの細胞障害性薬、或いは放射性同位体(即ち、放射性コンジュゲート)と抱合している抗体を含む免疫複合体に関する。

10

20

30

40

50

このような免疫複合体の生成に有用な化学治療薬を上に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカナ(Phytolaca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crotin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(trichothecene)が含まれる。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、²¹²Bi、¹³¹I、¹³¹In、⁹⁰Y、及び¹⁸⁶Reが含まれる。

10

【0211】

抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオネート(SPD P)、イミノチオラン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートHCL等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスペレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作製できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitettaら、Science 238:1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である。WO94/11026参照。

20

他の実施態様では、腫瘍の予備標的化で使用するために、抗体は「レセプター」(ストレプトアビジン等)に抱合されてもよく、抗体-レセプター複合体は患者に投与され、次いで清澄化剤を用いて未結合複合体を循環から除去し、次に細胞障害性薬(例えば、放射性ヌクレオチド等)に抱合された「リガンド」(アビジン等)を投与する。

30

【0212】

免疫リポソーム

また、ここに開示する抗体は、免疫リポソームとして調製してもよい。抗体を含むリポソームは、Epsteinら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:3688 (1985); Hwang等、Proc. natl. Acad. Sci. USA, 77:4030 (1980); 及び米国特許第4,485,045号及び第4,544,545号に記載されたような、この分野で知られた方法で調製される。向上した循環時間を持つリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール及びPEG-誘導ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物での逆相蒸発法によって生成される。リポソームは、所定サイズのフィルターを通して押し出され、所望の径を有するリポソームが生成される。本発明の抗体のFab'断片は、Martin等、J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982)に記載されているように、ジスルフィド交換反応を介してリポソームに抱合され得る。化学治療薬(ドキソルビシン等)は、場合によってはリポソーム内に包含される。Gabizon等、J. National Cancer Inst. 81(19) 1484 (1989)参照。

40

【0213】

抗体およびポリペプチドの製薬的組成物

ここに記載のBR3ポリペプチドに特異的に結合する抗体、並びに上記に開示したスクリーニングアッセイで同定された他の分子は、上記及び下記に記載のような様々な疾患の治療のために、製薬組成物の形態で投与することができる。

また、リポフェクション又はリポソームを、本発明のポリペプチド及び抗体又は組成物を細胞に導入するために利用することができる。抗体断片が用いられる場合には、標的タ

50

ンパク質の結合ドメインに特異的に結合する最小阻害断片が好ましい。例えば、抗体の可変領域配列に基づいて、標的タンパク質配列に結合する能力を保持するペプチド分子を設計することができる。このようなペプチドは、化学的に合成でき及び／又は組換えDNA技術によって生成できる。例えば、Marasco等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 7889-7893 (1993) 参照。

ここでの製剤は、治療すべき特定の疾患に必要な場合に一つ以上の活性化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を持つものも含んでよい。或いは、又はそれに加えて、組成物は、例えば細胞障害性剤、化学療法剤又は成長阻害剤などのその機能を亢進する薬剤を含んでもよい。これらの分子は、適切には、意図する目的に有効な量の組み合わせで存在する。

10

【0214】

また、活性成分は、例えばコアセルベーション技術により又は界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えば、各々ヒドロキシメチルセルロース又はゼラチン-マイクロカプセル及びポリ(メタクリル酸メチル)マイクロカプセル中、コロイド状薬物送達系(例えば、リポソーム、アルブミン小球、マイクロエマルション、ナノ粒子及びナノカプセル)中、又はマイクロエマルション中に包括されていてもよい。これらの技術は、Remington's Pharmaceutical Science、上掲に開示されている。

インピボ投与に使用される製剤は無菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通した濾過により容易に達成される。

20

【0215】

徐放性製剤を調製してもよい。徐放性製剤の好適な例は、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスを含み、このマトリクスは成形された物品、例えばフィルム、又はマイクロカプセルの形状である。除放性マトリクスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)又はポリ(ビニルアルコール)、ポリラクチド(米国特許第3,773,919号)、L-グルタミン酸と-D-エチル-L-グルタマートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、LUPRON DEPOT(商品名)(乳酸-グリコール酸コポリマーと酢酸リュープロリドからなる注射可能なマイクロスフェア)等の分解性乳酸-グリコール酸コポリマー、ポリ-(D)-3-ヒドロキシブチル酸を含む。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸などのポリマーは分子を100日に亘って放出することができるが、ある種のヒドロゲルはより短時間でタンパク質を放出してしまう。カプセル化された抗体が身体内に長時間残ると、それらは37℃の水分に露出されることにより変性又は凝集し、その結果、生物学的活性の低下及び起こりうる免疫原性の変化をもたらす。合理的な方法は、含まれる機構に依存する安定化について工夫することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換を通した分子間S-S結合形成であると発見された場合、安定化はスルフヒドリル残基の修飾、酸性溶液からの凍結乾燥、水分含有量の制御、適切な添加剤の付加、及び特異的ポリマーマトリクス組成物の開発によって達成されうる。

30

【0216】

診断への使用と画像法

B R 3 に特異的に結合する標識した抗体、及びその誘導体及び類似体を、本発明のポリペプチドの発現、異常な発現及び／又は活性に関する疾患及び／又は疾病を検出、診断ないしモニターするための診断用の目的に用いることができる。ある好適な実施態様では、被検体へ抗 B R 3 抗体を注入することを伴う診断用アッセイ又は画像アッセイに用いられる抗 B R 3 抗体は、B A F F と B R 3 との相互作用をブロックしないか、B A F F と B R 3 との相互作用を部分的にしかブロックしない抗体である。本発明は、(a)本発明の一又は複数の抗体を用いて、個体の細胞ないし体液中における B R 3 ポリペプチドの発現をアッセイすること及び(b)標準の遺伝子発現レベルと遺伝子発現のレベルを比較することを含み、これによって標準の発現レベルと比較してアッセイした遺伝子の発現が増加しているか減少しているかによって異常な発現が示される、B R 3 ポリペプチドの異常な発現の検出方法を提供する。

40

50

【0217】

本発明は、(a)本発明の抗体を用いて、個体の細胞ないし体液中におけるB R 3ポリペプチドの発現をアッセイすること、(b)個体の細胞ないし体液中におけるB A F Fポリペプチドの発現をアッセイすること、及び(c)標準の遺伝子発現レベルとB A F F遺伝子発現のレベルを比較することを含み、これによって標準の発現レベルと比較してアッセイしたB A F F遺伝子の発現が増加しているないしは減少していることと、体液ないし患部組織中にB R 3ポリペプチドが存在することから、抗B R 3抗体ないしポリペプチドで治療されるべき疾患が示される、本発明の抗B R 3抗体ないしポリペプチドで治療されるべき疾患を診断するための診断用アッセイを提供する。癌に関して、個体の生検組織におけるB R 3の存在ないし相対的に高い量のB R 3転写から、疾患を起こしうる素因が示されうるか、ないしは実際の臨床症状の出現に先立って疾患を検出する方法が提供されうる。保健専門家は、この種のより信頼のにおける診断により早期の予防対策や積極的な治療を行って、癌の発達ないしは更なる進行を予防することができうる。

10

【0218】

本発明の抗体を、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いて生体試料中のタンパク質のレベルをアッセイするために用いることができる(例として、Jalkanen, 等, *J. Cell. Biol.* 101:976-985 (1985); Jalkanen, 等, *J. Cell. Biol.* 105:3087-3096 (1987)を参照)。タンパク質遺伝子発現を検出するために有用な他の抗体ベースの方法には、イムノアッセイ、例えば酵素結合免疫測定法(ELISA)及び放射性免疫測定法(RIA)が含まれる。好適な抗体アッセイ標識は当分野で公知であり、酵素標識、例えばグルコースオキシダーゼ；放射性同位体、例えばヨウ素(¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I)、炭素(¹⁴C)、イオウ(³⁵S)、トリチウム(³H)、インジウム(^{115m}In, ^{113m}In, ¹¹²In, ¹¹¹In)、及びテクネチウム(⁹⁹Tc, ^{99m}Tc)、タリウム(²⁰¹Ti)、ガリウム(⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga)、パラジウム(¹⁰³Pd)、モリブデン(⁹⁹Mo)、キセノン(¹³³Xe)、フッ素(¹⁸F)、¹⁵³Sm、¹⁷⁷Lu、¹⁵⁹Gd、¹⁴⁹Pm、¹⁴⁰La、¹⁷⁵Yb、¹⁶⁶Ho、⁹⁰Y、⁴⁷Sc、¹⁸⁶Re、¹⁸⁸Re、¹⁴²Pr、¹⁰⁵Rh、⁹⁷Ru；ルミノール；及び蛍光標識、例えばフルオレセイン、ローダミン及びビオチンが含まれる。

20

当分野で公知の技術は、本発明の抗体を標識するために応用してもよい。このような技術には、限定するものではないが、二官能性のコンジュゲート剤の使用が含まれる(例として、米国特許第5,756,065号；同第5,714,631号；同第5,696,239号；同第5,652,361号；同第5,505,931号；同第5,489,425号；同第5,435,990号；同第5,428,139号；同第5,342,604号；同第5,274,119号；同第4,994,560号；及び同第5,808,003号；この各々の内容は出典明記によって本明細書中に組み込まれる)。

30

【0219】

動物、好ましくは哺乳動物及び最も好ましくはヒトにおいてB R 3分子の発現又は異常な発現が関与する疾患ないし疾病的診断は、哺乳動物においてB R 3分子を検出する工程を含みうる。ある実施態様では、診断は、(a)それぞれ、B R 3分子に特異的に結合する標識した抗B R 3抗体ないしポリペプチドの有効量を哺乳動物に(例えば非経口的、皮下的、腹膜内)投与すること；(b)B R 3分子が発現される被検体内の部位に標識した分子が優先的に濃縮するように(また、結合していない標識分子がバックグラウンドレベルにまで除去されるように)、投与後一定期間をおくこと；(c)バックグラウンドレベルを測定すること；及び(d)被検体内の標識した分子を検出することを含み、バックグラウンドレベル以上に標識した分子が検出されれば、該被検体がB R 3の発現ないし異常発現に関する特定の疾患ないし疾病を有することが示される。バックグラウンドレベルは、様々な方法、例えば特定のシステムについて既に測定された標準値と検出された標識分子との量を比較することによって決定することができる。具体的な実施態様では、本発明の抗体を用いて、B細胞系統の細胞又は単核細胞系統の細胞の濃度を定量又は定性化する。

40

【0220】

ある具体的な実施態様では、B R 3ポリペプチド発現又は過剰発現は、細胞の表面上に存在するかないしは細胞から分泌されるB R 3のレベルを(例えば、抗B R 3抗体ないし

50

抗 B A F F 抗体を用いた免疫組織学的アッセイ； F A C S アッセイなどをによって)評価することによる診断用アッセイないし予後アッセイにおいて測定される。あるいは又は加えて、 B R 3 コード核酸ないしその相補体に対応する核酸ベースのプローブを用いた蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH；1998年10月に公開の国際公開公報98/45479)、サザンプロットティング、ノーザンプロットティング、又はリアルタイム定量 P C R (R T - P C R)などのポリメラーゼ連鎖反応(P C R)によるなどして、細胞中の B R 3 ポリペプチドコード核酸ないし m R N A のレベルを測定することができる。また、例えば抗体ベースのアッセイを用いて血清などの体液中にある抗原を測定することによって B R 3 分子又は B A F F 分子の過剰発現を研究することもできる(例として、1990年6月12日発行の米国特許第4,933,294号；1991年4月18日公開の国際公開公報91/05264；1995年3月28日発行の米国特許第5,401,638号；及びSias 等, J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)も参照のこと)。上記のアッセイの他に、当業者には様々なインビボアッセイが有用である。例えば、場合によっては放射性同位体などの検出可能な標識で標識した抗体に哺乳動物の身体の中の細胞を曝し、例えば、放射性活性について外部をスキャニングすることによって、又は予め抗体に曝した哺乳動物の生検組織を分析することによって、哺乳動物の細胞への抗体の結合を評価することができる。

10

【 0 2 2 1 】

アッセイ

本発明のアゴニスト抗 B R 3 抗体は、 T A C I ないし B C M A レセプター経路でなく B R 3 生物学的経路を直接刺激するために用いられる(すなわち、「 B R 3 特異的」)。このようなアゴニスト抗体を用いて、 B R 3 特異的シグナル伝達経路の下流マーカを同定することができる。したがって、 B R 3 経路の下流マーカを同定するためのアッセイは、その細胞表面上に B R 3 を発現する細胞に、アゴニスト B R 3 結合の B R 3 特異的抗体ないしポリペプチドを投与する工程と、細胞中のタンパク質活性ないし遺伝子発現(例えば、マイクロアレイ又は E L I S A アッセイ)の変化を検出する工程を含みうる。本発明の他の実施態様では、アゴニスト抗体を用いて、 B R 3 経路特異的なインヒビターをスクリーニングすることができる。このスクリーニング方法は、その細胞表面上に B R 3 を発現する細胞に、アゴニスト B R 3 結合の B R 3 特異的抗体ないしポリペプチドを投与する工程、該細胞に候補化合物を投与する工程、及び該候補化合物が細胞の増殖又は細胞の生存又はその両方を阻害したかどうかを決定する工程を含みうる。

20

【 0 2 2 2 】

2004年12月31日に出願の米国特許仮出願60/640,323を含め、本明細書中で引用するすべての文献(特許及び特許文献を含む)は、出典明記によってその全体を本明細書中に組み込まれる。

30

ブダペスト条約の下に、以下の D N A 配列をアメリカ培養細胞系統保存機関(A T C C)に寄託した。 A T C C の所在地は、米国20110-2209ヴァージニア州マナッサス、ユニバーシティブルバード10801である。寄託の詳細は以下の通りである

材料	寄託番号	寄託日
Hu9.1-RF-H-IgG	PTA-6315	2004年11月17日
Hu9.1-RF-L-IgG	PTA-6316	2004年11月17日
Hu2.1-46.DANA-H-IgG	PTA-6313	2004年11月17日
Hu2.1-46.DANA-L-IgG	PTA-6314	2004年11月17日
HuV3-46s-H-IgG	PTA-6317	2004年11月17日
HuV3-46s-L-IgG	PTA-6318	2004年11月17日
マウスB細胞: 12B12.1	PTA-6624	2005年 4月 8日
マウスB細胞: 3.1	PTA-6622	2005年 4月 8日

40

【 0 2 2 3 】

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から 30 年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。寄託物はブダペスト条

50

約の条項に従い、またジェネンテク社とATCCとの間の合意に従い、ATCCから入手することができ、これは、関連の米国特許の発行及び任意の米国又は外国特許出願の公開のうち、いずれか早く行なわれた方の時点で、寄託培養物の子孫を永久且つ非制限的に入手可能とすることを保証し、35USC122条及びそれに従う特許商標庁長官規則(特に参考番号8860G638の37CFR第1.14条を含む)に従って権利を有すると米国特許商標庁長官が決定した者に後代を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した培養物が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、材料は通知時に同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託物質の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

10

【0224】

実施例で言及されている市販試薬は、特に示さない限りは製造者の使用説明に従い使用した。ATCC登録番号により以下の実施例及び明細書全体を通して特定されている細胞の供給源はアメリカ培養細胞系統保存機関、マナッサス、VAである。特に記さない限り、本発明は上記及び以下の教科書に記載されたもののような組換えDNA技術の標準的な手法を用いた：上掲のSambrook等；Ausubel等, *Current Protocols in Molecular Biology*(Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y., 1989)；Innis等, *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*(Academic Press, Inc.; N.Y., 1990)；Harlow等, *Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Press: Cold Spring Harbor 1988)；Gait, *Oligonucleotide synthesis*(IRL Press, Oxford, 1984)；Freschney, *Animal Cell Culture*, 1987；Coligan等, *Current Protocols in Immunology*, 1991。

20

【0225】

本明細書及び特許請求の範囲全体を通して、「含む」なる語彙、又は「含む」ないし「含んでいる」の変形型は、定めた完全体又は完全体の群を包含するもので、任意の他の完全体又は完全体の群を除外するものではない。

前記の明細書は、当業者に本発明を実施できるようにするために十分であると考えられる。以下の実施例は例示的目的のためのみに示すのであり、本発明の範囲が多少なりとも限定されるものではない。実際、ここに示し記載したものに加えて、本発明を様々に改変することは、前記の記載から当業者にとっては明らかなものであり、添付の特許請求の範囲内に入るものである。

30

【実施例】

【0226】

実施例1 材料

B R 3 に結合するマウスモノクローナル抗体は凝集したヒト B R 3 - F c で免疫化したマウスから生成した。これらの抗体には、11G9、8G4、7B2、1E9、12B12、1E9、1A11、8E4、10E2及び12B12と称されるハイブリドーマから産生されたものが含まれる。2.1及び9.1と称されるマウスモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは既に記載されており(国際特許出願PCT/US01/28006(国際公開公報02/24909))、アメリカ培養細胞系統保存機関にそれぞれATCC番号3689及びATCC番号3688として寄託される(10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209, USA)。ヒト B R 3 を結合せずマウス B R 3 に特異的であるハムスター抗マウス B R 3 抗体である B 9 C 1 1 抗体、並びにハイブリドーマ 3.1 由來の抗体は、Biogen Idec, Inc から入手した。

40

【0227】

標準の F m o c 化学法を用いてバイオニアペピチド合成機(PE Biosystems)にて、ミニ B R 3 ペプチド(TPCVPAECFDLLVRHCVACGLLR(配列番号150)を C 末端のアミドとして合成した。ペプチドを、5%トリイソプロピルシランを含む T F A で 1.5 - 4 時間、室温で処理することによって、樹脂から切断した。回転式蒸発によって T F A を除去した後、ペプチドをエチルエーテルの添加によって沈殿させ、次いで逆相 H P L C(アセトニトリル / H₂O / 0.1% T F A)にて精製した。エレクトロスプレー質量分析によって確実にペ

50

ペプチドを同定した。凍結乾燥の後、酸化型ペプチドをHPLCにて精製した。還元型ミニBR3を含むHPLC分画を、NH₄OHにてpH9以下に調整した；ついで、K₃Fe(CN)₆を少し過剰に添加することによってシステイン24と35間をジスルフィド結合し、酸化型ペプチドをHPLCによって精製した。少し過剰なI₂を用いて4時間以下にわたってHPLC溶出処理をすることによってAcm基を除去した(第2のジスルフィドが付随的に形成される)。分析的HPLCによって酸化経過をモニタし、終末産物をHPLCによって再び精製した。ミニBR3のアミノ末端を樹脂上でビオチン化して、その後切断し、修飾されなかったペプチドについて上記のように厳密に精製した。

【0228】

ヒトBR3細胞外ドメイン(hBR3-ECД)とマウスBR3細胞外ドメイン(mBR3-ECД)コンストラクトをpET32a発現ベクター(Novagen)にサブクローニングすることによって細菌内で産生し、N末端基チオレドキシン(TRX)-His-タグの後にエンテロキナーゼプロテアーゼ部位を有する融合体を作製した。大腸菌BL21(DE3)細胞(Novagen)を30℃で生育し、IPTGによってタンパク質発現を誘発した。TRX-BR3は、Ni-NTAカラム(Qiagen)を通じて精製し、イミダゾール勾配にて溶出し、エンテロキナーゼ(Novagen)によって切断した。ついで、BR3をS-セファロースカラムで精製し、3mM酸化グルタチオンと1mM還元グルタチオンを含有するPBS、pH7.8にて終夜リフォールドさせ、PBSに対して透析し、Monosカラムにて再精製し、濃縮してPBSに透析した。用いたヒトBR3細胞外配列：MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSPAPRTALQPQE (配列番号151)。マウス細胞外配列：MGARRLRVRSQRSDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCELFHTPDTGHTSSLEPGTALQPQEGQ (配列番号152)。

既に記載されているように(Pelletier, M., 等, (2003) J. Biol. Chem. 278, 33127-33133)、ヒト及びマウスBR3-Fcタンパク質はチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO細胞)内で産生した。マウスBR3-Fc配列(mBR3-Fc)はYan等, (2001) Current Biology 11, 1547-1552にて最初に記載された。マウスBR3-Fc配列は以下の通りである：

MSALLILALVGAAVASTGARRLRVRSQRSDSSVPTQCNQTECFDPLVRNCVSCELFHTPDTGHTSSLEPGTALQPQEGQ
VTGDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPPKPKDVLTI TLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPRE
EQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTGRPQAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFF
PEDIITVEQWQNGQPAENYKNTQPI MNTNGSYFVYSKLNVQKSNWEAGNTFTCSVVLHEGLHNHTEKSLSHSPGK (配列番号153)。一般的に、変異体ヒトBR3-Fc融合(vBR3-Fc)は、天然に生じるヒトBR3配列のECД配列の変異体配列を含んでなるFc融合タンパク質に関係しており、この変異体はBAFFを結合し、天然のヒトBR3配列より少なく凝集する傾向にある。

【0229】

既に記載されるように(Gordon, N. C., 等, (2003) Biochemistry 42, 5977-5983)、本明細書中で用いられるヒトBAFFを発現させ、精製することができる。BAFF残基82-285をコードするDNA断片をpET15b(Novagen)発現ベクターにクローニングし、N末端基His-タグの後ろにトロンビン切断部位を有する融合体を作製した。大腸菌BL21(DE3)(Novagen)培養物を、50mg/Lカルベニシリンを含有するLB培地にて37℃で対数中間期(mid-log phase)まで生育し、ついで16℃に冷却し、1.0mM IPTGで誘導した。さらに12時間生育した後細胞を遠心分離によって回収し、-80℃に保存した。細胞ペレットを50mMトリス、pH8.0および500mM NaCl中に再懸濁して、氷上で超音波破壊した。遠心分離後、上清を、Ni-NTAアガロースカラム(Qiagen)に流した。カラムを、50mMトリス、pH8.0、500mM NaClおよび20mMイミダゾールにて洗浄し、次いで、250mMイミダゾールを含有する同じ緩衝液にて段階的に希釈して溶出した。BAFFを含有する分画を貯留し、トロンビンを添加して、試料を20mMトリス、pH8.0および5mM CaCl₂にて4℃で終夜透析した。さらに、タンパク質を、monooQ(Pharmacia)カラムにて、最後に20mMトリス、150mM NaClおよび5mM MgCl₂のS-200サイズ排阻カラムにて精製した。

10

20

30

40

50

50

実験によって、ハイブリッド B A F F 分子を用いた。ハイブリッド B A F F 分子は、マウス B A F F の N 末端の残基 1 2 8 - 3 0 9 に組み換えて融合させたヒト B A F F の残基 8 2 - 1 3 4 を含んだ。上記のように組み換えたタンパク質は細菌内で発現させ、精製した。ヒト配列の添加により m B A F F タンパク質の発現が促された。他の実験では、C H O 細胞内で発現されるヒト B A F F を B 細胞増殖アッセイに用いた。

【 0 2 3 0 】

実施例 2 競合的 E L I S A アッセイ

競合的 E L I S A アッセイを用いて、ヒト B R 3 及びミニ B R 3 の細胞外ドメインについて抗 B R 3 抗体の相対的な親和性を測定した。この実験において、マイクロタイタープレート(Nunc MaxiSorp)ウェル上に吸着した抗体に対するビオチン化 B R 3 - E C D の結合を非標識の B R 3 - E C D 又はミニ B R 3 と競合させた。B R 3 - E C D を 10 倍モル過剰のスルホ- N H S - ビオチン(Pierce)と外気温度で 2 時間反応させることによってビオチン化した。5 μ g / m l の抗体をコーティングバッファ(50 mM 炭酸ナトリウム pH 9.6)中で室温で 2 時間おいてコートした後、P B S / 0.05% Tween-20 / 2.5% (wt/vol)粉末スキムミルクにて 1 時間おいて反応を止めた。ストレプトアビジン-H R P で検出した後、492 nm の吸光度がおよそ 1.0 になるために必要なビオチン-B R 3 - E C D の量を測定した。M a b 3.1 及び 12 B 1 2 について、必要なビオチン-B R 3 - E C D の濃度は 5 n M であり、8 G 4 及び 11 G 9 では 2 n M であり、2.1 及び 9.1 ではビオチン-B R 3 - E C D 濃度は 200 p M であった。これらの濃度のビオチン-B R 3 - E C D を含有する溶液と様々な濃度の非標識 B R 3 - E C D 又はミニ B R 3 を調整して、抗体でコートしたマイクロタイタープレートの個々のウェルに添加した。振とうしながら 2 時間インキュベートした後、溶液を移して、ウェルを P B S / 0.5% Tween-20 にて 6 回すすいだ。ストレプトアビジン-H R P (0.5 μ g / m l)を添加して、振とうしながら 30 分間インキュベートし、次いでウェルをからにして上記のすすいだ。結合した H R P を、P B S、0.01% 過酸化水素及び 0.8 mg / m l O-フェニレンジアミドを含有する溶液を添加することによって検出した。20 分間置いて発色させ、次いで等量の 1 M リン酸を添加することによって消光した。492 nm の吸光度をプレート読み取り機(Thermo LabSystems)にて測定した。ビオチン-B R 3 - E C D 結合阻害の I C 5 0 を測定するために、4-パラメータ方程式(1)を用いて、競合物質の濃度に対する吸光度を分析した。

$$(1) ((m_1 - m_4) / (1 + (m_0 / m_3)^{m_2})) + m_4$$

ここで、m 1 は競合物質のないときの吸光度、m 4 は無限のインヒビター濃度の吸光度、m 0 は競合物質の濃度、m 3 は I C 5 0 値である。

【 0 2 3 1 】

表 3

抗体	IC50 (nM)	
	BR3-ECD	ミニ-BR3
2.1	9	9
9.1	9	16
8G4	8	22
11G9	10	6
3.1	330	>1000
12B12	60	>1000

2.1、9.1、8.G4 及び 11G9 は、完全長 B R 3 細胞外ドメインの親和性と同じ親和性で 26 残基ミニ B R 3 を結合した(表 3)。また以下に示すように、これらの抗体は B A F F への B R 3 結合を阻止(ブロック)した。また、ミニ B R 3 へ同様に結合しない 3

10

20

30

40

50

. 1 及び 1 2 B 1 2 抗体は B A F F - B R 3 相互作用をブロックしなかった。

【 0 2 3 2 】

実施例 3 ヒト化抗体

(a) 材料および方法

以下の残基番号はカバットに従う(Kabat 等, Sequences of proteins of immunological interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))。一文字アミノ酸表記を用いる。DNA 縮重は I U B コードを用いて表す(N = A / C / G / T、D = A / G / T、V = A / C / G、B = C / G / T、H = A / C / T、K = G / T、M = A / C、R = A / G、S = G / C、W = A / T、Y = C / T)。

10

【 0 2 3 3 】

アクセプターヒトコンセンサスフレームワーク上への直接的な高頻度可変領域の融合

マウスの 2.1、11G9 及び 9.1 由来の VL ドメインおよび VH ドメインは、ヒトコンセンサス I(huK I) およびヒトサブグループ III コンセンサス VH(hu III) ドメインと整列配置した。CDR 移植片を作るために、3 つの位置: R71A、N73T および L78A (Carter 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)) がヒトサブグループ III コンセンサス VH ドメインと異なるアクセプター VH フレームワークと huK I を用いた。図 1-3 の太字を参照のこと。マウスの 2.1(mu 2.1)、11G9(mu 11G9) 及び 9.1(mu 9.1) 抗体の高頻度可変領域は、直接の CDR- 移植片(2.1 移植片、11G9 移植片及び 9.1 移植片)を生成するために、アクセプターヒトコンセンサスフレームワーク内に操作した(図 1-3)。VL ドメインでは、以下の領域をヒトコンセンサスアクセプター: 位置 24-34(L1)、50-56(L2) 及び 89-97(L3) に融合した(カバット番号付けシステム)。VH ドメインでは、位置 26-35(H1)、49-65(H2) 及び 94-102(H3) を移植した(図 1-3)。MacCallum 等 (MacCallum 等 J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)) は、抗体と抗原複合体結晶構造を分析して、重鎖の位置 93 と 94 が接触領域の一部であることを発見したため、抗体をヒト化する際に CDR-H3 の定義においては当然これらの位置が含まれるようである。ファジミドは移植した CDR-ヒトフレームワーク配列をコードする核酸配列を含んだ。ファジミドは一価性の Fab-g3 表出ベクターであり、phoA プロモータの制御下に 2 つのオープンリーディングフレームを含有した。第一のオープンリーディングフレームはアクセプター重鎖の CH1 ドメインと VL に融合する stII シグナル配列からなり、第二のオープンリーディングフレームはアクセプター重鎖の CH1 ドメインと VL に融合する stII シグナル配列とその後の微量ファージコートタンパク質 P3 からなる。

20

直接の移植片変異体は、各々の高頻度可変領域の異なるオリゴヌクレオチドを用いたキュンケル突然変異誘発法によって生成した。適切なクローンを DNA 塩基配列決定によって、評価した。

30

【 0 2 3 4 】

高頻度可変領域の穏やかなランダム化(Soft randomization) -

各々の移植抗体について、配列多様性は、マウスの高頻度可変領域配列に対するバイアスを維持する穏やかなランダム化法を用いて、各々の高頻度可変領域に導入した。これは、Gallo 等, J. Med. Chem. 37:1233-1251 (1994) に記述されるように、毒性オリゴヌクレオチド合成法を用いて行った。変異させる高頻度可変領域内の位置を特定するために、野生型アミノ酸をコードするコドンの各々の位置に、平均 50 パーセントの突然変異率となるようにヌクレオチドの 70-10-10-10 混合物にて毒性を与えた。

40

穏やかにランダム化されたオリゴヌクレオチドを、マウスの高頻度可変領域配列に従つてパターン化し、直接的な高頻度可変領域移植片によって定められる同じ領域を包含させた。VH ドメインの H2 の初めのアミノ酸位(位置 49)は、コドン RGC を用いて A、G、S 又は T に配列多様性を限定した。

【 0 2 3 5 】

ファージライブリの生成 -

50

各々の高頻度可変領域について設定したランダム化オリゴヌクレオチドプールを、660 ngのオリゴヌクレオチド、50 mM トリスpH 7.5、10 mM MgCl₂、1 mM ATP、20 mM DTTおよび、5 U ポリヌクレオチドキナーゼを含む20 μlの6つの反応溶液中で、37℃で1時間によって別々にリン酸化した。次いで、6つのリン酸化オリゴヌクレオチドプールを、オリゴヌクレオチド対鑄型比が3となるように、20 μgのキュンケル鑄型と、終容量500 μlの50 mM トリスpH 7.5、10 mM MgCl₂中で混合させた。混合物を90℃で4分間、50℃で5分間アニールさせ、氷上で冷ました。過剰な、アニールされていないオリゴヌクレオチドは、アニールされたDNAの過剰な変性を避けるために変更したプロトコールを用いてQIAQUICK PCR精製キット(Qiagenキット28106)により除去した。500 μlのアニールされた混合物に、150 μlのPBを添加し、混合物を2つの二酸化ケイ素カラムに分割した。それぞれのカラムを750 μlのPEで洗浄し、カラムを乾燥させるために余計に回転させた後、各々のカラムを、110 μlの10 mM トリス、1 mM EDTA、pH 8にて溶出した。次いで、アニールして精製した鑄型(220 μl)を、1 μlの100 mM ATP、10 μlの25 mM dNTPs(各々25 mMのdATP、dCTP、dGTPおよびdTTP)、15 μlの100 mM DTT、25 μlの10×TMバッファ(0.5 M トリスpH 7.5、0.1 M MgCl₂)、2400 UのT4リガーゼ、および30 UのT7ポリメラーゼを充填して、室温で3時間置いた。

10

【0236】

充填した生成物を、トリス-酢酸塩-EDTA/アガロースゲルにて分析した(Sidhu等, Methods in Enzymology 328:333-363 (2000))。3つのバンドが正常に観察された：下部バンドは正常に充填されてライゲーションされた生成物であり、真ん中のバンドは充填されたがライゲーションされなかった生成物であり、上部バンドは鎖置換された生成物である。上部バンドは、T7ポリメラーゼの内因性の副活性により生産されるものであり、避けるのは難しい(Lechner等, J. Biol. Chem. 258:11174-11184 (1983))、しかしながら、このバンドは、上部バンドの30分の1より低い効率で形質転換するもので、通常ライプラリにほとんど関与しない。真ん中のバンドは、最終ライゲーション反応のための5'リン酸塩がないことによる、このバンドは効率よく形質転換するものであり、主に野生型配列を示す。

20

Sidhu等, Methods in Enzymology 328:333-363 (2000)に記述されるように、充填された生成物を精製し、SS320細胞に電気穿孔して、M13/KO7ヘルパーファージ存在下にて広げた。ライプラリサイズは、1-2×10⁹の独立クローンの範囲とした。最初のライプラリからのランダムなクローンを配列決定して、ライプラリの質を評価した。

30

【0237】

ファージ選別 -

ヒトBR3ecd又は変異体BR3-Fc融合(vBR3-Fc)をファージ選別のための標的として用いた(Kayagaki等, Immunity 17:515-524 (2002)及びPelletier等 J. Biol. Chem. 278:33127-33133 (2003))。10 μg/mlのBR3ecd又はvBR3-Fcを含むPBSにてMaxiSorpマイクロタイプレート(Nunc)上をコートした。最初の選別ラウンドでは、標的として8ウェルを用いた、標的の単一ウェルを選別の連続ラウンドに用いた。ウェルを、カゼインプロッカー(Pierce)を用いて1時間、反応を停止した。ファージを培養液上清から回収し、1%BSAおよび0.05%TWEEN20を含有するPBS(PBST)に懸濁した。2時間、ウェルに結合させた後、結合していないファージは、0.05%TWEEN20を含有するPBS(PBST)にてさらに洗浄することによって、除去した。結合したファージは、50 mM HCl、0.5 M KClにて30分間インキュベートすることによって、溶出させた。ファージは、Top10細胞およびM13/KO7ヘルパーファージを用いて増幅させ、2YT、50 μg/mlカルバネシリン(carbanecillin)中で終夜、37℃生育させた。標的のコートしたウェルから溶出されるファージの力価は、非標的のコートウェルから回収したファージの力価と比較して、濃縮を評

40

50

価した。

【0238】

また、ファージライブリを溶液分類法を用いて分類した(Lee, C.V., 等 (2004) J. Mol. Biol 340(5):1073-93)。スルホ-N H S - L C - ビオチン(Pierce)(b - v B R 3 - F c)を用いてv B R 3 - F cをビオチン化した。マイクロタイタウェルを、10 μ g / ml ニュートラビジンを含むP B Sにて終夜、4^oCでコートして、カゼインプロッカー(Pierce)を用いて1時間反応を止めた。最初のパニングは固定したv B R 3 - F cによる標準的なプレート分類法を用いて行った。第二のパニングでは、1% B S Aおよび0.05% T w een 20を含有するP B S(P B S T)に懸濁した200 μ lのファージを、100 nM b - v B R 3 - F cと2時間混合した。b - v B R 3 - F cに結合したファージは5分間でニュートラアビジンコートウェルに捕獲され、結合していないファージはP B S Tによって、洗い流した。ファージは、100 mM H C lを用いて30分間溶出し、中和して、K O 7ヘルバーファージ(New England Biolabs)の存在下にてX L 1ブルー細胞(Stratagen e)中で増殖させた。その後の分類ラウンドは、以下を除き、同様に行つた：ラウンド3での最終的なb - v B R 3 - F c濃度は20 nM、ラウンド4及び5での最終的なb - v B R 3 - F c濃度は1 nMとした。ラウンド5で1時間ファージ結合を行つた後、1 μ M非ビオチン化v B R 3 - F cを混合物に添加して64時間置き、ニュートラビジンに捕獲させた。

10

【0239】

ファージE L I S A -

20

MaxiSorpマイクロタイタープレートを10 μ g / mlのヒトv B R 3 - F cを含有するP B Sにて終夜コートして、カゼインプロッカーにて反応を停止させた。80 μ lの混合物を標的コートウェルに15分間移して結合しなかつたファージを捕獲した後、培養物上清からのファージを組織培養マイクロタイタープレート中で、1% B S Aを含有するP B S Tにて段階的に希釈したv B R 3 - F cとともに1時間インキュベートした。プレートをP B S Tにて洗浄し、H R Pコンジュゲート抗M 1 3(Amersham Pharmacia Biotech)を添加して40分間置いた(1% B S Aを含有するP B S Tにて1:5000)。プレートをP B S Tにて洗浄して、テトラメチルベンジジン基質(Kirkegaard and Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を添加して反応させた。405 nmの吸光度を溶液の標的濃度の関数としてプロットして、I C₅₀を測定した。これは、ファージの表面上に表出されるF a b クローンの親和性評価として用いた。

30

【0240】

F a b 産生および親和性決定 -

親和性測定のためにF a bタンパク質を発現させるため、停止コドンを、ファージディスプレイベクターの重鎖とg 3の間に導入した。クローンを大腸菌34 B 8細胞内に形質移入して、A P 5培地にて30^oCで生育させた(Presta等Cancer Res. 57: 4593-4599(1997))。細胞を遠心分離によって回収して、10 mMトリス、1 mM EDTA pH 8に懸濁して、マイクロフルイダイザーを用いて破壊した。F a bはプロテインGアフィニティクロマトグラフィにて精製した。

40

B I A c o r e^{T M} - 2000を用いた表面プラスモン共鳴によって、親和性分析を行つた。v B R 3 - F c又はh B R 3 e c dを、10 mM酢酸塩pH 4.5(それぞれ20又は100応答単位(R U))にてCM 5センサーチップに固定し、P B S Tにて2倍に希釈したF a b(6.25から100 nM)を注入した。2分間の結合と20分間の解離を行つて各試料を分析した。各注入後、10 mMグリシンpH 1.5を用いてチップを再生成した。結合応答は、R Uを空のフローセルから減算することによって補正した。k_{o n}およびk_{o f f}の同時フィッティングの1:1 Langmuirモデルを動態分析のために用いた。

【0241】

(b) 結果および考察

2.1、11 G 9及び9.1のヒト化 -

50

ヒト化のために使用するヒトアクセプターフレームワークはハーセプチン(登録商標)抗体に用いるフレームワークに基づくものであり、コンセンサスヒト I V L ドメインおよびヒトサブグループIIIコンセンサスV H ドメインの変異体からなる。変異体V H ドメインには、ヒトコンセンサスからの3つの変異：R 7 1 A、N 7 3 T およびL 7 8 A がある。マウス2.1、11G 9 及び9.1のV L ドメインおよびV H ドメインを、ヒト I およびサブグループIIIドメインとそれぞれ整列配置し、各々の相補性領域(C D R)を特定し、次いで、ファージ上でF a b として表出されうるC D R 移植片を生成するためにヒトアクセプターフレームワークに融合した。2.1、11G 9 又は9.1のC D R 移植片を表出するファージを固定したv B R 3 - F c への結合について試験したところ、結合親和性はわずかであった。

各C D R 移植片のC D R 領域が穏やかにランダム化されている各抗体についてC D R 修復ライプラリを作製した。各C D R 移植片ライプラリは、4ラウンドの選別のために固定されたv B R 3 - F c に対してパンした。濃縮(enrichment)は、9.1に対応するC D R 移植片について観察されるだけであった。D N A 配列分析のためにクローニングを選択して、C D R - L 2 及びC D R - H 1 に標的とした配列変化を示した(図4)。v B R 3 - F c ファージE L I S A を使用してクローニングし、選択されたクローニングを発現されたF a b タンパク質を用いたB i a c o r e によって、さらに分析した。9.1-7 0 及び9.1-7 3 の2つのクローニングは、キメラ9.1F a b に比例してv B R 3 - F c への結合の改善を示した(図10)。

【0242】

C D R 修復により2.1-移植片及び11G 9 -移植片に結合が集まらなかつたので、我々はマウスとアクセプターフレームワークとの相違を調べた。面白いことに、2.1及び11G 9 並びに9.1は、我々がまず最初に使用したアクセプターフレームワークより位置7 1 および7 8 のヒトコンセンサスサブグループIII配列により密接に似ていた(図5)。このことから、我々は、「R L」及び「R F」の2つの新規のフレームワークを用いてC D R 修復を調べた。これらのフレームワークは、R 7 1 がコンセンサス内に存在し、修復される点でアクセプターフレームワークと異なり、位置7 8 は、ロイシンとしてコンセンサスに変化されている(R L)か、フェニルアラニンを挿入することによって、この位置でマウスのフレームワークと似るように修飾されている(R F)。これらのフレームワーク変化により、v B R 3 - F c への2.1及び11G 9 ファージ結合が適度に改善された。R L 又はR F のフレームワーク(9.1-R L 又は9.1-R F)に移植された9.1C D R の結合は、大いに向上した(図6)。

各々の抗体 / フレームワーク移植片：2.1-R L、2.1-R F、11G 9 -R L、11G 9 -R F、9.1-R L 及び9.1-R F の各々の6つのC D R において、同時に穏やかにランダム化して、前述の通りC D R 修復ライプラリを生成した。これらの選別のために、溶液分類方法を用いて、親和性ベースのファージ選択方法の効率を上げた。ビオチン化した標的濃縮物を操作して、ファージ捕獲時間を少なくしてバックグラウンドを下げ、そして非ビオチン化標的物を付加して解離速度の速いクローニングを取り除くことによって、高親和性クローニングをうまく選択できる(Lee, C.V., 等 J. Mol. Biol. (2004) 340(5): 1073-93)。方法の段落で述べたように、b - v B R 3 - F c を利用して別々に12のライプラリを分類した。

【0243】

5ラウンドの選別後、各々のライプラリの個々のクローニングのD N A 配列を分析した。v B R 3 - F c ファージE L I S A を用いてクローニングし、発現されたF a b タンパク質を用いたB I A c o r e 表面プラズモン共鳴法(S P R)によって、選択したクローニングをさらに分析した。いくつかのクローニングは、キメラ抗体の単量体親和性に達しているかそれを上回るB R 3 結合親和性を有することが同定された。

9.1-R L 及び9.1-R F ライプラリ配列について、再びC D R - H 1 に変異を濃縮すると、このC D R の再設計が抗原結合の修復に重要であることが示された(図8)。特に、突然変異M 3 4 I は様々なクローニングに含まれることが多い。C D R - H 1 の他の頻繁にみ

10

20

30

40

50

られる変化に A 3 1 G 及び T 2 8 P があるが、 C D R - H 1 の全体にわたって多くの他の置換が含まれているようである。これらの結果から、ヒトフレームワークに移植された 9 . 1 の親和性を修復できる複数の配列変化があること、及びこの抗体がフレームワーク変化(例えば 9 . 1 - R F)又は C D R - 修復(例えば 9 . 1 - 7 0 及び 9 . 1 - 7 3)によって、ヒト化して初めのマウス抗体の親和性を上回る親和性が生成できることが明らかである。

【 0 2 4 4 】

1 1 G 9 ライブリについて、 C D R - H 1 、 C D R - H 2 及び C D R - H 3 に配列変化が観察された C D R 修復ライブリの錠型として 1 1 G 9 - R F を使用する場合にのみ濃縮が観察された(図 8)。しかしながら、 2 つの最も高い親和性クローニの各々は C D R - H 3 に類似の変化を有し、両クローニは、変化 D 9 6 N 、 G 9 7 D 及び W 1 0 0 L を含有した。これらのクローニの親和性は、単量体マウス 1 1 G 9 親和性の 10 倍よりも大きかった。

濃縮は、 2 . 1 - R L 及び 2 . 1 - R F ライブリの両方に観察された(図 7)。面白いことに、 C D R - H 3 を標的とする同様な配列変化が両ライブリに観察された。実際に、 2 例において、 C D R - H 3 に対する変化は、ライブリ(9 4 - 9 7 _{N S N F} 及び 9 5 - 9 7 _{T L P})の間で同一であった。驚くことに、これは、ライブリ設定のために導入される配列多様性となりうる。両ライブリにおいて、観察される配列の一般的な種類には、位置 9 5 及び 9 7 の他の変化と T 9 4 N 及び H 9 6 N との組合せ(例えば 9 4 - 9 7 _{N S N F} 、 9 4 - 9 7 _{N L N Y} 及び 9 4 - 9 7 _{N A N Y})が含まれていた。これらの変異体は、 v B R 3 - F c 又は h B R 3 e c d に対して最も高い親和性を有する傾向にあった。実際に、クローニ 2 . 1 - 3 0 (9 4 - 9 7 _{N L N Y})の親和性は、単量体マウス 2 . 1 の親和性を上回るものであった。

【 0 2 4 5 】

ヒト化のための変化の概要

抗体のヒト化のために、 6 つのマウス 9 . 1 C D R の移植片(位置 2 4 - 3 4 (L 1)、 5 0 - 5 6 (L 2)、 8 9 - 9 7 (L 3)、 2 6 - 3 5 (H 1)、 4 9 - 6 5 (H 2)及び 9 4 - 1 0 2 (H 3)と定める)を根幹としたヒトのコンセンサス I V L 及びサブグループ III V H ドメイン内に、 2 つの方法が同定されている。一つは、新規の C D R - H 1 配列の選別及び C D R - L 2 内の 2 つの変化に加えて、ハーセプチン(商標登録)抗体に存在する 3 つのフレームワーク変化(R 7 1 A 、 N 7 3 T 及び L 7 8 A)を利用したものである。これによって、キメラ 9 . 1 F a b の親和性よりほぼ 2 倍高い親和性を有するヒト化変異体(9 . 1 - 7 0)となる。二つめの方法は、フレームワーク内に 2 つの変化(N 7 3 T 及び L 7 8 F)を加えて、 C D R に変化を加えない(9 . 1 - R F)ことによって、やはりキメラ 9 . 1 F a b の親和性よりほぼ 2 倍高い親和性とするものである。

6 つのマウス 1 1 G 9 C D R の移植片(位置 2 4 - 3 4 (L 1)、 5 0 - 5 6 (L 2)、 8 9 - 9 7 (L 3)、 2 6 - 3 5 (H 1)、 4 9 - 6 5 (H 2)及び 9 4 - 1 0 2 (H 3)と定める)を根幹としたヒトコンセンサス I V L 及びサブグループ III V H ドメイン内の、フレームワークに 2 つの変化(N 7 3 T および L 7 8 F)と C D R - H 3 に 3 つの変化(D 9 6 N 、 G 9 7 D 及び W 1 0 0 L)を加えることにより、キメラ 1 1 G 9 F a b 親和性と比例して 10 倍より大きく改善した親和性を有する完全なヒト 1 1 G 9 抗体(1 1 G 9 - 4 6)となる。

6 つのマウス 2 . 1 C D R の移植片(位置 2 4 - 3 4 (L 1)、 5 0 - 5 6 (L 2)、 8 9 - 9 7 (L 3)、 2 6 - 3 5 (H 1)、 4 9 - 6 5 (H 2)及び 9 4 - 1 0 2 (H 3)と定める)を根幹としたヒトコンセンサス I V L 及びサブグループ III V H ドメイン内に、フレームワークに 1 つの変化(N 7 3 T)と C D R - H 3 に 4 つの変化(T 9 4 N 、 P 9 5 L 、 H 9 6 N 及び T 9 7 Y)を加えることによって、キメラ 2 . 1 F a b 親和性と比例して改善した親和性を有する完全なヒト 2 . 1 抗体(2 . 1 - 3 0)となる。

選択されたクローニを用いた b i a c o r e 結合アッセイの結果は図 10 に示す。

【 0 2 4 6 】

実施例 4 ナイーブファージライブリ由来の抗 B R 3 抗体

10

20

30

40

50

B R 3 を結合する更なる抗体は、まず最初にファージディスプレイ合成抗体ライプラリから選択した。このライプラリは、後述するように、重鎖相補性決定領域(C D R)内の溶解性の露出した位置に合成多様性を導入することによって、単一のヒトフレームワークに構築されたものである。

【0247】

(a) ライプラリ構築のためのファジミドベクター

ファジミド p V 0 3 5 0 - 2 b 及び p V 0 3 5 0 - 4 は、M 1 3 ファージ粒子の表面上に、一価性又は二価性に、それぞれ F a b 鑄型を表出するように設計した。

F a b 鑄型は h 4 D 5 抗体に基づいており、この抗体は H e r - 2 (e r b B 2)として知られている癌関連抗原を特異的に認識するヒト化抗体である。h 4 D 5 配列は、h u m A b 4 D 5 バージョン 8 (「h u m A b 4 D 5 - 8」)配列を用いたポリメラーゼ連鎖反応によって、得られた(Carter 等, (1992) PNAS 89:4285-4289)。h 4 D 5 核酸配列は、ヒトコンセンサス配列 F a b フレームワーク内に、H e r - 2 に特異的なマウスモノクローナル抗体を修飾した C D R 領域をコードする。具体的には、配列は、V H ドメイン及び C H 1 ドメイン(H C 領域)の上流に 軽鎖(L C 領域)を含有する。抗 H e r - 2 抗体の作製方法及び可変ドメイン配列の同定方法は、米国特許第5,821,337号及び同第6,054,297号に示されている。

【0248】

p h o A プロモータの制御下に、ヒト成長ホルモン(h G H)のファージディスプレイのために使われる先に述べたファジミド(p H G H a m - g I I I)を修飾することによって、ベクター p V 0 3 5 0 - 2 b を構築した。M 1 3 微量コートタンパク質 P 3(c P 3)のC末端ドメインに融合した h G H と s t I I 分泌シグナル配列をコードする p h G H a m - g I I I のオープンリーディングフレームを、2つのオープンリーディングフレームを含有するD N A断片に置き換えた。第一のオープンリーディングフレームは h 4 D 5 軽鎖(バージョン8)をコードし、第二のオープンリーディングフレームは c P 3 に融合した h 4 D 5 重鎖の第一定常(C H 1)ドメインと可変(V H)ドメインをコードした。各々のタンパク質は、N末端 s t I I シグナル配列により分泌された。重鎖断片と c P 3 間のアンバー停止コドンを欠失させると、ファージ上に表出される F a b のレベルが増えることが示されている。エピトープタグを h 4 D 5 軽鎖の C 末端に加えた(g D タグ)。記載されるように、重鎖 C H 1 ドメインと c P 3 間の G C N 4 ロイシンジッパーをコードするD N A断片の挿入を除いて、二価性ディスプレイのためのベクター(p V 0 3 5 0 - 4)は p V 0 3 5 0 - 2 b と同一であった。さらに、軽鎖遺伝子は、天然の抗体配列のカバットデータベースにおいて、最も共通してみられるアミノ酸をコードするために、両ファジミドの3つの位置を修飾した、具体的には、A r g 6 6 は G 1 y に変え、A s n 3 0 及び H i s 9 1 は S e r に変えた。これらの変化は、ファージ上の F a b 発現及びディスプレイを増やすためのものである。Kunkel 等の方法を用いて部位特異的突然変異を行った(Kunkel, J. D., 等, (1987) Methods Enzymol 154:367-82)。

【0249】

(b) ライプラリ構築

記載されるように(Lee, C.V., 等, (2004) J. Immunol. Methods 284:119-132、Lee, C.V., 等, (2004) JMB 340:1073-1093)、p V 0 3 5 0 - 2 b 又は p V 0 3 5 0 - 4 の「停止鑄型」バージョンとオリゴヌクレオチド誘導性突然変異誘発を用いてファージディスプレイライプラリを作製した。停止コドン(T A A)を3つすべての重鎖 C D R に埋め込んだ。C D R - H 1、- H 2 及び - H 3 をコードする配列に対してアニールし、ランダム化のために選択した位置のコドンをあつらえた変性コドンに置き換える変性オリゴヌクレオチドの混合によって、この停止コドンは突然変異誘発反応の間に修復された。突然変異誘発反応物を大腸菌 S S 3 2 0 細胞内に電気穿孔し、培養物を K O 7 ヘルパーファージ、5 0 g / m l のカルベニシリン及び 5 0 g / m l のカナマイシンを添加した 2 Y T 培養液中で 3 0 度で終夜培養した。記載されるように(Sidhu, S.S. 等, (2000), Methods Enzymol. 32 8:333-363)、P E G / N a C l を用いた沈殿法によって、ファージを培養物から回収した

10

20

30

40

50

。各々の電気穿孔反応物には 10^{11} 以下の大腸菌細胞と $10\text{ }\mu\text{g}$ 以下のDNAを使用し、 $1 \times 10^9 - 5 \times 10^9$ の形質転換体を生じさせた。

CDR-H1及びCDR-H2(上掲のLee, C.V, 等, (2004), JMBの表1)の天然の多様性と類似するようにあつらえた変性オリゴヌクレオチドによって、異なるライプラリを作製した: Fab.zip鑄型を有するライプラリ3(Lib-3)。上掲のLee, C.V, 等, (2004)に記載のLib-3を参照のこと。CDR-H1及びCDR-H2の2ないし4のオリゴヌクレオチドを結合して、天然の多様性の範囲を増やした。Lib-3には、CDR-H1及びCDR-H2それぞれについて、オリゴヌクレオチドH1a及びH1b(比2:1)及びH2a-c(比1:2:0.1)を使用した(オリゴヌクレオチドの記載について、上掲のLee, C.V. 等 (2004), JMBの表1を参照のこと)。

10

【0250】

CDR-H3の位置95-100について、Lib-3は、NNNコドン(又はNNKコドン)又はトリプレットコドンの各々の位置で不均一なヌクレオチド比を含有するNNNコドン(XYZコドン)の修飾バージョンの何れかを含んでなる伸展したCDR-H3長を有する一組のライプラリからなる。NNNコドンは32のコドンを包含し、20すべてのアミノ酸をコードする。Xは、38%のG、19%のA、26%のT及び17%のCを含有した、Yは、31%のG、34%のA、17%のT及び18%のCを含有した、そして、Zは、24%のG及び76%のCを含有した。Lib-3のCDR-H3設定は、上掲のLee, C.V. 等, (2004)の表5に記述される。別々に突然変異誘発反応を行い、共に電気穿孔する長さ7及び8の残基を除いて、各CDR-H3長を電気穿孔した。

20

各ライプラリの完全なFabのファージディスプレイレベルは、48のランダムに選択されたクローニの抗gD抗体への結合を測定することによって、調べた。Lib-3について、最も長いCDR-H3(15-19残基)を組み込むライプラリがFabディスプレイクローニの割合を減少する(15-30%)ことを除いて、異なるCDR-H3長のディスプレイが同じレベルであった。これは、非常に長い合成オリゴヌクレオチドを使用する場合には、突然変異誘発効率が下がることを示しているようである。

20

【0251】

ファージ選別

F(ab)'2(CDR-H1/H2/H3ランダム化)合成ファージ抗体ライプラリを用いて、BR3のマウス細胞外ドメイン(mBR3-ECД)、IgG1のFc領域に融合したマウスBR3細胞外ドメイン(mBR3-Fc)、ヒトBR3細胞外ドメイン(hBR3-ECД)及びIgG1のFc領域に融合したヒトBR3の細胞外ドメイン(vBR3-Fc)をプレート上で分類した。96ウェルNunc Maxisorpプレートを $100\text{ }\mu\text{l}$ / ウェルの標的抗原(mBR3-ECД、mBR3-Fc、hBR3-ECД及びvBR3-Fc) ($5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$)を含むコートバッファ(0.05 M 炭酸ナトリウムバッファ, pH 9.6)にて4で終夜、又は室温で2時間かけてコートした。プレートは、 $65\text{ }\mu\text{l}$ の1%ブロッキングタンパク質にて30分間、 $40\text{ }\mu\text{l}$ の1% Tween 20にてさらに30分間かけてブロックした(ブロッキングタンパク質:第一ラウンド - ウシ血清アルブミン(BSA)、第2ラウンド - オバルブミン、第3ラウンド - ミルク、第4ラウンド - BSA)。次に、ファージライプラリを、 0.1 % Tween 20 を有する1%BSAにて3~5 O.D./mLに希釈した($10\text{ . D} = 1.13 \times 10^{13}$ ファージ / mL)。一般に、ファージインプットは、第1ラウンド $3 - 5\text{ O.D. / mL}$ 、第2ラウンド 30 . D / mL 、第3ラウンド $0.5 - 10\text{ . D / mL}$ 、及び第4ラウンドインプット $0.1 - 0.5\text{ O.D. / mL}$ であった。希釈したファージを室温で30分間インキュベートした。ウェルを、少なくとも5回連続的にPBS及び 0.05 % Tween 20 で洗浄した。8つの標的抗原コートウェルと2つのコートしていないウェルにブロックしたファージライプラリを $100\text{ }\mu\text{l}$ / ウェル加え、室温で1時間置いた。プレートを、少なくとも10回連続的にPBS及び 0.05 % Tween 20 で洗浄した。ファージを、室温にて20分間、 $100\text{ }\mu\text{l}$ / ウェルの 100 mM HCl で溶出した。溶出したファージ(コートウェルから)及びバッケグラウンドファージ(コートしていないウェルから)は、別々のチューブに回収した。溶

30

40

40

50

出した回収物を、両方のチューブに1/10量の1Mトリス pH 11.0を加えることによって中和した。溶出したファージのチューブに最終濃度0.1%となるようにBSAを加えた。溶出したファージを62℃で20分間熱した。ファージを滴定するために、90μlの対数期XL-1(OD 600nm 0.1-0.3)を10μlの溶出したファージ又はバックグラウンドファージに、37℃で30分間感染させた。次に、感染した細胞を90μlの2YTにて連続的に10倍数増加希釈を行った。1カルベニシリンプレート当たり感染した細胞分量10μlを播いた。

【0252】

ファージを繁殖させるために、およそ400μlの溶出ファージを用いて、4m1以下の対数期XL-1soup(OD 600nm~0.1-0.3)を37℃で30-45分間感染させた。ヘルパー・ファージKO7及びカルベニシリンを、最終濃度 1×10^{10} pfu/ml KO7及び50μg/mlカルベニシリンとなるように、37℃で更に1時間感染溶液に加えた。培養物を、最終量20-25m1になるように、カルベニシリン50μg/ml及びカナマイシン50μg/mlを含む2YT培養液中にて37℃で一晩(又は少なくとも17時間)成育させた。ファージ回収率を増やすために、翌日、培養をさらに30℃で2時間成育させた。

ファージは、8000rpmで10分間細胞を遠心沈殿することによって精製した。上清を回収した。上清の1/5量の20%PEG/2.5MNaClを加え、混合し、5分間氷上に置いた。ファージは、12000rpmで15分間遠心した。上清を回収して、再び5000rpmで5分間遠心した。ペレットを、1m1のPBSに再懸濁して、透明になるように12000rpmで15分間遠心した。PEG/NaCl添加から始めた工程を、再懸濁したペレットで繰り返した。再懸濁ファージペレットのODを270nmで読んだ。ファージ選別の第2、第3及び第4のラウンドは、上記のファージ選別を繰り返して完了した。

【0253】

ELISAスクリーニングアッセイ

3~4ラウンドで得たクローンをELISAアッセイによって特性及び親和性についてスクリーニングした。ポジティブクローン(結合体(binders))は、ウシ血清アルブミンなどのブロッキング(阻止)タンパク質には結合せず、標的抗原(mBR3-ECD及びhBR3-ECD)に対してバックグラウンド以上に結合するクローンである。

【0254】

最初に、384ウェルマイクロタイタプレートのウェルを、1ウェルあたり20μl(コーティングバッファ中に1μg/ml)のmBR3-ECD、hBR3-ECD及び抗gDにて、4℃で一晩又は室温で2時間でコートした。

BSA	mBR3-ECD
抗-gD	hBR3-ECD

【0255】

他の96ウェルプレートに、3及び4ラウンドで得たクローンを50ug/mlカルベニシリン及びヘルパー・ファージKO7を含む150μlの2YT培養液150μlにて37℃で一晩成育した。プレートを2500rpmで20分間遠心沈殿した。50μlの上清をコートしたウェルプレート中の120μlのELISAバッファー(0.5%BSA及び0.05%Tween 20を含むPBS)に加えた。30μlの混合液を4分の1の384ウェルコーティングプレートに加え、室温で1時間インキュベートした。結合は、0.5%BSA及び0.05%Tween 20を含むPBSに75μl/ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)結合抗M13抗体を加えて室温で30分間置いて定量した(Sidhu等、上掲)。PBS-0.05%Tween 20にて少なくとも5回ウェルを洗浄した。次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液B(H₂O₂)(Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD))を

10

20

30

40

50

1 : 1 の比率で含む 100 μ l / ウェルの溶液をウェルに加えて、室温にて 5 分間インキュベートした。各ウェルに 100 μ l の 1 M リン酸 (H₃PO₄) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) を加えることによって反応を止め、室温で 5 分間インキュベートした。各ウェルの黄色の 450 nm の OD を、標準の E L I S A プレート読み込み器を用いて定量した。BSA への結合よりも 3 倍良好に m B R 3 - E C D 及び h B R 3 - E C D に結合したクローニを選別した(図 11)。

選別した結合体の配列を決定した。15 の異なるクローニが見つかった(m B R 3 - E C D の分類から 1 クローニ、m B R 3 - E C D の分類から 6 クローニ、h B R 3 - E C D の分類から 8 クローニ、h B R 3 - F c の分類から 0 クローニ)(図 12)。

【0256】

10

溶液結合競合的 E L I S A

選択された F(a b)' 2 ファージの結合親和性を測定するために、競合的 E L I S A 法を行った。

最初に、ファージを繁殖させ、精製した。37 で 30 分間にて 1 つのクローニに感染させた 10 μ l の X L - 1 バクテリアをカルベニシリソルトに播いた。コロニーをピックアップし、37 で 3 - 4 時間、2 ml (2 YT 及び 50 μ g / ml カルベニシリソルト) 中で成育させた。ヘルパー ファージ K O 7 を最終濃度 10⁻¹⁰ p f u / ml で培養物に加えて 37 でさらに 1 時間置いた。20 ml の培養液 (50 μ g / ml カルベニシリソルトと 50 μ g / ml カナマイシンを含む 2 YT) を培養物に加えて、37 で一晩成育させた。ファージは上記の通りに精製した。

20

第二に、以下の競合的 E L I S A アッセイの使用に最適となる精製したファージの濃度を決定した(すなわち、コートしたプレート上でのおよそ 90% の最大結合能)。96 ウェル Nunc Maxisorp プレートを 2 μ g / ml の m B R 3 - E C D 又は m B R 3 - F c を含むコーティングバッファにて、4 で一晩又は室温で 2 時間コートした。ウェルに、65 μ l の 1% BSA を加えて 30 分間に、その後 40 μ l の 1% Tween 20 を加えて更に 30 分間にてブロックした。次に、PBS - 0.05% Tween 20 にてウェルを 5 回洗浄した。F(a b)' 2 ファージを 0.1 O.D. / ml まで E L I S A バッファー (PBS - 0.5% BSA 及び 0.05% Tween 20) で希釈し、ウェルに加えて室温にて 15 分間に置いた。ついで、ウェルを PBS - 0.05% Tween 20 にて少なくとも 3 回洗浄した。1 ウェルあたり 75 μ l の HRP 結合抗 M 13 抗体 (Amersham, E L I S A バッファにて 1/5000 希釈) を加えて、室温にて 30 分間インキュベートした。再び、ウェルを PBS - 0.05% Tween 20 にて少なくとも 5 回洗浄した。3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液 B (H₂O₂) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) を 1 : 1 の比率で含む 100 μ l / ウェルの溶液をウェルに加えて、室温にて 5 分間インキュベートした。各ウェルの 450 nm の最適密度 OD を、標準の E L I S A プレート読み込み器を用いて定量した。ファージの希釈を O.D. 値に対してプロットした。

30

【0257】

第三に、競合的 E L I S A 法を行った。96 ウェル Nunc Maxisorp プレートを 2 μ g / ml の m B R 3 - E C D 又は m B R 3 - F c を含むコーティングバッファにて、4 で一晩又は室温で 2 時間コートした。ウェルを、65 μ l の 1% BSA を加えて 30 分間に、その後 40 μ l の 1% Tween 20 を加えて更に 30 分間にてブロックした。次に、PBS - 0.05% Tween 20 にてウェルを 5 回洗浄した。上記の結合アッセイに基づいて、1 ウェルに、コートプレートに対して約 90% の最大結合を生じるファージ希釈液 50 μ l を、50 μ l の様々な濃度の m B R 3 - E C D 又は m B R 3 - F c 又は h B R 3 - E C D 又は h B R 3 - E C D (0.1 から 1000 nM) を含む E L I S A バッファー溶液と共に室温で 2 時間インキュベートした。結合していないファージは、75 μ l のウェル混合液を m B R 3 - E C D 又は m B R 3 - F c にてプレコートした 2 つ目の 96 ウェルプレートに移し、室温にて 15 分間にインキュベートすることによってアッセイを行った。2 つ目のプレートのウェルを PBS - 0.5% Tween 20 にて少なくとも 3 回洗浄した。1

40

50

ウェル当たり $75\ \mu l$ の HRP 結合抗M13抗体 (ELISAバッファにて 1 / 5000 に希釈)を加えて、室温にて 30 分間インキュベートした。再び、ウェルを PBS-0.05% Tween 20 にて少なくとも 5 回洗浄した。次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液 B (H_2O_2) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) を 1 : 1 の比率で含む $100\ \mu l$ / ウェルの溶液をウェルに加えて、室温にて 5 分間インキュベートした。各ウェルに $100\ \mu l$ の 1M リン酸 (H_3PO_4) を加えることによって反応を止め、室温で 5 分間インキュベートした。各ウェルの $450\ nm$ の最適密度 OD を、標準の ELISA プレート読み込み器を用いて定量した。競合物質である mBR3-ECD 又は mBR3-Fc 又は hBR3-ECD 又は hBR3-Fc の濃度を O.D. 読み取り値に対してプロットした。F(ab)'2 ファージを 50% 阻害する mBR3-ECD 又は mBR3-Fc 又は hBR3-ECD 又は hBR3-Fc の濃度である IC50 は親和性を表す(表 13)。V3 クローンはマウス及びヒトの BR3 の両方に対して高い親和性で結合した。 10

【0258】

mBAFF ブロッキング ELISA

これら個々のクローンがリガンド (BAFF) として同様な結合エピトープを有するかを調べるために、mBAFF ブロッキング ELISA を以下の通りに行った: 96 ウェル Nunc Maxisorp プレートを $2\ \mu g / ml$ の mBR3-Fc を含むコーティングバッファにて、4 で一晩又は室温で 2 時間コートした。ウェルを、 $65\ \mu l$ の 1% BSA を加えて 30 分間、その後 $40\ \mu l$ の 1% Tween 20 を加えて更に 30 分間おいてブロックした。次に、PBS-0.05% Tween 20 にてウェルを 5 回洗浄した。様々な濃度の mBAFF-F1a g タンパク質を含む ELISA バッファをウェル中で室温で 30 分間インキュベートした。そして、個々の配列の F(ab)'2 ファージを、通常 mBAFF-F1a g タンパク質がない条件下で 90% の結合能を示す濃度で各ウェルに加えて 10 分間置いた。PBS-0.05% Tween 20 にてウェルを 5 回洗浄した。 20

0.5% BSA 及び 0.05% Tween 20 を含む PBS に $75\ \mu l$ / ウェルの西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 結合抗M13抗体を加えて室温で 30 分間置いて結合を定量した (Sidhu 等、上掲)。PBS-0.05% Tween 20 にて少なくとも 5 回ウェルを洗浄した。次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (TMB) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液 B (H_2O_2) ((Kirkegaard-Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) を 1 : 1 の比率で含む $100\ \mu l$ / ウェルの溶液をウェルに加えた。各ウェルに $100\ \mu l$ の 1M リン酸 (H_3PO_4) を加えることによって反応を止め、室温で 5 分間インキュベートした。各ウェルの $450\ nm$ の OD を、標準の ELISA プレート読み込み器を用いて定量した。結果を図 13 及び図 14 に示す。 30

【0259】

さらに、一価形式の BAFF ブロッキング ELISA を同様に行った。mBR3-ECD コートプレートを用いることによって、様々な濃度のハイブリッド BAFF タンパク質を含む ELISA バッファをウェル中で室温で 30 分間インキュベートした。次いで、個々の配列の F(ab)'2 ファージを、通常ハイブリッド BAFF タンパク質がない条件下で 90% の結合能を示す濃度で各ウェルに加えて 10 分間置いた。以下の工程を前述に記載の通りに行った。結果を図 13 に示す。 40

図 14 は、クローン 3 (V3) が容易に BAFF-BR3 結合をブロックしたことを示す。V3 の可変領域配列を図 15 に示す。

【0260】

V3 バックボーンの F(ab)'2 形式の Fab 形式への変更

V3 は BAFF によるブロッキング活性を最も有し、mBR3 及び hBR3 の両方に対する異種間結合活性も有するので、V3 は、更なる親和性改善の候補となる抗体である。今後の親和性改善のために一価性の親和性を確認するために、F220 オリゴ (5' - TCT TGT GAC AAA ACT CAC AGT GGC GGT GGC TCT GGT-3') (配列番号 154) を用いた Kunke 1 突然変異誘発によってロイシンジッパーを除去した。さらに、ランダム化体系において 50

CDR-L3の取り込みを確実にするために、CDR-L3内で多様化したい位置に停止コドン(TAA)を取り込んだ。F9オリゴ(5'-TAT TAC TGT CAG CAA CAT TAA TAA AGG CCT TAA CCT CCC ACG TTC GGA-3') (配列番号155)を用いて、CDR-L3領域内に停止コドンを加えた。

【0261】

親和性改善のためのV3バックボーンにおけるライブラリの構築

親和性改善のために高度(hard)及び低度(soft)のランダム化を設定した。高度ランダム化とは、限定した位置が20アミノ酸すべてにランダム化されていることを意味する。低度ランダム化とは、特定の位置で、50%は親のアミノ酸であり、50%は19の他のアミノ酸ないしは停止コドンにランダム化されていることを意味する。Kunkel突然変異誘発によって、V3バックボーンをベースとして4つのライブラリを構築した。

10

V0902-1 : CDR-L1(F111+F202=1:1) / L2(F201+F203=1:1) / L3

(F133a:133b:133c:133d=1:1:1:1)

20

V0902-2 : CDR-L3 低度(F232) / H1 低度(F226) / L2 (F201+F203=1:1)

V0902-3 : CDR-H3 soft(F228+F229+F230+F231=1:1:0.5:0.5) / L3 低度(F232)

V0902-4 : CDR-L3 低度(F232) / H1 低度(F226) / H2 低度(F227)

【0262】

オリゴ :

L1 F111 (5' - ACC TGC CGT GCC AGT CAG RDT RKT RVW ANW THT GTA
GCC TGG TAT CAA CAG AAA C - 3') (配列番号156)

20

F202 (5' -ACC TGC CGT GCC AGT CAG RDT RKT RVW ANW THT CTG
GCC TGG TAT CAA CAG AAA C- 3') (配列番号157)

L2 F201 (5' -CCG AAG CCT CTG ATT TAC KBG GCA TCC AVC CTC TAC TCT
GGA GTC CCT - 3') (配列番号158)

F203 (5' -CCG AAG CTT CTG ATT TAC KBG GCA TCC AVC CTC GMA
TCT GGA GTC CCT TCT CGC- 3') (配列番号159)

L3 F133a (5' -GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA TMT DMC RVT NHT CCT
YKG ACG TTC GGA CAG GGT ACC - 3') (配列番号160)

F133b (5' -GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA TMT DMC RVT NHT CCT
TWT ACG TTC GGA CAG GGT ACC - 3') (配列番号161)

30

F133c (5' -GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA SRT DMC RVT NHT CCT
YKG ACG TTC GGA CAG GGT ACC - 3') (配列番号162)

F133d (5' -GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA SRT DMC RVT NHT CCT
TWT ACG TTC GGA CAG GGT ACC - 3') (配列番号163)

【0263】

低度ランダム化オリゴ記号 : 5 (70% A, 10% G, 10% C, 10% T)

6 (70% G, 10% A, 10% C, 10% T)

7 (70% C, 10% A, 10% G, 10% T)

8 (70% T, 10% A, 10% G, 10% C)

L3 低度 F232 (5' -GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAA 567 857 577 577 CCG 776
ACG TTC GGA CAG GGT ACC- 3') (配列番号164)

40

H1 低度 F226 (5' -TGT GCA GCT TCT GGC TTC WCC NTT 567 567 557 567 587
757 TGG GTG CGT CAG GCC- 3') (配列番号165)

H2 低度 F227 (5' -AAG GGC CTG GAA TGG GTT GST 866 ATC 577 776 567 658
668 557 577 658 TAT GCC GAT AGC GTC AAG- 3') (配列番号166)

H3 低度 F228 (5' -GCC GTC TAT TAT TGT GCT CGT 768 686 TGC 857 567 567
686 768 668 TGC 676 668 676 ATG GAC TAC TGG GGT CAA G- 3')
(配列番号167)

F229 (5' -GCC GTC TAT TAT TGT GCT CGT 768 686 867 857 567 567
686 768 668 867 676 668 676 ATG GAC TAC TGG GGT CAA G- 3')

50

(配列番号168)

F230 (5' -GCC GTC TAT TAT TGT GCT 768 768 686 TGC 857 567 567

686 768 GGC TGC GCG GGG GCA ATG -3') (配列番号169)

F231 (5' -GCT CGT CGG GTC TGC TAC 567 567 686 768 668 TGC 676

668 676 ATG GAC TAC TGG GGT CAA G- 3') (配列番号170)

【0264】

ファージの発現

電気穿孔法によって前述の突然変異誘発したDNAにて大腸菌株SS320/KO7(KO7感染)を形質転換した。形質転換した細菌細胞を、50 μg/mlカルベニシリンと50 μg/mlカナマイシンを含む2YT培地内で30度20時間生育させた。記載されているように(Sidhu等., Methods Enzymol. (2000), 328:333-363)ファージを回収した。簡単に言うと、ファージは、ポリエチレン glycolを用いて終夜培養液からまず沈殿させることによって精製し、PBSに再懸濁した。ファージは、268 nm (10 D = 1.13 × 10¹³ / ml)の測定値の分光光度計によって定量化した。

10

【0265】

V3よりも親和性を改善するためのファージ分類法

親和性改善選別のために、第1ラウンドでのプレート分類にファージライプラリを対象とし、その後第3ラウンドまで溶液分類を行った。プレート分類の第1ラウンドでは、4つのライプラリをmBR3-ECDおよびhBR3-ECDのコートプレート(NUNC Maxisorpプレート)に対して別々に分類した。ファージインプットは、1%BSAおよび0.1%Tween20中でおよそ30.0D/mlであった。以下の工程は、前述のファージ分類セクションの通りである。mBR3-ECD又はhBR3-ECDに対してライプラリV0902-2、V0902-3及びV902-4からファージを溶出して、増殖のためにプールした。

20

プレート分類の第1ラウンドの後、溶液分類を3回行って、選別のストリンジエンサーを増やした。

【0266】

A) mBR3-ECDおよびhBR3-ECDのビオチン化

ビオチン化の前に、理想としてはpH7.0以上のアミンフリーバッファにて、標的タンパク質を0.5mg/mlより多い濃度にした。第一に、mBR3-ECDおよびhBR3-ECDを含有するバッファを、Amicon Ultra 5Kチューブを用いてPBSに交換した。第二に、PBS(100×)にてNHS-ビオチン試薬の貯蔵物を新しく作製した。およそ3:1モル比の標的タンパク質に対するNHS-ビオチン試薬を室温で30分間インキュベートした。次いで、0.1MトリスpH7.5を加えて、室温で30分間おいて反応していないNHSを失活させた。

30

B) 96ウェルのNunc Maxisorpプレートを、100 μl/ウェルのニュートラビジン(5 μg/ml)を含むPBSにて4度終夜又は室温で2時間おいてコートした。65 μlのSuperblock(Pierce)にて30分間、40 μlの1%Tween20にてさらに30分間置いて、プレートをロックした。

40

C) プレート分類の第1ラウンドにて増殖した10.0D/mlのファージを、100nMのビオチン化mBR3-ECD又はhBR3-ECDを含む、150~200 μlのSuperblock 0.5%及び0.1%Tween20含有バッファとともに室温で少なくとも1時間インキュベートした。さらに、混合物をSuperblock 0.5%にて5~10倍に希釈して、100 μl/ウェルをニュートラビジンコートウェルに添加し、室温で5分間、ゆっくりと攪拌して、ビオチン化標的をファージに結合させた。ウェルをPBS-0.05%Tween20にて8回洗浄した。バックグラウンド結合を決定するために、ビオチン化していない標的を有する対照ウェル含有ファージをニュートラビジンコートプレートに捕獲した。他のコントロール(ニュートラビジン結合コントロール)として、ビオチン化した標的をファージと混合し、ニュートラビジンでコートしていないウェル中でインキュベートした。結合したファージを0.1N HClにて20分間溶出し、1/10量の1

50

M トリス pH 1.1 にて中和し、力価を測定して、次のラウンドのために増殖させた。次に、2回目以降のラウンドの溶液分類は、25nM および 1nM にまでビオチン化した m B R 3 - E C D 又は h B R 3 - E C D 濃度を減少して行い、ストリンジエンシーを高めた。また、ファージインプットは、バックグラウンドのファージ結合を低下させるために、0.5 O.D./m1 および 0.1 O.D./m1 に下げた。

【0267】

ハイスループット親和性スクリーニング E L I S A (単一スポット競合)

第3および第4ラウンドのスクリーニング物からコロニーを拾い、96ウェルプレート (Falcon) 中の 50 μg / m1 カルベニシリンおよび 1e 10 / m1 の K O 7 を含む 2 Y T 培地 150 μl / ウェルにて 37° で終夜生育させた。同じプレートから得た X L - 1 感染 V 3 ファージのコロニーをコントロールとした。

96ウェル Nunc Maxisorp プレートを、100 μl / ウェルの m B R 3 - E C D (2 μg / m1) を含むコーティングバッファにて、4° で終夜又は室温で 2 時間かけてコートした。65 μl の 1% B S A にて 30 分間、40 μl の 1% T w e e n 2 0 にてさらに 30 分間置いて、プレートをブロックした。

ファージ上清を、100nM の m B R 3 - E C D 又は h B R 3 - E C D を含む又は含まない E L I S A バッファ (0.5% B S A 及び 0.05% T w e e n 2 0 を含む P B S) にて 1:10 に希釈して全量を 100 μl とし、F プレート (NUNC) にて室温 (R T) で少なくとも 1 時間インキュベートした。m B R 3 - E C D 又は h B R 3 - E C D を含む又は含まない 75 μl の混合物を、m B R 3 - E C D コートプレートに並んで移した。プレートに穏やかに 10 ~ 15 分間ショックを与えて、m B R 3 - E C D コートプレートに結合していないファージを捕獲した。プレートを、P B S - 0.05% T w e e n 2 0 にて少なくとも 5 回洗浄した。結合は、E L I S A バッファ (1:5000) に西洋ワサビペルオキシダーゼ (H R P) 結合抗 M 1 3 抗体を加えて定量して、室温で 30 分間インキュベートした。P B S - 0.05% T w e e n 2 0 にて少なくとも 5 回ウェルを洗浄した。次に、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン (T M B) ペルオキシダーゼ基質及びペルオキシダーゼ溶液 B (H 2 O 2) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) を 1:1 の比率で含む 100 μl / ウェルの溶液をウェルに加えて、室温にて 5 分間インキュベートした。各ウェルに 100 μl の 1M リン酸 (H 3 P O 4) ((Kirkegaard Perry Laboratories (Gaithersburg, MD)) を加えることによって反応を止め、室温で 5 分間インキュベートした。各ウェルの黄色の 450 nm の O D を、標準の E L I S A プレート読み込み器を用いて定量した。O D 減少 (%) は、以下の方程式によって、算出した。

$$O D_{450 \text{ nm}} \text{ 減少 (\%)} = (\text{競合物質を含むウェルの } O D_{450 \text{ nm}}) / (\text{競合物質を含まないウェルの } O D_{450 \text{ nm}}) * 100$$

【0268】

V 3 ファージのウェルの O D 450 nm 減少 (%) (100%) と比較して、m B R 3 - E C D および h B R 3 - E C D に対してともに 50% より低い O D 450 nm 減少 (%) を有するクローンを選択した。m B R 3 - E C D に対して分類した V 0 9 0 2 - 2, 3, 4 ブルライブラリのみから 14 のクローンを選択した。m B R 3 - E C D に対して分類した V 0 9 0 2 - 1 L C 高度ランダム化ライブラリ及び h B R - E C D に対して分類した両ライブラリからは条件に合うクローンはなかった。これらの 14 のクローンの配列決定を行った。最終的に、4 つの異なる配列 (V 3 - 1, V 3 - 1 1, V 3 - 1 2, V 3 - 1 3) があった。4 つすべての異なるクローンは、V 3 クローンと同じ C D R - L 1 及び C D R - H 2 を有しており、この C D R - L 1 及び C D R - H 2 は 4 D 5 ライブラリテンプレートと同一のものである。V 3 - 1, V 3 - 1 1 及び V 3 - 1 2 がライブラリ V 0 9 0 2 - 3 からのものであるのに対して、V 3 - 1 3 はライブラリ V 0 9 0 2 - 2 からのものである。図 16 A は、L 2, L 3, H 1 および H 3 領域の配列の一部を示す。

【0269】

新規のクローン B A F F の機能的な特徴づけ

V 3 クローンと比較したときの B A F F ブロッキング活性を試験するために、V 3 由来

10

20

30

40

50

のクローンについてブロッキングELISAを行った。4つすべてのクローンはハイブリッドBAFFに対して競合するブロック活性を示した。これは、4つすべてのクローンがBAFFと同様なBR3に対する結合エピトープを有することを示す。

さらに、競合ELISAを行って、mBR3-ECD、hBR3-ECDおよびミニBR3に対するこれらのファージクローンの親和性を測定した。ミニBR3は、BAFFに対する親和性を満たす26残基のペプチド断片である。ブロッキングELISAおよびファージ競合ELISAの結果は、図16Bにまとめる。

【0270】

細菌細胞中の発現のためのFabコンストラクト

V3、V3-1、V3-11、V3-12およびV3-13ファジミドは、ウイルスcP3配列を取り除き、5'-GCTCGGTTGCCGCCGGCGTTTTATG-3' (配列番号: 171)を含有している転写終結区配列にて置き換え、そして、gDタグをコートする配列を取り除くことによって、修飾した(それぞれpW0276-V3、pW0276-V3-1、pW0276-V3-11およびpW0276-V3-12)。すべてのコンストラクトにて、大腸菌34B8細胞を形質転換した。単一のコロニーを拾い、25ug/mlのカルベニシリンを含む完全なCRAPメディウム中で30で少なくとも22時間生育させた。発現タンパク質は、プロテインGハイトラップカラム(Amersham Pharmacia)にて精製した。

BIAcore™-2000によるBiacore測定表面プラスモン共鳴アッセイを行って、抗BR3 Fabの親和性を決定した。mBR3-ECD及びhBR3-ECDを150応答単位(RU)以下でCM5チップ上に固定した。3nMから500nMに濃度を増やしたFab試料を20u1/分で注入し、空のフローセルのRUを減算することによって、mBR3-ECD又はhBR3-ECD上の結合応答を補正した。動態分析のために、 k_{on} および k_{off} の1:1Langmuirモデルの同時フィッティングを用いた。見かけのKD値は表4に示す。

【0271】

表4

mBR3-ECD	クローン	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)	ファージ IC50	
				kD(nM)	(nM)
	V3	7.80E+03	5.50E-03	700	>1000
	V3-1	7.71E+04	1.95E-04	2.5	5.4
	V3-11	4.36E+04	8.88E-04	20.4	8.4
	V3-12	3.60E+04	1.30E-03	36	57
	V3-13	1.00E+04	4.10E-03	40	33
hBR3-ECD	クローン	Kon(1/Ms)	Koff(1/s)	ファージ IC50	
				kD(nM)	(nM)
	V3	2.10E+03	2.60E-03	1300	>1000
	V3-1	3.73E+04	2.93E-04	7.9	5
	V3-11	2.18E+04	1.13E-03	60.1	8.5
	V3-12	1.30E+04	9.10E-04	72	37.5
	V3-13	2.30E+03	2.80E-03	1200	>1000

【0272】

更なる親和性改善のためにV3-1を用いたライブリの構築

10

20

30

40

50

更なる親和性改善のために低度(soft)及びより低度(softter)のランダム化を設定した。低度ランダム化とは、特定の位置で、50%は親のアミノ酸であり、50%は19の他のアミノ酸ないしは停止コドンにランダム化されていることを意味する。より低度のランダム化とは、特定の位置で、75%は親のアミノ酸であり、25%は19の他のアミノ酸ないしは停止コドンにランダム化していることを意味する。Kunkel突然変異誘発によって、V3-1バックボーンをベースとして4つのライプラリを構築した。

V1008-1 : L3 (F279+F280+F293=1:1:0.2) / H3 (F285+F286=1:1)

V1008-2 : L3 (F279) / H3 (F283+F284=1:1)

V1008-3 : H1(F281) / H2 (F282) / L3 (F279)

V1008-4 : L3(F280+F293=1:4) / H3 (F283+F284+F266+F267=1:1:1:1)

10

【0273】

オリゴ:

L3 低度

F279 (5' - ACT TAT TAC TGT CAG CAA 568 767 587 577 CCG 777 ACG
TTC GGA CAG GGT - 3') (配列番号:172)

F280 (5' - ACT TAT TAC TGT CAG CAA 568 767 587 577 568 CCG 777 ACG
TTC GGA CAG GGT - 3') (配列番号:173)

F293 (5' - ACT TAT TAC TGT CAG CAA 878 NNK NNK NNK 878 CCG CCC
ACG TTC GGA CAG GGT - 3') (配列番号:174)

H1 低度

F281 (5' - GCA GCT TCT GGC TTC WCC ATT 568 568 568 878 ATA CAC
TGG GTG CGT C -3') (配列番号:175)

20

H2 低度

F282 (5' - CTG GAA TGG GTT GCT TGG RTT 578 CCT 878 657 GGT 878
ACT 657 TAT GCC GAT AGC GTC AAG- 3') (配列番号:176)

H3 低度

F283 (5' - GTC TAT TAT TGT GCT CGT 766 687 TGC 857 557 767 788 668
688 TGC GCT GGT GGG ATG- 3') (配列番号:177)

F284 (5' - GTC TAT TAT TGT GCT CGT 766 687 TGC 857 557 767 CTT GGT
GTT TGC 678 668 668 ATG GAC TAC TGG GGT CAA- 3') (配列番号:178)

30

F285 (5' - GTC TAT TAT TGT GCT CGT 766 687 RST 857 557 767 788 668
688 RST GST GST GSG ATG GAC TAC TGG GGT- 3') (配列番号:179)

F286 (5' - TAT TAT TGT GCT CGT CGG 687 RST 857 557 767 788 668
688 RST 678 668 668 ATG GAC TAC TGG GGT C- 3') (配列番号:180)

H3 より低度

F266 (5' - GTC TAT TAT TGT GCT CGT 766 687 TGC 857 557 767 788 668
688 TGC GCT GGT GGG ATG- 3') (配列番号:181)

F267 (5' - GTC TAT TAT TGT GCT CGT 766 687 TGC 857 557 767 CTT
GGT GTT TGC 678 688 668 ATG GAC TAC TGG GGT CAA- 3') (配列番号:182)

より低度にランダム化したオリゴの記号 : 5 (85% A, 5% G, 5% C, 5% T)

6 (85% G, 5% A, 5% C, 5% T)

7 (85% C, 5% A, 5% G, 5% T)

8 (85% T, 5% A, 5% G, 5% C)

40

【0274】

V3-1の親和性を改善するためのファージ分類法

ビオチン化したmBR3-EC-DおよびhBR3-EC-D濃度を減少することによって、4つのライプラリ(V1008-1、V1008-2、V1008-3、V1008-4)において、4ラウンドの溶液分類を行った。ファージインプットは、第1ラウンドでは30.D / m1、以降の3回のラウンドでは、1.0.5、0.10.D / m1であった。ライプラリV1008-1について、第1ラウンドでは100nMのビオチン化標的を用いた

50

。次いで、以降の3回のラウンドでは10nM、10nMおよび2nMのビオチン化標的を用いた。他の3つのライブラリ(V1008-2、V1008-3及びV1008-4)に関しては、第1ラウンドでは20nMのビオチン化標的を用いた。次いで、以降の3回のラウンドでは1nM、1nMおよび0.5nMのビオチン化標的を用いた。使用する分類法は上記の通りであった。ストリンジエンシーを上げるために、第4ラウンドで、ビオチン化標的およびファージライブラリを、37で3時間インキュベートした。つぎに、1000倍過剰量の非ビオチン化標的を加え、混合物を室温で30分間インキュベートして、ビオチン化された物質を高い解離速度の結合体を競合するニュートラビジンプレート上に捕獲した。

【0275】

10

ハイスループット親和性スクリーニングELISA(单ースポット競合)

この方法は上記の通りに行った。10nMのmBR3-ECDおよびhBR3-ECDを单ースポット競合に用いた。

V3-1ファージのウェルのOD_{450nm}減少(%) (80%)と比較して、mBR3-ECDおよびhBR3-ECDに対してともに50%より低いOD_{450nm}減少(%)を有するクローンを選択した。12のクローンを選択して、配列決定し、検定した(図17)。結果を図17にまとめた。

クローン41およびクローン46は、最も良く改善した2つのV3-1変異体であった。クローン41がより多くのアスパラギン残基(N)有するので、更なる特徴付けのためにクローン46を選択した。クローン46のCDR-H1領域に、グリコシル化されうる部位(N-S-S/T)がある。このグリコシル化されうる部位を取り除くために、CDR-H1の位置31で3つの单一の突然変異(N31A、N31SおよびN31Q)を加え、mBR3-ECDおよびhBR3-ECDに対する結合活性を試験した。競合ELISAを行って、mBR3-ECDおよびhBR3-ECDに対する親和性を決定した。結果を以下に示す。これらの3つの突然変異の中で、N31Sの親和性は、V3-46親クローンに最も近かった(表5)。

20

【0276】

表5

クローン	ファージID50(nM)	
	mBR3-ECD	hBR3-ECD
V3-46 WT	1.42	0.35
N31A	2.89	0.26
N31S	1.53	0.10
N31Q	2.44	0.27

30

V3-46のN31S突然変異体をV3-46sと称した。V3-46sのFabを、上記の方法によって、作製した。BIAcore™-2000による表面プラスモン共鳴アッセイを用いて、V3-46s Fabの親和性を決定した。結果を下記の表にまとめた(表6および表7)。V3-1 Fabと比較して、mBR3-ECDに対するV3-46s Fabの結合速度は改善していた。さらに、hBR3-ECDに対するV3-46s Fabの結合速度及び解離速度はV3-1よりも有意に改善した。

40

【0277】

mBR3-ECD

表6

クローン	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	kD (nM)	ファージIC50 (nM)
V3-1	7.71E+04	1.95E-04	2.5	5.4
V3-46s	2.70E+05	2.70E-04	1.0	1.53

h B R 3 - E C D

表 7

クローン	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	kD (nM)	ファージIC50 (nM)
V3-1	3.73E+04	2.93E-04	7.87	5
V3-46s	1.40E+05	8.60E-04	0.6	0.1

【 0 2 7 8 】

更なる親和性改善のための V 3 - 4 6 s バックボーンにおけるホモログショットガンライプラリの構築

更なる親和性改善のために、V 3 - 4 6 s ファジミドを鋳型として用いてホモログショットガンライプラリを作製した。3つすべての軽鎖 C D R 内に T A A コドンを導入することによって停止テンプレートを構築した。変異原性のオリゴヌクレオチドを設定して、所望の位置に野生型アミノ酸と類似のアミノ酸のみをコードする二項性コドンを用いた (JMB 2002: 320 [415-418])。Kunkel突然変異誘発法によって停止コドンを修復し、所望の位置に突然変異を誘導した (Kunkel 等 1987)。

以下に記載の 6 つすべての C D R ホモログショットガンオリゴを混合してライプラリ 1 1 0 9 - 3 を作製した。C D R - H 1 、 H 2 及び H 3 について、元のホモログショットガンオリゴに加えて、 B R 3 への初期の結合活性が破壊されていないことを確認するために、すべての他の位置を変異誘発するオリゴ (a 及び b) も包含した。

V1109-3:

L1:L2:L3:H1:H2:H3=1:1:1:0.5:1:1.5

L1(F349)/L2(F350)/L3(F351)/H1(F352+F352a+F352b=1:1:1)/H2(F355+F355a+F355b=1:1:1)
/H3(F356+F356a+F356b=1:1:1)

【 0 2 7 9 】

オリゴ

10

20

30

<CDR-L1>

F349 (5' - ACC TGC CGT GCC AGT SAA GAM RTT KCC ASC KCT GTA GCC TGG TAT CAA CAG AAA C - 3') (配列番号:181)

<CDR-L2>

F350 (5' - CCG AAG CTT CTG ATT TWC KCC GCA TCC TWC CTC TWC TCT GGA GTC CCT TCT CGC - 3') (配列番号:182)

<CDR-L3>

F351 (5' - GCA ACT TAT TAC TGT CAG CAS KCC SAA RTT KCC CCG SCA ACG TTC GGA CAG GGT ACC - 3') (配列番号:183)

CAS は Gln 及び His をコードする。

10

<CDR-H1>

F352 (5' - GCA GCT TCT GGC TTC ACC ATT KCC KCC KCC KCC ATA CAC TGG GTG CGT CAG - 3') (配列番号:184)

F352a (5' - GCA GCT TCT GGC TTC ACC ATT AGT KCC AGC KCC ATA CAC TGG GTG CGT CAG - 3') (配列番号:185)

F352b (5' - GCA GCT TCT GGC TTC ACC ATT KCC AGC KCC TCT ATA CAC TGG GTG CGT CAG - 3') (配列番号:186)

20

<CDR-H2>

F355 (5' - AAG GGC CTG GAA TGG GTT GCA TKG RTT MTC SCA KCC RTT GST TWC ASC GAM TAT GCC GAT AGC GTC AAG GGC - 3') (配列番号:187)

F355a (5' - AAG GGC CTG GAA TGG GTT GCT TGG RTT CTT SCA TCT RTT GGT TWC ACT GAM TAT GCC GAT AGC GTC AAG GGC - 3') (配列番号:188)

F355b (5' - AAG GGC CTG GAA TGG GTT GCT TKG GTT MTC CCT KCC GTG GST TTT ASC GAC TAT GCC GAT AGC GTC AAG GGC - 3') (配列番号:189)

<CDR-H3>

F356 (5' - ACT GCC GTC TAT TAT TGT GCA ARA ARA RTT TGC TWC RAC ARA MTC GST RTT TGC KCT GST GST ATG GAC TAC TGG GGT CAA - 3') (配列番号:190)

30

F356a (5' - ACT GCC GTC TAT TAT TGT GCT CGT ARA GTC TGC TWC AAC ARA CTT GST GTT TGC KCT GGT GST ATG GAC TAC TGG GGT CAA - 3') (配列番号:191)

F356b (5' - ACT GCC GTC TAT TAT TGT GCT ARA CGG RTT TGC TAC RAC CGC MTC GGT RTT TGC GCT GST GGT ATG GAC TAC TGG GGT CAA - 3') (配列番号:192)

w t 残基及びそのホモログ残基の両方をコードするためのコドン使用法の説明については、Vajdos, 等, (2002) J. Mol. Biol. 320:415-418の表1を参照のこと。

【0 2 8 0】

V 3 - 4 6 s の親和性選択についてのファージ分類法

40

ビオチン化したm B R 3 - E C D 又はh B R 3 - E C D 濃度を減少することによってV 1 1 0 9 - 3において3回の溶液分類を行った。ファージインプットは、第1ラウンドでは20. D / m 1、以下の2回のラウンドでは0. 5、0. 1 O. D / m 1であった。第1ラウンドでは1 n Mのビオチン化標的を用いた。次いで、以下の2回のラウンドのビオチン化標的は0. 2及び0. 1 n Mとした。分類方法は上記の通りである。ストリンジエンシーを上げるために、第3ラウンドでは、ファージライブラリととともにビオチン化標的を37で3時間インキュベートした。次いで、1000倍過剰な非ビオチン化標的を加え、混合物を室温で30分間インキュベートして、高い解離速度の結合体と競合させるためにニュートラビジンプレート上に結合させた。

【0 2 8 1】

50

ハイスループット親和性スクリーニング E L I S A (单ースポット競合)

1 nMのm B R 3 - E C D 及び h B R 3 - E C D を用いて、上記のように单ースポット競合を行った。試験ウェルの O D 4 5 0 n m 減少(%)を V 3 - 4 6 s ファージのウェル(90%)と比較した。m B R 3 - E C D 及び h B R 3 - E C D の両方が存在する条件下で 50% の O D 4 5 0 n m 減少(%)を示すクローンを選択した。14 クローンが選択され、配列決定及び分析を行った。

図 18 は、W T V 3 - 4 6 s と比較したときの、m B R 3 - E C D 及び h B R 3 - E C D について親和性選択した V 3 - 4 6 s クローンのファージ I C 5 0 を示す。14 すべてのクローンは、m B R 3 - E C D 及び h B R 3 - E C D に対して V 3 - 4 6 s (W T) よりも良好に結合するようである。ほとんどのクローンは、C D R - H 1 内に変異を有する点で W T とは異なるクローンである V 3 - 4 6 s - 1 2 を除いて W T V 3 - 4 6 s と同じ C D R - H C 配列を有する。図 18 及び配列番号 193 を参照のこと。クローンはすべて図 18 に記載の C D R - L 1 、 C D R - L 2 及び C D R - L 3 内に変異を有する。ほとんどの親和性改善変異体は、V 3 - 4 6 s の親クローンと比較して 2 ~ 5 倍の親和性の改善がみられた。m B R 3 - E C D 及び h B R 3 - E C D に結合する V 3 - 4 6 s - 4 2 は p M の範囲にまで 6 ~ 8 倍増加した。

親和性改善したクローンのタンパク質親和性を確認するために、上記の方法によって V 3 - 4 6 s - 9 及び V 3 - 4 6 s - 4 2 F a b を作製した。B I A c o r e ^{T M} - 3 0 0 0 による表面プラスモン共鳴アッセイを用いて、F a b の親和性を決定した。その結果を以下の上に示す。V 3 - 4 6 s F a b と比較して、m B R 3 - E C D 及び h B R 3 - E C D への V 3 - 4 6 s - 4 2 F a b の結合速度は改善していた。K d はファージ I C 5 0 値と一致して良好であった。以下の表を参照のこと。

【 0 2 8 2 】

mBR-ECD	Kon (1e5/Ms)	Koff (1e-4/S)	kD (nM)	ファージ50 (nM)
V46s-9	4.70	1.50	0.32	0.18
V46s-42	7.40	2.90	0.39	0.23
V46s	2.70	2.70	1.00	1.7

10

20

30

hBR-ECD	Kon (1e5/Ms)	Koff (1e-4/S)	kD (nM)	ファージ50 (nM)
V46s-9	1.60	0.16	0.09	0.05
V46s-42	6.17	0.14	0.026	0.03
V46s	1.40	0.86	0.60	0.35

【 0 2 8 3 】

実施例 5 B J A B 細胞結合実験

ヒトのバーキットリンパ腫細胞株である B J A B 細胞を、10% F B S 、ペニシリン(1 0 0 U / m l 、Gibco-Invitrogen, Carlsbad, CA)、ストレプトマイシン(1 0 0 μ g / m l 、Gibco)及び L - グルタミン(1 0 m M)を添加した R P M I 培地中で培養した。フローサイトメトリによるレセプター発現の分析により、B J A B 細胞が B R 3 を高レベルに、B C M A 及び T A C I を検出不可能なレベルに発現することが示された。結合アッセイのために、1% ウシ胎児血清(F B S)を含有するコールドアッセイバッファ(リン酸緩衝食塩水(P B S)、p H 7.4)にて細胞を洗浄した。細胞密度を 1.25×10^6 / m l に調整し、2 0 0 μ l の細胞懸濁液を 9 6 ウェル丸底ポリプロピレンプレートのウェルに等分した(NUNC, Neptune, NJ、2 5 0 0 0 0 細胞 / ウェル)。細胞を含有するプレートを 1 2 0 0 回転数 / 分で 4 で 5 分間遠心分離し、上清を細胞ペレットから慎重に吸引した。V 3 - 1 m (又は m V 3 - 1)及び V 3 - 1 h は、マウス I g G 2 a 又はヒト I g G 1 それぞ

40

50

れの定常領域に融合する V 3 - 1 抗体の可変領域を指す。キメラ 1 1 G 9、キメラ 2 . 1 又はキメラ 9 . 1 なる用語は、ヒト Ig G 1 の定常領域への 1 1 G 9、2 . 1 又は 9 . 1 それぞれの可変領域の融合体を指す。これらの実験のために、完全長抗体(Ig G)を用いた。

【 0 2 8 4 】

以下のように直接的かつ競合的結合アッセイを行った。直接的結合実験のために、Ig G 抗体試料をコールドアッセイバッファにて段階的に希釈して 3 0 0 ~ 0 . 0 2 nM の濃度にした。試料(1 0 0 μl)をペレット状の細胞に加え、プレートは氷上に 4 5 分間インキュベートした。更なる 1 0 0 μl アッセイバッファを各ウェルに添加して、プレートを 1 2 0 0 回転数 / 分で 4 で 5 分間遠心分離した。慎重に上清を吸引した後、2 0 0 μl のアッセイバッファにてさらに 2 回細胞を洗浄した。適宜、抗マウス Ig G Fc - HRP 又はヤギ抗ヒト Ig G Fc - HRP を、コールドアッセイバッファにて 1 / 1 0 0 0 0 に希釈して、加え(1 0 0 μl / ウェル、Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)、プレートを氷上で 4 5 分間インキュベートした。2 0 0 μl のコールドアッセイバッファにて 2 回洗浄した後、テトラメチルベンジン(TMB, Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD)を添加して、1 0 分間置いて発色させた。1 0 0 μl の 1 M H₃PO₄ を添加して反応を止めた。次いで、6 2 0 nm を参照して 4 5 0 nm のマイクロプレート読み取り機にてプレートを読み取った。直接的結合アッセイでは、示した濃度の mAb を B J A B 細胞に加え、結合した mAb を検出した。

競合的結合アッセイでは、抗 B R 3 mAb は細胞表面の B R 3 に対する結合についてビオチン化した B A F F と競合した。以前に記載されているように(Rodriguez, C.F., 等, (1998) J. Immunol. Methods 219:45-55)、発現させて、ジェネンテクで精製されるヒト B A F F を、NHS-X-ビオチン(Research Organics, Cleveland, OH)を用いてビオチン化した。抗 B R 3 抗体を段階的に希釈して、等量のビオチン-B A F F と混合して、終濃度 3 3 3 - 0 . 1 5 nM mAb 及び 1 0 n g / m l ビオチン-B A F F とした。上記のように、希釈した試料を 9 6 ウェルプレートのペレット状の B J A B 細胞に加えた。氷上で 4 5 分間インキュベーションした後、2 0 0 μl のコールドアッセイバッファにて 2 回洗浄し、ストレプトアビジン-HRP (AMDEX, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) をアッセイバッファにて 1 / 5 0 0 0 に希釈して添加した(1 0 0 μl / ウェル)。最後にプレートを氷上で 4 5 分間インキュベートした。コールドアッセイバッファにて 2 回洗浄した後、TMB を用いて発色させ、H₃PO₄ にて反応を止めて、上記のようにプレートを読み取った。

【 0 2 8 5 】

図 1 9 は、抗体が B J A B 細胞上の B R 3 を結合することを示す。図 2 0 は、V 3 - 1 m が B J A B 細胞上に発現するヒト B R 3 に対する B A F F の結合を競合して置換すること(パネル A)、さらに B J A B に直接結合すること(パネル B)ができたのに対して、B 9 C 1 1 はいずれのアッセイにおいてもヒト B R 3 に結合できなかったことを示した(それぞれパネル A 及び B)。対照的に、V 3 - 1 m 及び B 9 C 1 1 は、B H K 細胞に発現されるマウス B R 3 に対する B A F F の結合を完全にブロックし(パネル C)、さらに細胞に直接結合することができた(パネル D)。V 3 - 1 m(マウス Ig G)及び B 9 C 1 1(ハムスター Ig G)による直接的結合アッセイのためには異なる検出抗体が必要であった。

B J A B 結合アッセイの結果をもとに、ブロッキング又は非ブロッキングのいずれかに抗体を分類した。競合アッセイでは、4 つの mAb (1 1 G 9、2 . 1、9 . 1 及び V 3 - 1) はビオチン-B A F F の結合を完全にブロックするのに対して、他の 3 つ(1 E 9、7 B 2 及び 8 G 4) は部分的に阻害するのみであった(図 1 9 及び 2 0、表 8)。MAb 1 A 1 1、8 E 4、1 0 E 2、1 2 B 1 2 及び 3 . 1 は、非ブロッキングであることが示された(図 1 9)。直接的結合アッセイでは、これら非ブロッキング抗体の中で 1 A 1 1 及び 8 E 4 は相対的に B J A B に対してほとんど結合しないのに対して、1 0 E 1 2 及び 1 2 B 1 2 の結合は他の mAb よりも最大のシグナルがやや高かった。マウス Ig G 1、Ig G 2 a 及び Ig G 2 b アイソタイプのコントロールは、B J A B に対して検出可能な結合を示さず、HRP-コンジュゲート抗マウス Ig G Fc 検出抗体はこれらのアイソタイプと等

10

20

30

40

50

しく結合することを示した。M A b V 3 - 1 m 及び B 9 C 1 1 は、B J A B 及び B H K の両結合アッセイにおいて、評価した(図 2 0)。これらの両ブロッキング抗体は、マウス B R 3 と結合するが、V 3 - 1 m だけはヒト B R 3 に結合する。V 3 - 1 h の結果は、V 3 - 1 m で観察される結果と同じであった。

【 0 2 8 6 】

実施例 6 エピトープマッピング E L I S A

E L I S A によって、エピトープマッピング研究を行った。この E L I S A では、非標識の m A b の希釈曲線が v h B R 3 - F c に対する結合についてビオチン化した 2 . 1 、 9 . 1 、 1 1 G 9 又は 1 E 9 と競合する(図 2 1)。完全なブロッキング m A b s (1 1 G 9 、 2 . 1 及び 9 . 1)についての結果から、2 . 1 と 9 . 1 はともにビオチン化した 1 1 G 9 の結合を効果的に置き換えるが、互いを置き換える最低限の能力しか示さないと考えると、1 1 G 9 結合のエピトープが m A b s 2 . 1 と 9 . 1 のエピトープ間に空間的に配置することが示唆された。3 つの m A b (1 E 9 、 7 B 2 及び 8 G 4)は、競合的 B J A B 結合実験の部分的なブロッカーとしての特徴を示す。エピトープマッピング E L I S A では、これらの m A b が 1 1 G 9 、 2 . 1 すると 9 . 1 との結合を部分的に阻害しただけであったことから、これら m A b は中枢の B A F F ブロッキング部位に対してより周辺に結合するようである。最後に、非ブロッキング m A b である 1 2 B 1 2 は、部分的なブロッカーである 1 E 9 のみにより置き換わりうることから、ブロッキング抗体の領域からさらに離れて結合するようである。

また、マッピング研究を行って、マウス B R 3 に対する V 3 - 1 m 、 B 9 C 1 1 及び P 1 B 8 の結合を評価した。この結果から、2 つのブロッキング m A b (V 3 - 1 m 及び B 9 C 1 1)がマウス B R 3 への結合について交差競合しうるのに対して、非ブロッキング m A b P 1 B 8 が異なるエピトープに結合するようであることが示された(図 2 2)。

【 0 2 8 7 】

以下の表は、競合的 B J A B 細胞結合実験の結果の概要である(表 8)。数カ月の期間にわたって行ったアッセイの結果を編集した。平均 I C 5 0 は、実験の示された数「 n 」から算出した。

表 8

mAb/Br3	ブロッキング	平均 IC50(nM)	SD	n
vBR3-Fc	+	2.15		
1A11	-	n/a		2
1E9	+	2.75	4.09	4
7B2	+/-	8.03		2
8E4	-	n/a		2
8G4	+/-	2.07	0.24	3
10E12	-	n/a		2
12B12	-	n/a		2
11G9	+	0.38	0.11	4
9.1	+	1.30	0.44	4
2.1	+	0.25		2
キメラ 11G9	+	0.45		3
キメラ 9.1	+	0.96	0.13	3
キメラ 2.1	+	0.23	0.37	3
V3-1m	+	2.47	0.08	1
V3-1h	+	5.97		1

n / a = 阻害が検出されない、又は I C 5 0 を算出することが不可能である。

+ / - = 抗体がビオチン化 B A F F 結合を部分的に阻害した。

【 0 2 8 8 】

10

20

30

40

50

以下の表は、直接的 B J A B 細胞結合実験の結果の概要である(表 9)。数カ月の期間にわたって行ったアッセイの結果を編集した。ほとんどの抗体がかなり用量依存的にシグナルを示すのに対して、3つの m A b は部分的に結合するのみであるようであり、2つの m A b は他のものより高い最大シグナルを再現的に示す。平均 E C 5 0 は、実験の示された数「n」から算出された。

表 9

mAb/Br3	結合	平均 EC50(nM)	SD	n
vBR3-Fc	-	n/a		2
1A11	-/+	1.17		2
1E9	+	0.66	0.61	3
7B2	+	0.16		2
8E4	-/+	n/a		2
8G4	-/+	1.78	0.37	3
10E12	高	1.47		2
12B12	高	0.7		2
11G9	+	0.19	0.05	3
9.1	+	0.54	0.10	3
2.1	+	0.16		1
V3-1m	+	3.37		1
B9C11	n/a	n/a		1

10

20

n / a = 阻害が検出されない、又は I C 5 0 を算出することが不可能である。

+ / - = 部分的な結合。

【 0 2 8 9 】

また、ヒト化抗 B R 3 抗体(I g G)は、 B J A B 細胞上の B R 3 に対する B A F F 結合をブロックして、 B J A B 細胞上の B R 3 を結合した。下記の表 1 0 を参照。

表 1 0

	mAb 直接結合 EC50 (nM)		BAFF 競合アッセイ IC50 (nM)	
	平均	SD	平均	SD
mAb 抗-BR3				
V3-1m	4.3	0.8	8.9	3.0
hV3-46S	1.8	0.7	1.9	2.5
ch 9.1	0.36	0.08	1.0	0.3
h9.1-88	0.43	0.09	0.60	0.47
h9.1-70	0.33		0.82	
h9.1-73	0.79		1.78	
h9.1-RF	0.46	0.11	0.68	0.80
ch 2.1	0.14	0.05	0.20	0.07
h2.1-30	0.11	0.02	0.17	0.07
h2.1-46	0.11	0.04	0.19	0.09
h2.1-94	部分的		5.1	3.0
vhBR3-Fc			1.4	0.4

30

40

「 h 」はヒト化を表し、「 c h 」はキメラを表す。

【 0 2 9 0 】

実施例 7 B 細胞増殖に対する抗 B R 3 抗体のアンタゴニスト効果及びアゴニスト効果

(a) 2.1、9.1 及び 11G9 のヒト B 細胞増殖の阻害

C D 1 9 M A C S ビーズ(Miltenyi Biotec)を用いたポジティブセレクション法によって、末梢血液単核細胞から B 細胞を単離した。増殖アッセイのために、B 細胞を、平底 9 6 ウェルプレートに 2×10^5 c / ウェルで 3 通りセットした。細胞を、抗 I g M (1 0

50

m g / m l) (Jackson Immunoresearch)、m B A F F (5 u g / m l)及び示した抗B R 3抗体ないしタンパク質とともに5日間培養した。使用した抗体は、h I g G 1 バックグラウンド中のキメラ抗体であって、組織培養物から精製した。次いで、1 m C i / ウェルトリチウムチミジンにて培養の最後の6時間、細胞にパルスを与え、フィルタで回収して、計数した。結果を図23に示す。

【0291】

(b) V 3 - 1 のマウス B 細胞増殖の阻害

MiltenyiのB細胞単離キットを用いて、製造者の指示の通りに、C 5 7 B L / 6 マウスから、又は、2~4か月齢の抗H E L B C R トランスジェニックマウスから脾臓B細胞を調製した。95%以上の純度を有するB細胞を確実に得た。10%熱不活性F C S、ペニシリン/ストレプトマイシン、2 mM L-グルタミン及び 5×10^{-2} u M -メルカプトエタノールを含有するR P M I - 1 6 4 0 培地中でB細胞を培養した。

様々な濃度の抗B R 3 m A b の存在下又は非存在下において、B A F F (2 n g / m l 又は10 n g / m l)を含む場合又は含まない場合の抗マウスI g M A b 5 u g / m l (I g G、F (a b') 2) (Jackson ImmunoResearch Laboratories)又は雌ドリ卵白リゾチム(Sigma)とともに、精製されたB細胞(200 u l の終容量の105 B細胞)を培養した。48時間の刺激の最後の8時間の³ H-チミジンの取り込み(1 u C i / ウェル)によって、増殖を測定した。いくつかの実験では、抗B R 3 m A b 並びにB R 3 - F c 融合タンパク質を、P C R 機を用いて予め5分間沸騰して不活性化した(コントロール)。

図24は、B R 3 - F c と同様に、B 9 C 1 1 及びV 3 - 1 m が、抗I g M 媒介性一次マウスB細胞の増殖の間に、B A F F 共刺激活性を阻害しうることを示す。B 9 C 1 1 及びV 3 - 1 m はいずれも、様々な用量の抗I g M 抗体の有無にかかわらず、B細胞増殖に対して直接的な効果を示さなかった(データは示さない)。また、V 3 - 1 m 及びB 9 C 1 1 (沸騰していないV 3 - 1 m 又はB 9 C 1 1)によって、抗H E L B C R トランスジェニックマウスのB細胞の増殖が阻害された(データは示さない)。両抗体は、単独で正常マウスB細胞増殖を引き起こさない点でアゴニスト性ではない。

【0292】

(b) 他の抗体

製造業者のプロトコール(Miltenyi Biotec, Auburn, CA)に従って、C D 1 9 M A C S 磁気ビーズを用いたポジティブセレクション法によって、末梢血液単核細胞からヒトB細胞を単離した。細胞は、単離後すぐに用いるか、後の使用のために液体窒素で凍結した、新鮮な凍結細胞をアッセイに等しく用いた。透明で平底のウェルを有する黒色96ウェルプレート(PE Biosystems, Foster City, CA)にて 1×10^5 細胞 / ウェルのB細胞を培養した。

抗B R 3 抗体のアンタゴニスト効果を評価するために、100 n M ~ 1 . 3 p M (15 μ g / m l - 1 n g / m l)の範囲の様々な濃度の抗B R 3 抗体の存在下及び非存在下において、可溶性組み換えB A F F (10 n g / m l)及びF (a b') 2 ヤギ抗ヒトI g M (F c 特異的)抗体(4 μ g / m l) (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)とともに細胞をインキュベートした。第6日目に、Celltiter Glo (Promega, Madison, WI、製造者の指示に従って再構成する)を各アッセイウェルに添加することによって、B細胞増殖を評価した。次いで、室温で10分間インキュベートした後、ルミノメーターにてプレートを読み取った。

抗I g M 抗体単独(4 μ g / m l)又は抗I g M + 「交差結合」F (a b') 2 ヤギ抗ヒトI g G F c 抗体(Pierce, Rockford, IL、30 μ g / m l)の存在下かつB A F F 非存在下において、抗B R 3 抗体(100 n M ~ 1 . 3 p M)をインキュベートすることによって、B細胞増殖を刺激する可能性のある抗B R 3 抗体のアゴニスト効果を評価した。上記の通りにCelltiter Gloを用いて第6日目に増殖を評価した。

図25は、9.1-R F がB A F F 依存性のB細胞増殖をブロックし、アゴニスト効果を示さないことを示す。図26は、2.1-46が抗I g M の存在下において、B細胞増殖を刺激することを示す。これよりアゴニストとしての作用が示唆される。

10

20

30

40

50

【0293】

実施例8 BIA COREを用いた親和性測定

材料及び方法

ファルマシアBIAcore(登録商標)3000(BIAcore AB, Uppsala, Sweden)を用いた表面プラスモン共鳴法によって、室温でリアルタイム生体分子特異的な相互作用を測定した(Karlsson, R., 等 (1994) Methods 6:97-108、Morton, T.A.及びMyszka, D.G. (1998) Methods in Enzymology 295: 268-294)。ヒトのBR3-EC-D又はvBR3-Fcを、一次アミン基を介してセンサチップ(CM5)に固定した。0.025M N-ヒドロキシスクシンイミド及び0.1M N-メチル-N'(ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドの混合物20μlを5μl/分で注入することによって、カルボキシメチル化したセンサチップ表面基質を活性化した。10mM 酢酸ナトリウム、pH 4.5中に5μg/mlのBR3-EC-D又はvBR3-Fcを含む溶液5~10μlを5μl/分で注入した。カップリングの後、チップ上のカップリングしなかった部位を、20μlの1M エタノールアミン(pH 8.5)を注入してブロックした。ランニングバッファは、0.05%ポリソルベート20を含有するPBSとした。動態学的な測定値のために、ランニングバッファにて2倍に段階希釈した抗BR3抗体(6.2-100nM又は12.5-200nM)を、フローセルに対して30μl/分の流速で2分間注入し、結合した抗BR3抗体を20分間解離させた。20~30μlの10mM グリシン・HC1(pH 1.5)を注入することによって、結合表面を再生した。活性化されるが、固定したBR3-EC-D又はBR3-Fcを有さないフローセル1を対照セルとして用いた。フローセル1に対する抗BR3抗体の有意な非特異的結合はなかった。データは、広域フィッティングを用いた1:1結合モデルによって、分析した。結合速度定数及び解離速度定数は、同時にフィッティングした(BIAevaluationソフトウェア)。試験する選択した抗体の濃度を順に漸増又は漸減して試料が動くかどうかについて、同様な結果が得られた。

10

20

30

【0294】

BIAcoreによりBR3-EC-D又はBR3-Fcに対する抗BR3抗体の結合動態を測定した。BR3-EC-D又はvBR3-Fcをセンサチップに固定し、抗体の段階希釈液をフローセルに対して注入した(表11及び表12)。あるいは、抗BR3抗体をセンサチップに固定し、BR3-EC-Dの段階希釈液をフローセルに対して注入した(表13)。物質移動効果を最小限にするために速い流速を用いた。ヒト化Fab及びヒト化IgG抗体の結果を並べて比較した。溶液中のIgGを用いて得た見かけの結合親和性は、溶液中のFabを用いて得たものより高かった。これは、IgGが二価であるので、おそらく結合活性効果によるものである。抗体の9.1、2.1、11G9及びV3-1シリーズの抗BR3抗体の見かけの動力学的パラメータを、表11ないし表13に示す。

【0295】

A. チップ上のBR3-EC-D

表11

抗-BR3	固定化量 (RU)	K _a (10 ⁵ /Ms)	K _d (10 ⁻⁵ /s)	K _D (nM)	R _{max} (RU)	注釈
9.1 IgG	150	4.5	5.6	0.12	108	
2.1 IgG		9.6	5.2	0.05	53	
キメラ 2.1 IgG		16.8 ± 2.4	6.8 ± 1.0	0.04 ± 0.01	60 ± 1	6.25 -100nM, n=3
キメラ 9.1 IgG		14.9	9.2	0.06	55	6.25 -100nM
キメラ 11G9 IgG		16.4	54.9	0.34	32	6.25 -100nM
Ch 9.1 Fab	150	14.2 ± 0.1	34.6 ± 0.5	0.24 ± 0.01	29 ± 1	n=2
Ch 11G9 Fab		12.0	2330.0	19.50	19	
Ch 2.1 Fab		22.5	27.1	0.12	28	

Ch 9.1 Fab	110	14.4	33.9	0.24	171	
Hu9.1_73 Fab		5.6	17.4	0.31	183	
Hu9.1_73 Fab		5.5	17.5	0.32	184	
Hu 9.1_ RF Fab		20.2	29.4	0.14	183	
Hu9.1_70 Fab		10.8	13.7	0.13	184	
Hu9.1_70 Fab	100	9.5	16.3	0.17	137	
Ch 2.1 Fab		26.5	29.4	0.11	129	
Hu2.1_40Fab		1.1	92.3	8.67	46	
Hu2.1_40LFab		0.4	156.0	35.80	52	
Hu2.1_RLFab		1.8	176.0	10.00	67	
Hu2.1_94Fab		13.9	114.0	0.82	106	
Hu2.1_46Fab		25.5	69.3	0.27	118	
Hu2.1_30Fab		38.4	31.1	0.08	139	
Ch 11G9 Fab		11.2	2630.0	23.50	105	
Hu11G9_46 Fab		17.6	80.8	0.46	125	
Hu11G9_36 Fab		14.9	105.0	0.70	118	
Hu11G9_46 IgG		16.6	4.2	0.025	372	
Hu11G9_36 IgG		17.1	4.1	0.024	371	
Hu9.1-88 IgG		19.4±0.6	4.9±0.02	0.025±0.001	370±6	N=2
Hu2.1-30 Fab		39.4	23.2	0.059	262	
Hu2.1-30 IgG		24.1	4.0	0.017	275	
Hu11G9-36 Fab		14.7	95.4	.650	232	
Hu11G9-46 Fab		13.3	86.7	.652	232	
Hu9.1-88 Fab		13.7	101.0	.736	215	
Hu2.1-46 IgG		22.0	4.5	0.02	346	
Hu2.1-94 IgG		17.7	6.6	0.037	331	

10

20

30

【 0 2 9 6 】

チップ上の B R 3 - F c

表 1 2

抗-BR3 IgG	固定化量 (RU)	K _a (10 ⁵ /Ms)	K _d (10 ⁻⁵ /s)	K _D (nM)	R _{max} (RU)	注釈
9.1 IgG	100	5.1	31.3	0.61	152	
2.1 IgG		4.4	3.4	0.08	208	
2.1 IgG		4.7	3.3	0.07	217	6.25 -100nM
Ch 2.1 IgG		9.8 ± 0.9	3.8 ± 0.6	0.04 ± 0.01	241 ± 3	6.25 -100nM, n=3
Ch 9.1 IgG		13.2	23.2	0.17	222	6.25 -100nM
Ch 11G9 IgG		7.8	218.0	2.78	127	6.25 -100Nm
Ch 9.1 Fab	140	4.4 ± 0.4	868.5 ± 21.9	20.00 ± 2.12	49 ± 1	n=2
Ch 11G9 Fab						顕著な結合 なし
Ch 2.1 Fab		13.2	148.0	1.12	126	
Ch 9.1 Fab	380	4.3	932.0	21.80	137	
Hu9.1_73 Fab		5.0	21.5	0.43	427	
Hu9.1_73 Fab		4.7	22.5	0.48	424	
Hu 9.1_ RF Fab		2.9	186.0	6.40	255	

Hu9.1_70 Fab		6.4	39.2	0.61	357	
Hu9.1_70 Fab	220	7.2	68.0	0.95	174	
Ch 2.1 Fab		15.8	145.0	0.92	183	
Hu2.1_40Fab		3.8	123.0	3.20	162	
Hu2.1_40LFab		3.5	121.0	3.49	163	
Hu2.1_RLFab		1.2	139.0	11.20	119	
Hu2.1_94Fab		4.8	80.4	1.67	153	
Hu2.1_46Fab		19.6	25.7	0.13	229	
Hu2.1_30Fab		21.8	15.7	0.07	241	
Ch 11G9 Fab						顕著な結合 なし
Hu11G9_46 Fab		6.6	90.2	1.38	88	
Hu11G9_36 Fab		4.5	104.0	2.31	70	
Hu11G9_36 IgG		5.76	23.10	0.400	116	
Hu11G9_46 IgG		6.48	18.60	0.288	119	
Hu9.1-88 IgG		13.05±0.64	26.15±0.07	0.2±0.008	240±2	N=2
Hu2.1-30 Fab		24.10	22.20	0.092	184	
Hu11G9-36 Fab		4.66	96.80	2.080	46	
Hu11G9-46 Fab		5.00	80.80	1.62	51	
Hu9.1-88 Fab		5.41	74.20	1.370	114	
Hu2.1-46 IgG		9.78	3.96	0.041	243	
Hu2.1-94 IgG		4.77	12.10	0.253	182	

10

20

30

B . チップ上の抗体(溶液中のE C D)

表 1 3

抗-Br3 IgG	固定化量 (RU)	K _a (10 ^{17.10} /Ms)	K _d (10 ⁻⁵ /s)	K _D (nM)	R _{max} (RU)
2.1	1800	1.1	1.7	0.15	423
9.1	2600	2.1	6.4	0.30	337
2.1-46	1900	22.4	43.2	0.193	153
2.1-30	840	35.7±9.3	7.6±5.8	0.020±0.011	69±6
9.1-88	3900	10.2	92.6	0.911	207
9.1-RF	1500	18.0±6.5	30.9±13.6	0.169±0.016	111±16
mV3-1 to H	2500	2.67	17.10	0.64	47
mV3-46 to H	2700	3.00	7.31	0.24	49
mV3-46s to H	4500	15.70	3.18	0.02	22
mV3-1 to M	2500	0.84	13.10	1.56	51
mV3-46 to M	2700	1.19	14.00	1.17	55
mV3-46s to M	4500	2.98	9.51	0.32	33

【0297】

実施例9 機能的なエピトープマッピング

以下のアッセイを用いて、抗B R 3 抗体結合に重要なB R 3 上のエピトープを機能的にマッピングした。

ミニB R 3 ショットガンスキャニングのためのライプラリ構築。過去に記載されるように(Weiss, G.A., 等, (2000) Proc Natl Acad Sci USA 97:8950-4、Gordon, N. 等, (2003) Biochemistry 42:5977-83)、ファジミド p W 1 2 0 5 a に連続的に突然変異を誘発して、M 1 3 バクテリオファージ上にエピトープタグ付加ミニB R 3 を表出するライプラリを構築した。このファジミドは、ヒト成長ホルモンのN末端に融合するペプチドエピトープタグ(MADPNRFRGKDLGG)の後にM 1 3 遺伝子-8 主要コートタンパク質をコードする。

p W 1 2 0 5 a を、キュンケル突然変異誘発(Kunkel, J. D., 等, (1987) Methods Enzymol 154:367-82)のための鋳型として用いて、ミニB R 3 ショットガンライプラリ構築のための好適な鋳型を生成した。オリゴヌクレオチドにより、ヒト成長ホルモンをコードするp W 1 2 0 5 a の断片を、変異する領域の代わりにT A A 停止コドンを含有するミニB R 3 の部分配列をコードするD N A 断片に置き換えた。過去に記載されるように(Sidhu, H. 等, Methods Enzymol 328:333-63)、生成した2つの新規の鋳型、鋳型1(残基3 4 - 4 2 をコードする)と鋳型2(残基1 7 - 2 5 をコードする)を用いてミニB R 3 ライプラリを構築した。所望の位置に突然変異を同時に誘導しながら、鋳型停止コドンをミニB R 3 の相補的な領域に置き換えるように設定した突然変異誘発オリゴヌクレオチドを用いたキュンケル突然変異誘発のために、各々の「部分的なミニB R 3 」鋳型を鋳型として用いた。突然変異の部位で、野生型コドンを、対応するショットガンアラニンコドンに置換した(上掲のWeiss)。これら2つのライプラリの各々はミニB R 3 内の1 1 の残基で突然変異が生じてあり、ライプラリ間で共通して変異されていない部位を有する。ライプラリ1は位置1 7 、1 8 、2 0 - 2 3 、2 5 、2 7 、2 8 、3 0 及び3 3 にショットガンコドンをコードしており、ライプラリ2は位置2 6 、2 9 、3 1 、3 4 及び3 6 - 4 2 にショットガンコドンをコードしている。各々のライプラリは2×10⁹ メンバーを含有しており、理論上完全に多様性を示すと言える(>10⁴ 倍過剰)。

【0298】

ライプラリ分類及び分析。上記の2つのライプラリのそれぞれから得たファージを、9 6 ウエルNunc Maxisorpイムノプレートに固定したV 3 - 1 又は抗タグ抗体(3 C 8 : 2 F 4 、Genentech, Inc.)(ディスプレイ選別)と中和抗体9.1、2.1、8 G 4 、1 1 G 9 (機能的な選別)に対する結合選別の対象とした。ディスプレイ選別は、ライプラリメンバ

ーの間の発現の差異についての抗 B R 3 抗体結合選別を標準化するために行った。各々の標的から溶出されるファージを大腸菌 X L 1-ブルーにて繁殖させた、増殖したファージを、前のラウンドと同じ標的に対して選別するために用いた。2 ラウンドの選別の後、各々のライプラリ及び選別から得た 4 8 の個々のクローンを、カルベニシリン及び K O 7 ヘルパー ファージを添加した 4 0 0 L の 2 Y T 培地を含む 9 6 ウェルフォーマットにて生育させた。これらの培養物の上清をファージ E L I S A に直接用いて、選択対象である抗体を結合できるミニ B R 3 のファージディスプレイ変異体を検出して、結合を確認した。

以下のように一般的にファージ E L I S A を行った。Maxisorp イムノプレート(9 6 ウェル)を、捕獲標的タンパク質(抗 B R 3 抗体)にて、室温で 2 時間かけてコートした(5 μ g / m l を含む 5 0 mM 炭酸塩バッファ(pH 9.6) 1 0 0 μ l)。次いで、0.2% B S A を含むリン酸緩衝食塩水(P B S)にて 1 時間、プレートをロックして、P B S、0.05% Tween 20 にて 8 回洗浄した。ファージ粒子を B S A ブロッキングバッファにて連続的に希釈して、1 0 0 μ l をコートウェルへ移した。1 時間後に、P B S、0.05% Tween 20 にてプレートを 8 回洗浄して、1 0 0 μ l の 1:3 0 0 0 西洋ワサビペルオキシダーゼ / 抗 M 1 3 抗体複合体を含む B S A ブロッキングバッファとともに 30 分間インキュベートして、P B S、0.05% Tween 20 にて 8 回、P B S にて 2 回洗浄した。o-フェニレンジアミン二塩化水素化物 / H₂O₂ 溶液(1 0 0 μ l)を用いてプレートを反応させ、2.5 M H₂S O₄(5 0 μ l)にて反応を止め、492 nm の吸光度を測定した。

【0299】

試験したすべてのクローンは各々の E L I S A において、ポジティブであることが明らかとなり、次いで、過去に記載のよう(上掲のWeiss)、配列決定した。許容範囲内の程度の配列を翻訳して、整列配置した。

B A F F 結合及びディスプレイ選別のデータは既に測定した(上掲のGordon)。抗 B R 3 結合及びディスプレイ選別のデータを同様に算出した。概して、抗 B R 3 抗体又は抗タグ抗体への結合についての 2 ラウンドの選別の後に配列決定したクローン間でみられる野生型残基(w t)と各々の a l a 突然変異(m u t)の発生を表にした。野生型残基の発生を、突然変異の発生で除して、各々の位置の突然変異ごとに w t / m u t 比を決定した(図示せず)。

過去に記載されるように(上掲のWeiss、上掲のGordon)、F-値を算出した。概して、標準化した頻度比率(F)を算出して、B A F F 又は抗 B R 3 抗体結合に対する各 B R 3 突然変異の影響を定量する一方で、ディスプレイ効率を計算した: すなわち、F = [w t / 突然変異体(B A F F 又は抗 B R 3 抗体選別)] / [w t / 突然変異体(ディスプレイ選別)]。比 > 1 を有害突然変異とし、比 < 1 を有利な突然変異とした、太字は 10 倍より大きい影響であることを示す。10 倍以上の影響を示す突然変異(すなわち、F > 10 又は F < 0.1)を、特に有意であるとみなした。

【0300】

表 14 F 値

10

20

30

残基	9.1	2.1	8G4	11G9	V3-1	BAFF
T17	0.6	0.6	1.5	0.5	0.5	0.9
P18	0.4	0.5	1.5	0.5	0.8	0.9
C19						
V20	0.6	3	2.1	1.1	0.9	1.4
P21	1	1.9	62	40	0.6	0.5
A22	0.3	3.2	69	45	0.7	0.7
E23	4.8	9.6	11	6.9	2.4	5.4
C24						
F25	81	49	58	38	21	46
D26	8.7	6.1	6.4	8.5	8.7	17
L27	2.1	0.8	12	1.1	1.4	9.5
L28	1.5	0.1	2.5	0.4	98	210
V29	0.3	0.5	0.8	1	92	57
R30	10	10	11	1.7	20	16
H31	0.5	0.6	3.8	2.8	0.1	0.3
C32						
V33	10	10	38	24	14	106
A34	14	62	41	32	13	28
C35						
G36	1.9	14	1.7	1.8	0.7	1.3
L37	0.7	0.1	0.8	0.7	0.7	5.4
L38	89	0.9	1	0.9	1.4	47
R39	63	0.5	2.2	3.1	0.4	4.1
T40	0.4	0.2	0.5	0.5	0.6	0.5
P41	7.2	0.7	1.7	1.7	1.6	1.9
R42	2.2	1.8	0.8	0.9	0.9	1.5

10

20

30

40

50

【0301】

データにより、11G9、9.1及び2.1がヒトBR3とマウスBR3間の配列変化の領域を利用することができる(表14)。V3-1の機能的なエピトープは、ヒトBR3とマウスBR3間で高く保存されているBAFFの機能的なエピトープを模倣する。このデータの概略を図27に示す。図27の円で囲んだ残基は、ミニBR3配列外でO-結合グリコシル化される残基を示す。11G9、2.1、9.1及びV3-1抗体は、結合のためにBR3グリコシル化を必要としない。9.1抗体の機能的なエピトープはL38及びR39を含む。2.1の機能的なエピトープはG36を含む。V3-1の機能的なエピトープはL28及びL29を含む。11G9の機能的なエピトープはP21及びA22を含む。また、このアッセイにおいて、残基A34、F25及びV33のアラニンスキャニング突然変異は、BR3への9.1、2.1、11G9及びV3-1結合を崩壊させた。これらの残基はファージのBR3の構造的完全性を維持するために重要である。

【0302】

実施例10 CLL発現

慢性リンパ球白血病(CLL)患者の末梢血液細胞を、B細胞マーカー(CD19、CD27、CD20、CD5及びBR3)に対する抗体を用いて染色した(図28)。V3-1を用いてBR3を染色した。ある患者では、B細胞(CD19+左下)上にCD20を発現していないにもかかわらず、BR3は有意なレベルで発現していた(棒グラフのピークを参照-パネルB)。さらに12人のCLL患者から得た12の試料を評価した。12すべての試料でBR3が発現していた。これらのデータから、抗BR3抗体がこの症状の治療に値することが示唆された。

【0303】

実施例11 抗体依存性細胞性細胞障害

乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)読み取りを使用して、基本的に記載されているように(Shie等, J. Biol. Chem. 276:6591-6604 (2001))、CD20発現バーキットリンパ腫株であるBJAB細胞のナチュラルキラー細胞(NK細胞)溶解を媒介する、抗BR3キメラモ

ノクローナル抗体の能力(A D C C 活性)についてアッセイした。RosetteSep(登録商標)ヒトN K細胞エンリッチメント混合液(StemCell Technologies, Vancouver, B.C.)を用いて、製造者の指示に従って、正常なヒトドナーの100mLのヘパリン処理血液からN K細胞を調製した。血液を等量のリン酸緩衝食塩水にて希釈して、15mLのFicoll-PaqueTM(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)にて層状にして、1450RPMで20分間、遠心分離した。層間界面の白血球を4本の清浄な50mLチューブに分配し、そのチューブを15%胎仔ウシ血清を含む RPMI培地で満たした。チューブを1450RPMで5分間遠心分離し、上清を捨てた。N K細胞をアッセイ培地(グリシンなしのF12/DMEM 50:50、1mM HEPESバッファ pH 7.2、ペニシリン/ストレプトマイシン(100単位/mL; Gibco)、グルタミン、及び1%熱不活性化胎仔ウシ血清)にて 2×10^6 細胞/mLに希釈した。

アッセイ培地で段階的に希釈した抗体(0.05mL)を、96ウェルの丸底組織培養プレートに加えた。BJAB細胞をアッセイバッファで 4×10^5 /mLの濃度まで希釈した。BJAB細胞(ウェル当たり0.05mL)を96ウェルプレート中で希釈した抗体と混合し、室温で30分間インキュベートして、BR3への抗体の結合を可能にした(オプソニン作用)。

【0304】

各ウェルに0.05mLのN K細胞を添加してA D C C反応を開始させた。コントロールウェルでは、2% Triton X-100を添加した。ついで、プレートを37℃で4時間インキュベートした。細胞障害性(LDH)検出キット(キット番号1644793, Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana)を製造者のプロトコールに従って使用して、放出されたLDHのレベルを測定した。0.1mLのLDH展開液を各ウェルに加えた後、10秒間混合した。ついで、プレートをアルミフォイルで覆い、室温で15分暗所でインキュベートした。ついで、490nmでの光学密度を読み取り、コントロールウェル中で測定した全LDHで除することによって%溶解を計算するために使用した。溶解を抗体濃度の関数としてプロットし、4-パラメータ曲線フィッティング(KALEIDAGRAPH)を用いてEC₅₀濃度を決定した。

すべてのヒト化抗BR3抗体は、BJAB細胞(ヒトバーキットリンパ腫)のN K細胞媒介性の溶解に関して強い活性を示し、1nMより小さい相対的な作用強度であった(図29)。BJAB細胞の代わりに、Ramos細胞(ヒトバーキットリンパ腫)及びWIL2s細胞(ヒトB細胞リンパ腫)を用いて同様なアッセイを行った。図29A及びBのそれぞれは、抗B抗体によるRamos細胞及びWIL2s細胞のA D C C殺傷を示す。抗Her2抗体(4D5)をネガティブコントロールとして用いた。一般的に、BR3に対して親和性の高い抗体は抗体依存性細胞殺傷アッセイにおいてより有効であった。

【0305】

実施例12 BR3-Fc又は抗BR3抗体によるB細胞の枯渇

B細胞を枯渇させる抗BR3抗体の能力をBR3-Fcと比較した。第0日目に、500μgのコントロール(マウスIgG2a)、マウスBR3-Fc又は抗BR3(V3-1)抗体を6週齢のBALB/cマウスに腹膜投与した。第1、3、7及び15日目に各グループのマウスを屠殺した。図30は、処置の7日目の、血液、リンパ節及び脾臓のB細胞のフローサイトメトリー分析を示す。血液、リンパ節及び脾臓のB細胞は、BR3-Fc及びコントロール処置動物よりV3-1処置マウス(CD21+CD23+及びCD21highCD23low)の方が少ないことを示した。BR3-Fc処置は、コントロールFc処置動物と比較してB細胞の数を有意に稀釈することが既に示されている。円の隣の太字の数値は、特定の領域に含まれるリンパ球の割合を表す(円)。

同様の条件の更なる実験では、血液、リンパ節及び脾臓のFACS分析は、一般に、BR3-Fc及びコントロール処置動物よりV3-1処置マウスにおけるB細胞(CD21+CD23+及びCD21highCD23low)の方が少ないことを示した(図31)。BR3-Fcは、特に後の時点においてコントロール動物と比較してB細胞の数を有意に減少した。図31は、第1、3、7及び15日目での脾臓の濾胞性(FO-CD21+ C

10

20

30

40

50

D 2 3 +)又は周辺帯(M Z - C D 2 1 h i g h C D 2 3 l o w)の絶対数及びリンパ節の B 細胞の % ; 1 m l の血液に含まれる B 細胞の絶対数を示す。データを平均 + / - 標準偏差(n = 4)として表す。

【 0 3 0 6 】

同様の条件の更なる実験では、脾臓(top row - IgM+Syn+)及び胚中心細胞(middle row - B220+CD38low)の形質芽細胞の F A C S 分析は、抗 B R 3 抗体(V 3 - 1)がいくらかの形質芽細胞及び胚中心細胞を枯渇しうることを示した(図 3 2)。 B R 3 - F c は、コントロール動物と比較して形質芽細胞の数を有意に減少した。パネル A に示す数値は、特定の領域に含まれるリンパ球の割合を表す。グラフの線では、データを平均 + / - 標準偏差(n = 4)として表す。

データは、 B R 3 への B A F F 結合をブロックするが A D C C 機能を有さない融合タンパク質である、 B R 3 - F c で処置するよりも抗 B R 3 抗体で処置した後に、より広域な B 細胞の枯渇がみられたことを示した。

【 0 3 0 7 】

実施例 1 3 B 細胞減少を最大にするための F c 依存性細胞殺傷及び B A F F ブロック

単回用量 1 0 m g / k g の抗 B R 3 抗体(m V 3 - 1)、 D 2 6 5 A / N 2 9 7 A 突然変異を有する m V 3 - 1 、非 B A F F ブロッキング抗 B R 3 抗体 P I H 1 1 又は B R 3 - F c で B A L B / c マウスを処置した。処置後第 6 日目に脾臓又は末梢血液の B 細胞を、フローサイトメトリーにて分析した。処置後の末梢血液 B 細胞(B 2 2 0 +)及び脾臓濾胞性 B 細胞(C D 2 1 + C D 2 3 +)の絶対数をそれぞれ図 3 3 A 及び図 3 3 B に示した。データを平均 + / - 標準偏差(n = 4)として表す。 D 2 6 5 A / N 2 9 7 A F c 突然変異により、インピトロ F c R I I I の結合が破壊された。結果により、非ブロッキング抗体である不完全な F c レセプター結合を有する抗 B R 3 抗体及び B R 3 - F c の両方が B 細胞集団数を減少することができたにもかかわらず、 F c 依存性細胞殺傷活性と B A F F ブロッキング活性を有する抗 B R 3 抗体がより強力な B 細胞減少 / 枯渇薬剤であることが示された。これは、一つの分子に、抗体依存性細胞障害(A D C C)と B 細胞生存遮断の両活性が組み合わさっていることによるものである。

【 0 3 0 8 】

実施例 1 4 狼瘡マウスモデル

抗 B R 3 抗体を、狼瘡マウスモデルにおいて試験した。これらの研究のために、およそ 8 か月齢の N Z B / W の狼瘡傾向にある陽性マウスを、第 0 日目及び第 7 日目に、 2 0 0 μ g の m I g G 2 a (抗 g p 1 2 0)(コントロール) 又は m B R 3 - F c 又は m V 3 - 1 (抗 B R 3 抗体) にて処置(ip)した。血液、リンパ節及び脾臓(濾胞性 - F O 及び周辺帯 - M Z) の B 細胞をフローサイトメトリーによって分析した。データを個々のマウスのデータポイント(n = 4)として表した。 B R 3 F c と同様に、抗 B R 3 抗体は自己免疫系のマウスの B 細胞を減少することができた(データは示さない)。

より長期の研究において、およそ 1 0 0 m g / d 1 のタンパク尿症を示す 7 か月齢の N Z B × W F 1 マウス(ループス腎炎マウスモデル)を、およそ 6 か月の期間にわたって、 3 0 0 μ g の m V 3 - 1 、 m B R 3 - F c 又はコントロール m I g G 2 a 抗体(抗 g p 1 2 0)にて、 1 週に 2 回処置した。各々の処置コホートは 2 5 匹のマウスを含む。疾患の進行に合わせて、すべてのマウスを改善について毎月評価した(図 3 4 A)。生存しているマウス、又は、 3 0 0 m g / d 1 のタンパク尿症レベルより低いマウスの割合を進行に期間に対して測定した。さらに、処置後およそ 6 か月で、生存しているマウスを屠殺し、 F A C S 分析で分析した。抗 B R 3 抗体処置マウスの末梢 B 細胞(B 2 2 0 + とする)の中央値は、 B R 3 - F c 処置マウス及びコントロールマウスよりも低かった(図 3 4 B)。抗 B R 3 抗体処置マウス及び B R 3 - F c 処置マウスの総脾臓 B 細胞(B 2 2 0 +)の中央値は、コントロールマウスよりも低かった(図 3 4 C)。抗 B R 3 抗体処置マウス及び B R 3 - F c 処置マウスの活性化された脾臓 B 細胞(B 2 2 0 + C D 6 9 +)の中央値は、コントロールマウスよりも低かった(データは示さない)。また、抗 B R 3 抗体(p < 0 . 0 0 0 0 1) 処置マウス及び B R 3 - F c (p < 0 . 0 2) 処置マウスの脾臓形質細胞 / 形質芽細胞(C D 1

10

20

30

40

50

38+)の中央値は、コントロールマウスよりも低かった(データは示さない)。B R 3 - F c ($p < 0.02$)処置マウス及び抗 B R 3 抗体($p < 0.00001$)処置マウスの脾臓胚中心 B 細胞(B 220 + C D 38 low)の中央値は、コントロールマウスよりも有意に低かった(データは示さない)。

【0309】

実施例 15 S C I D モデル

また、抗 B R 3 抗体の B 細胞枯渇活性を重症複合免疫不全(S C I D)モデルにおいて試験した。B 細胞及び C D 4 T (> 90%)細胞中で磁力的にエンリッチした 4000 万個のヒト末梢血液単核細胞を、第 0 日目に亜致死的に放射線照射した(350 ラド)6 週齢 s c i d ベージュマウスの脾臓内に導入した。第 0 日目に、500 μ g の抗 B R 3 抗体(ヒト Ig G 2a 定常領域を有する V 3 - 1 又は 2.1)、ヒト Ig G 2a アイソタイプコントロール又はマウス B R 3 - F c にてマウスを処置した。第 4 日目にマウスを屠殺し、それらの脾臓をヒトの B 細胞についてフローサイトメトリによって分析した。抗 B R 3 処置によって、活性化 / 胚中心(G C) B 細胞(上段)と形質芽細胞(下段)はともに有意に減少したのに対して、B R 3 - F c によって、活性化 / G C 細胞だけが有意に減少した(図 35 A - D)。1 グループ当たり 10 匹のマウスとし、各グループの平均を表した。

次の実験では、ヒト P B M C を C D 8 T 細胞、C D 16 / C D 56 NK 細胞及び C D 14 単球から磁力的に枯渇させ、放射線照射した s c i d ベージュマウスの脾臓内に投与した(40×10^6 / マウス)。同じ日に、300 μ g / マウスのヒト抗ヒト B R 3 (9.1 R F) 又はアイソタイプコントロール(ヒト Ig G 1)にてマウスを処置した。7 日後、マウスを屠殺し、それぞれの脾臓におけるヒト B 細胞活性化をフローサイトメトリーを用いて評価した。活性化した胚中心 B 細胞(C D 19 h i C D 38+)の % は、抗 B R 3 で処置したグループにおいて有意に減少していた(図 35 E)。

【0310】

更なる実験では、標準的な方法を用いて、正常なヒトドナーの Leukopack (Blood Centres of the Pacific, San Francisco, CA) からヒト P B M C を単離した。P B M C を 40×10^6 / 30 μ l PBS に再懸濁して、脾臓内注入の工程の間中、氷上に置いた。セシウム 137 供与源を用いて 350 ラドの放射線をレシピエントマウスに亜致死的に照射した。照射の 4 時間後、 40×10^6 のヒト P B M C を含む 30 μ l の PBS を脾臓内(i.s.)投与によってすべてのマウスに投与した。麻酔下で、手術部位の毛を剃り、ベタジンと 70% アルコールにて準備をした。左の横腹の肋骨境界のちょうど下を 1 cm 皮膚切開し、腹壁と腹膜の切開をした。脾臓を慎重に露出させ、30 μ l の細胞懸濁液を注射した。5-0 Vicryl と外科用ステープルをそれぞれ用いて筋層と皮膚の切開を閉じた。第 0 日目の細胞導入の 4 時間前に、単回 300 μ g 用量の 200 μ l の生理食塩水の A b 溶液をすべてのマウスに静脈内投与した。照射の後の 7 日間、ポリミキシン B 110 mg / L とネオマイシン 1.1 g / L を飲料水に加えた。

実験群 :

グループ 1 : 賦形剤(n = 9)

グループ 2 : 抗 B R 3 (9.1 R F)(n = 9)

グループ 3 : 抗 B R 3 (9.1 R F N 434 A)(n = 9)

【0311】

第 4 日目にすべてのマウスを安楽死させた。それらの脾臓の B リンパ球サブセットをフローサイトメトリー分析によって定量化した。第 4 日目に血清試料(100 μ l)を回収して、最終時点での A b の血清中濃度を確認した。

ヒト P B M C 由来 B 細胞は急速に拡大し、s c i d / ベージュマウスに導入された後に活性化された。細胞導入後 4 日までに、脾臓の主な B 細胞群は、活性化された B 細胞 C D 19 h i / C D 38 i n t 表現型(抗 C D 19 及び抗 C D 38 抗体)を示した。プラセボ治療グループの活性化された B 細胞の平均パーセンテージは 10.1 % であったのに対して、9.1 R F 治療グループの活性化された B 細胞の平均パーセンテージは 0.46 % であった。導入の 4 日後に、B A F F 遮断によって活性化された B 細胞の拡大を阻害する能力

10

20

30

40

50

、並びにB細胞前駆体を枯渇する能力について、9.1RFと9.1RF N434A抗体を比較すると、両方とも統計学的に有意な阻害効果を示した(9.1RF及び9.1RF N434Aのp値はともに<0.0001であった。プラセボコントロールグループと比較するダネット試験を用いた)。下記を参照のこと。

【0312】

結果：

平均と標準偏差

レベル	番号	平均	Std Dev	標準偏差	平均	下限95%	上限95%
9.1RF	9	1.5206	1.6517	0.5506	0.251	2.790	
9.1 N434A	9	1.004	0.7791	0.2597	0.406	1.603	
プラセボ	9	30.2896	15.3760	5.1253	18.470	42.109	

抗B R 3 A b(9.1RF及び9.1RF N434A)はとともに、ヒト s c i d インビボモデルにおいて有意なB細胞生存の阻害と枯渇を示した。このモデルはインビボADC C及びBAFF生存遮断を試験しているので、両A bは、ヒトのB細胞成分を有する自己免疫性疾患及びB細胞悪性腫瘍を治療する際の十分な性質及び能力を有する。

【0313】

実施例16 FcRn結合

E U番号付けシステムに従って、9.1RF IgG抗体(配列番号74及び75)の残基N434を変異させ、ヒトFcRnレセプターに対する結合を亢進させた。IgG抗体はCHO細胞で生産された。

BIAcore-3000システム(BIAcore Inc.)を使用して、9.1RF及びその突然変異体の結合親和性を決定した。製造者の指示に従って、10mM酢酸ナトリウム、pH4を用いて、ヒト及びカニクイザルのFcRnをアミンカップリングを介してCM5チップに固定した。カップリングは25で行った。最終的な密度は700-1000RUに達した。

25で20μl/分の流速を用いて、pH6のランニングバッファ(PBS pH6, 0.05% Tween-20)に3倍に段階希釈した9.1RF又はその突然変異体を2分間注入することによって、動態学的な測定を行った。用いた最大濃度の抗体は1μMであった。解離速度は10分かけて測定した。結合活性を最小限にした10mMトリスpH9、150mM NaClを20μl注入して表面を再生した。結果をka、kc及びKD_aの値として表15に示した。

25で2μl/分の流速を用いて、ランニングバッファに3倍に段階希釈した9.1RF又はその突然変異体を6分間注入することによって、平衡結合実験を行った。解離は2分間続けた。用いた最大濃度の抗体は1μMであった。平衡結合実験のランニングバッファは、PBS pH6, 0.05% Tween-20又はPBS pH7.4, 0.0% Tween-20のいずれかとした。10mMトリスpH9、150mM NaClを20μl注入して表面を再生した。センサーグラムは、BIAevaluation v3.2ソフトウェアを用いて評価した。結果をKD値(KD_b)として以下の表15と図36に示した。

【0314】

まとめると、結果から、pH6.0及びpH7.4において、9.1RFのN434A及びN434W突然変異体が、9.1RFよりヒトFcRn及びカニクイザル(cyno)FcRnに対する親和性が大きかったことが示された。さらに、pH6.0及びpH7.4において、N434W突然変異体は、N434A突然変異体よりヒトFcRn及びカニクイザル(cyno)FcRnに対する親和性が大きかった。このデータから、いずれの突然変異体も、9.1RFのFc配列を有する抗体と比較して、インビボ半減期が長く、ヒト及びカニクイザルのFcRnレセプターに対する親和性が亢進していることが示唆された。

表15

10

20

30

40

タンパク質	k_a ($\times 10^5$ M $^{-1}$ s $^{-1}$)	k_c ($\times 10^{-2}$ s $^{-1}$)	pH 6.0 の KD _a (nM)	pH 6.0 の KD _b (nM)
huFcRn				
9.1 RF	6.35	7.84	123	117.8 ± 14.0
N434A	8.84	4.67	52.8	66.6 ± 11.4
N434W	43.1	1.02	2.37	5.8 ± 1.4
cynoFcRn				
9.1RF	10.1	19.2	191	185.8 ± 13.7
N434A	17	9.62	56.5	62.7 ± 6.9
N434W	47.4	1.44	3.03	5.1 ± 0.9

【 0 3 1 5 】

実施例 17 Fc 受容体結合

過去に記載されているように(Shields, R.L. 等, (2001) JBC 276:6591-6604)、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインを欠き、そのC末端にHisタググルタチオントランスフェラーゼ(GST)を含有するヒトFc Rs(以降hFcgrとも称する)を調整した。

MaxiSorp 96 ウェルマイクロウェルプレート(Nunc, Roskilde, Denmark)を、2 ug / m1 の抗GST(クローン 8 E 2.1.1、Genentech)を含む 100 ul / ウェルの 50 mM 炭酸塩バッファ、pH 9.6 にて、4 度終夜コートした。0.05% ポリソルベート、pH 7.4 を含有する PBS(洗浄バッファ)にてプレートを洗浄し、0.5% BSA、pH 7.4 を含有する PBS(150 μl / ウェル)にてブロックした。プレートを室温で 1 時間インキュベートした後、洗浄バッファにて洗浄した。0.25 ug / m1 のヒトFc レセプターを含む 0.5% BSA、0.05% ポリソルベート 20, pH 7.4 を含有する PBS(アッセイバッファ)をプレートに加えた(100 ul / ウェル)。プレートを 1 時間インキュベートした後、洗浄バッファにて洗浄した。低親和性Fc レセプターIIa、IIb、III(F158)及び高親和性III(V158)のために、抗体をヤギF(ab')₂抗(Cappel, ICN Pharmaceuticals, Inc., Aurora, Ohio)又は抗(BioSource, Camarillo, CA)抗体とともに、1:2 (w/w)の比で 1 時間インキュベートして、抗体複合体を形成させた。アッセイバッファで 2 倍に段階希釈した 11 つの複合体 IgG 抗体(3 倍の段階希釈液中では 1.17 - 50000 ng / m1)をプレートに加えた。高親和性Fc RIのために、アッセイバッファで 2 倍に段階希釈した 11 つの非複合体 IgG 抗体(3 倍の段階希釈液中では 0.017 - 1000 ng / m1)をプレートに加えた。プレートを 2 時間インキュベートした後、洗浄バッファにて洗浄した。結合した IgG は、ペルオキシダーゼ標識ヤギF(ab')₂抗ヒトIgG F(ab')₂(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA)を含むアッセイバッファを 100 μl / ウェルで加えて検出した。1 時間インキュベートした後、プレートを洗浄バッファにて洗浄し、基質 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン(TMB)(Kirkegaard & Perry Laboratories)を 100 μl / ウェルで添加した。1 M リン酸を 100 μl / ウェルで加えることによって反応を止めた。450 nm の吸光度を multiskan Ascent 読取り機(Thermo Labsystems, Helsinki, Finland)にて読み取った。

【 0 3 1 6 】

標準曲線(n g / m1 に対する mid-OD)の中央値の吸光度を算出した。mid-OD の標準物質と試料の対応する濃度を、4-パラメータ非線形回帰曲線フィッティングプログラム(KaleidaGraph, Synergy software, Reading, PA)を用いた滴定曲線から決定した。標準物質の mid-OD 濃度を試料の mid-OD 濃度で除することによって相対的な活性を算出した。ハーセプチン(登録商標)は既に Fc レセプターを結合することが示されているので、この実験ではポジティブコントロールとして用いた。

すべての Fc R について、示された結合値は 9.1 RF と比較した各 9.1-RF 変異

体の結合であり、(A_{450nm}(変異体) / A_{450nm(9.1RF)})は、FcRII及びFcRIIIAに対しては0.33又は1μg/mlであり、FcRIに対しては2μg/mlであった。1以上の値は、変異体の結合が9.1RFと比較して改善されたことを意味し、1未満の比は9.1RFと比較して結合が減少していることを意味する。hFcRII(F158)及びhFcRIII(V158)は、それぞれ、ヒトIgGに対してより低い親和性及びより高い親和性のhFcRIIIアイソタイプであることを意味する。

表16及び図37から、試験した9.1抗BR3抗体が複数のFcRを同様に結合して、ADCを促進することが示された。

表16

抗体	hFcgRI	hFcgRIIa	hFcgRIIb	hFcgRIII(F158)	hFcgRIII(V158)
ハーセプチン®Ab	1.02	0.54	0.62	0.51	0.80
9.1-RF	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
9.1-RF N434A	0.97	0.66	0.45	0.42	0.58
9.1-RF N434W	1.00	0.64	0.40	0.24	0.51

【0317】

実施例18 抗CD20及び抗BR3抗体によるB細胞枯渇

6週齢のヒトCD20トランスジェニック陽性マウスを、200μgのmIgG2a(コントロール)、又はm2H7(マウス抗ヒトCD20抗体)又はmV3-1にて処置した(ip)。抗体処置の1時間、1日、8日及び15日後に血中のB細胞を分析した。血液、リンパ節のB細胞をフローサイトメトリーによって分析した。データを平均+/-標準偏差(n=4)として表した。

初期(1時間後)及び1日後では、抗CD20抗体は抗BR3抗体よりも多くの細胞を枯渇したが、8日及び15日後には、抗BR3抗体による枯渇は抗CD20抗体による枯渇を上回った。図38は血液及びリンパ節におけるB細胞レベルの処置後の分析を示す。

【0318】

実施例19 濾胞性B細胞及び周辺帯B細胞の枯渇

6週齢のヒトCD20トランスジェニック陽性マウスを、200μgのmIgG2a(コントロール)、又はm2H7(マウス抗ヒトCD20)又はmV3-1にて処置した(ip)。mAb処置の1日、8日及び15日後に血中のB細胞を分析した。脾臓のB細胞をフローサイトメトリーによって分析した。脾臓の濾胞性(FO-CD21+CD23+)又は周辺帯(MZ-CD21highCD23low)の絶対数を3処置間で比較した。データを平均+/-標準偏差(n=4)として表した。

濾胞性B細胞及び周辺帯B細胞のいずれにおいても、1日後では、抗CD20抗体は抗BR3抗体よりも多くの細胞を枯渇したが、8日及び15日後には、抗BR3抗体による枯渇は抗CD20抗体による枯渇を上回った(図39)。

【0319】

実施例20 カニクイザルにおける半減期

FcRnに対して異なる結合能親和性を有する3つのヒト化モノクローナル抗-BR3抗体(9.1RF、9.1RF N434A及び9.1RF N434W)の薬物動態を、カニクイザルにおいて比較した。17匹の雄と17匹の雌の4-5歳、体重2-4kgのカニクイザル(Macaca fascicularis)を体重によって3つのグループにランダムに分けた。グループ1、2及び3の動物に、それぞれ野生型、N434A変異体又はN434W変異体を20mg/kg単回IV用量で投与した。実験構成は以下の通りである。

グループ	No./Sex	試験物質	Route	投与レベル (mg/kg)	投与濃度 (mg/mL)	投与容積 (mL/kg) ^a
1	5/M, 5/F	野生型	IV	20	20	1
2	5/M, 5/F	N434A	IV	20	20	1
3	5/M, 5/F	N434W	IV	20	20	1

10

^a 総用量容積(mL)は最も新しく測定した体重に基づいて算出した。用量容積はほぼ0.1mLとした。

【0320】

薬物動態の分析のために、以下の時間点で各動物の末梢静脈からおよそ1.0mLの血液を採取した：

- ・プレ投与
- ・実験第1日目には、投与後30分と6時間
- ・実験の第2、3、4、5、8、11、15、18、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92、99、106、113、120、127及び134日目

20

抗治療的抗体の分析のために、以下の時間点で各動物の末梢静脈からおよそ1.0mLの血液を採取した：

- ・プレ投与
- ・実験の第15、29、43、57、71、85、99、113、127及び134日目

【0321】

薬物動態(PK)及び抗治療的抗体(AT)分析のための血液サンプルを血清分離器チューブに回集し、室温でおよそ30-80分間凝固させた。血清(およそ0.5mL)を遠心(2000×g、室温で15分間)して得た。血清試料を予めラベリングした1.5mLのエッペンドルフチューブに移し、分析までドライアイスに置くまで-60~-80の温度を維持する冷凍庫に貯蔵した。

30

各々の血清試料中の各抗体の濃度をELISAアッセイを用いて決定した。血清中の定量化的アッセイ下限(LLQ)は0.05ug/mLである。この下限以下の値を検出可能以下(LTR)と記録した。ブリッジングELISAアッセイを用いて各試料中の抗治療的抗体を測定した。

投薬計画から大きく異なる試料収集時間と予定通りの用量をデータ分析に用いた。雌雄カニクイザルの血清9.1RF、9.1RFN434A及び9.1RFN434W濃度の平均とSDを、エクセル(バージョン2000, Microsoft Corporation, Redmond, WA,)を用いて算出して、SigmaPlot(バージョン9.0; Systat Software, Inc., Point Richmond, CA)を用いてプロットした。検出可能以下の血清濃度はすべてのデータ分析から除いた。n=2とき、SDは算出しなかった。結果を3つの重要な図に示す。

【0322】

1 over y hat weighting scheme (WinNonlin Version 3.2; Pharsight Corporation; Mountain View, CA)によるGauss-Newton (Levenberg and Hartley) 2区画モデルを用いて各動物のPKパラメータを算出した。グループ1(野生型; 9.1RF)の10匹のカニクイザルのうちの8匹とグループ3(9.1RFN434W)の10匹のカニクイザルのうちの5匹は、第57日目までにATを示した。総じて、特定の時間でのATの検出は、その時間又はその時間の後の血清濃度の明らかな下降と相關しており、その結果、最終的に半減期が短くなり、薬物曝露が減少した。PK上のAT応答の効果の大きさを理解するために、2つの方法を用いて各グループの平均PKパラメータを算出した。方法1では、各グループの10匹すべてのカニクイザルのデータからPKパラメータ(平均±標準偏

40

50

差)を算出した。方法2では、第57日目までに抗治療的抗体を産生しないカニクイザルのみのデータを用いてPKパラメータを算出した(グループ1ではn=2、グループ2ではn=10及びグループ3ではn=5)。グループ1及びグループ3では、方法1は予測される最終的な半減期($t_{1/2}$)はより低くなり、曝露(AUC)は方法2に匹敵した。しかしながら、2つの方法を用いた全体の結果は類似していた。したがって、本実験で報告した平均PKパラメータは方法1を用いて算出した(例えばすべてのカニクイザルのデータを含む)。

【0323】

結果

20mg/kgの9.1RF(野生型抗体)、9.1RFN434A(N434A変異体)及び9.1RFN434W(N434W変異体)の単一のIV食物塊ボーラス投与後に、血清濃度は、より遅い排出相(図1)が続く急速な初期分布相の後に遅延型の排出相が起こる二相性の傾向を示した(図1)。各グループの算定されたPKパラメータを表2に示し、各グループの10匹すべてのカニクイザルのデータを含む。9.1RF(野生型抗体)の最終半減期(平均±SD)は6.15±2.01日であり、10匹のカニクイザルでは4.24から11.0日の範囲であった。第57日目までにATAを産生しなかった2匹のカニクイザルの9.1RFの平均最終半減期($t_{1/2}$)は、8.95日であった。9.1RFN434A(N434A変異体)について、平均最終半減期は14.1±1.55日であり、9.1RF($p < 0.05$)の平均最終半減期より大きい1.6-2.3倍であった。9.1RFN434W(N434W変異体)について、10匹のカニクイザルの平均±SD最終半減期は9.55±2.49日であった。この値は、10匹のカニクイザル($p < 0.05$)において、9.1RF(野生型抗体)の全体の平均 $t_{1/2}$ より有意に大きいが、検出可能なATAを産生しなかった2匹のカニクイザルにおいては9.1RFの平均 $t_{1/2}$ に非常に近かった(8.95日)。9.1RF(野生型抗体)と9.1RFN434W(N434W変異体)との間で観察された $t_{1/2}$ の相違はこれら2つのグループにおいてATA応答により混乱されるようである。

9.1RF(野生型抗体)の無限に推定される濃度-時間曲線下の領域(AUC)は2440±398日*ug/mLであり、10匹のカニクイザルでは1740から3140日*ug/mLまで変動する。第57日目までにATAを産生しなかった2匹のカニクイザルの9.1RFの平均AUCは、2850日*ug/mLであった。9.1RFN434A(N434A変異体)については、平均AUCは4450±685日*ug/mLであり、9.1RF(野生型抗体)($p < 0.05$)の平均AUCより1.6-1.8倍大きかった。9.1RF(野生型抗体)と9.1RFN434WのAUCに相違はなかった。

【0324】

要約すると、9.1RF、9.1RFN434A及び9.1RFN434Wの薬物動態は、カニクイザルに20mg/kgを単回IV投与した後に調べた。第56日目までに10匹のカニクイザルのうち8匹が9.1RFに対する抗治療的抗体(AT)を産生したのに対して、第56日目までに10匹のカニクイザルのうちの5匹が9.1RFN434Wに対するATAを産生した。第56日目までに9.1RFN434Aに対するATAを産生したカニクイザルはいなかった。9.1RFN434Aは、9.1RF(野生型抗体)($p < 0.05$)と比較して、増加した最終半減期及び増加したAUCを示した。9.1RFN434Wは、9.1RFと比較して最終半減期のわずかな増加を示した；しかしながら、この観察された相違は9.1RFと9.1RFN434Wの両方に対する抗治療的抗体応答により混乱されるようである。

10

20

30

40

PK パラメータ	WT*	9.1RFN434A	9.1RFN434W
$t_{1/2,\beta}$ (days): (範囲)	平均 ± SD (4.24 – 11.0)	6.15 ± 2.01 (12.3 – 16.5)	14.1 ± 1.55** (6.86 – 15.0)
AUC (day*ug/mL): (範囲)	平均 ± SD (1740 – 3140)	2440 ± 398 (3390 – 5560)	4450 ± 685** (1500 – 2770)

* WT 及び 9.1RFN434W グループの 8 / 10 及び 5 / 10 のカニクイザルにおける抗薬剤抗体の存在は、WT 及び 9.1RFN434W の PK パラメータを混乱しうる(例えば、AUC を減少して、 $t_{1/2,\beta}$ を減少する)。

** WT との相違、 $p < 0.05$ 。

【0325】

実施例 21 カニクイザルにおける B 細胞の枯渇

抗 B R 3 (WT と称する 9.1RF) 及び F c R n 変異体 N434A (9.1RF N434A と称する)。51 匹のカニクイザルに、以下の研究設定に従って WT 又は 9.1RF N434A を投与した。

N	投与計画	用量 (mg/kg)	4週 剖検	8週 剖検	回復 剖検
21	プラセボ IV x 4 週; 1 用量/週	0 x 4	4 週; N=11	8 週; N=6	回復; N=4
5	WT IV x 4 週; 1 用量/週	2 x 4	4 週; N=5	---	---
16	WT IV x 4/8 週; 1 用量/週	20 x 4 20 x 8	4 週; N=6	8 週; N=6	回復; N=4
9	9.1RFN434A IV x 4 週; 1 用量/週	20 x 4	4 週; N=5	---	回復 N=4

【0326】

すべてのグループにおいて、FACS により末梢 B 細胞(総 B 細胞及び B 細胞サブセット)枯渇を時間とともにモニターして、個々の動物標準のパーセンテージとして表した。標準の値は、各動物についてのプレ投与試料採取時間の平均とした。組織 B 細胞サブセットは、各死体解剖時間点で FACS 分析によって分析した。B 細胞枯渇について分析される組織は、脾臓、下頸軟骨リンパ節及び腸間膜リンパ節を含む(図 40A 及び B)。

投与後、すべての投与グループの血液において、有意な B 細胞の枯渇が観察された。20 mg / kg × 4 用量を投与した WT 及び 9.1RFN434A グループにおいて、第 29 日目(死体解剖時間点)には組織 B 細胞が枯渇していた。WT 2 mg / kg においては、組織の B 細胞枯渇は明らかでなかった。図 41A - C は、処置後の B 細胞の亜細胞集団を示す。

【0327】

実施例 22 亢進した ADC C 活性を有する抗 B R 3 抗体

抗 B R 3 抗体 9.1RF の F c 部分のアミノ酸置換は、B 細胞腫瘍株に対して分子の ADC C 活性を上げるように設定した。部位特異的突然変異によって、抗体の F c 領域を以下の通りに変異させた: S298A / K326A / E333A / K334A 又は S298A / E333A / K334A (EU 番号付けシステム)。アミノ酸置換を特定するオリゴヌクレオチドを化学的に合成し、Kunkel 等 (Methods in Enzymology (1987) 154, 367-382

10

20

30

40

50

)のプロトコールに従って、9.1RFをコードするプラスミドのオリゴヌクレオチド誘導性突然変異誘発に用いた。変異体配列をジデオキシヌクレオチドベースの配列決定法によって確認した。Qiagen, Inc.により記載されるgigaprepプロトコールを用いて、DNAを1Lの大腸菌XL-1ブルー(Stratagene, Inc.)の培養物(50μg/mlカルベニシリンを含有する2YT培地)から精製して、適切なプラスミドを用いて形質転換して、200RPMで振とうしながら37℃で生育させた。タンパク質は、CHO細胞を一過性に形質移入するための精製されたプラスミドDNAを用いて発現した。プロテインAセファロースのクロマトグラフィの後にSP-セファロースのカチオン交換クロマトグラフィを用いて、1Lの培養物上清から抗体を精製した。精製したタンパク質は、SDS-PAGEとアミノ末端配列決定法によって確認した。精製したすべての抗体は、分析用のゲル濾過クロマトグラフィで均一なピークを示し、このピークは静的光散乱(static light scattering)データからモル質量が150000±5000、3%以下の凝集含量であると算出された。MALDI-TOF(表2)によるN結合オリゴ糖の分析から、炭水化物組成が典型的な組換え抗体であることが示された。

10

【0328】

Fcレセプターに対する変異体抗体の結合は、ELISAベースのアッセイを用いて評価した。Shields等(J. Biol. Chem. 276:6591-6604(2001))に記載のように、ヒトFcレセプターI、IIa、IIb、IIIa(F158)、IIIa(V158)及びマウスFcレセプターI、II及びIIIの細胞外ドメインをCHO細胞でHis-タグ付加GST融合タンパク質として発現させ、精製した。ELISAアッセイのために、融合タンパク質を、抗GST抗体でコートしたマイクロタイヤープレートのウェルに結合(capture)させた。希釈した変形抗体を加え、結合させた後にウェルを洗浄して結合していない抗体を除去した。弱い結合抗体の場合、試料を抗hu鎖抗体のFab'2断片と複合体化した後に試料をウェルに添加した。結合した抗体は、ヤギ抗huFab'2抗体のHRP結合Fab'2断片により検出した。4-パラメータ方程式を用いて結合曲線を評価して、飽和状態で観察されるシグナルの50%を示す抗体の濃度であるEC50値を算出した。これらの実験ではハーセプチン(登録商標)をコントロール抗体として用いて、結合の倍数的な改善をEC50値の比(EC₅₀ハーセプチン/EC₅₀試料)から算出した。

20

【0329】

20

抗体	ヒト					マウス		
	I	IIa	IIb	IIIa (F158)	IIIa (V158)	I	II	III
9.1	1.0	2.3	0.7	2.3	1.6	1.2	0.7	0.8
S298A/K326A/E333A/K334A	0.6	0.2	0.7	25	9.2	1.9	1.3	1.2
S298A/E333A/K334A	0.7	0.2	0.4	18	6.9	2.5	0.4	0.6

30

これらのデータから、すべての抗BR3変異体はヒトFcR_II_IaのF158及びV158アロタイプの両方に対する親和性が増加したことが示された。すべての変異体はヒトFcR_Iに対する親和性にわずかな変化があった。

40

【0330】

乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)読み取りを使用して、基本的には記載されているように(Shields等, J. Biol. Chem. 276:6591-6604(2001))、BR3とCD20を発現するバーキットリンパ腫株であるBJAB細胞のナチュラルキラー細胞(NK細胞)溶解を媒介する、抗BR3抗体の能力(ADC活性)についてアッセイした。CD16のF/V158アロタイプについて異種接合性であるドナーから単離したNK細胞を、5:1のエフェクター:標的比でアッセイに用いた。RosetteSep(登録商標)ヒトNK細胞エンリッチメント混合液(StemCell Technologies, Vancouver, B.C.)を用いて、製造者の指示に従って、100mLのヘパリン処理血液からNK細胞を調製した。血液を等量のリン酸緩衝食塩水にて希釈して、15mlのFicoll-PaqueTM(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)にて

50

層状にして、1450 RPMで20分間、遠心分離した。層間界面の白血球を4本の清浄な50mLチューブに分配し、そのチューブを15%胎仔ウシ血清を含む RPMI培地で満たした。チューブを1450 RPMで5分間遠心分離し、上清を捨てた。NK細胞をアッセイ培地(グリシンなしのF12/DMEM 50:50、1mM HEPESバッファ pH 7.2、ペニシリン/ストレプトマイシン(100単位/mL; Gibco)、グルタミン、及び1%熱不活性化胎仔ウシ血清)にて 2×10^6 細胞/mLに希釈した。

アッセイ培地にて段階希釈した抗体(0.05mL)を、96ウェルの丸底組織培養プレートに加えた。BJAB細胞をアッセイバッファで 4×10^5 /mLの濃度まで希釈した。BJAB細胞(ウェル当たり0.05mL)を96ウェルプレート中で希釈した抗体と混合し、室温で30分間インキュベートして、BR3への抗体の結合を可能にした(オプソニン作用)。

10

20

30

【0331】
各ウェルに0.05mLのNK細胞を添加してADCC反応を開始させた。コントロールウェルでは、2% Triton X-100を添加した。ついで、プレートを37℃で4時間インキュベートした。細胞障害性(LDH)検出キット(キット番号1644793, Roche Diagnostics, Indianapolis, Indiana)を製造者のプロトコールに従って使用して、放出されたLDHのレベルを測定した。0.1mLのLDH展開液を各ウェルに加えた後、10秒間混合した。ついで、プレートをアルミフォイルで覆い、室温で15分暗所でインキュベートした。ついで、490nmでの光学密度を読み取り、コントロールウェル中で測定した全LDHで除することによって%溶解を計算するために使用した。溶解を抗体濃度の関数としてプロットし、4-パラメータ曲線フィッティング(KALEIDAGRAPH)を用いてEC₅₀濃度を決定した。

すべての抗BR3変異体はADCCアッセイにおいて活性であり、1nM未満のEC₅₀値(%殺害対抗体濃度)を示した。Fc置換により、EC₅₀の低下による9.1と相關した作用強度(データは示さない)と最大%殺害が増加した。S298A/K326A/E333A/K334A突然変異体は、9.1wt(相対的なEC₅₀値)と関連して、このアッセイにおいては3倍以上のADCC活性を有した。S298A/E333A/K334A突然変異体は、9.1wt(相対的なEC₅₀値)と関連して、このアッセイにおいては2.8倍以上のADCC活性を有した。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0332】

【図1】カバット番号付けシステムに従って番号付けした2.1移植抗BR3抗体の可変ドメイン配列。太字は、ヒトコンセンサスIII配列と比較したときのR71A、N73T及びL78Aの変異を示す。下線部は、CDR配列(H1、H2、H3、L1、L2及びL3)を含む領域を示す。

【図2】カバット番号付けシステムに従って番号付けした9.1移植抗BR3抗体の可変ドメイン配列。太字は、ヒトコンセンサスIII配列と比較したときのR71A、N73T及びL78Aの変異を示す。下線部は、CDR配列(H1、H2、H3、L1、L2及びL3)を含む領域を示す。

40

【図3】カバット番号付けシステムに従って番号付けした11G9移植抗BR3抗体の可変ドメイン配列。下線部は、CDR配列(H1、H2、H3、L1、L2及びL3)を含む領域を示す。太字は、ヒトコンセンサスIII配列と比較したときのR71A、N73T及びL78Aの変異を示す。

【図4】9.1移植抗BR3抗体のCDR領域をある程度ランダム化して選別した結果を示す。列挙した抗体の可変ドメインは、示したL2及びH1領域内の残基変異を除いて、9.1移植可変ドメイン配列と同じである。

【図5】マウスVHフレームワーク領域とヒト「RF」及び「RL」フレームワーク配列との比較。

【図6】修飾したフレームワークを有する移植Fabによる抗原結合を示す。

【図7】ラウンド5での2.1-RL及び2.1-RF CDR修復ライブラリから選別した

50

配列。列挙した抗体の可変ドメインは、示したH3領域内の残基変異を除いて、2.1-R L又は2.1-R F可変ドメイン配列と同じである。

【図8】ラウンド5での9.1-R L及び9.1-R F CDR修復ライブラリから選別した配列。列挙した抗体の可変ドメインは、示したH1領域内の残基変異を除いて、9.1-R L又は9.1-R F可変ドメイン配列と同じである。

【図9】ラウンド5での11G9-R F CDR修復ライブラリから選別した配列。列挙した抗体の可変ドメインは、示したH1、H2及びH3領域内の残基変異を除いて、11G9-R F可変ドメイン配列と同じである。

【図10】選別した抗BR3ヒト化MAbのBIACore分析。

【図11】(A)マウスBR3 ECDを有するポリペプチド又は(B)ヒトBR3 ECDを漸増した溶液中で結合した選別されたF(ab)'2ファージクローンについての溶液結合競合ELISAの結果を示す。

【図12】カバット番号付けシステムに従って番号付けしたファージ由来抗BR3抗体のアミノ酸配列。「LN」は残基番号95-102の間とそこに含まれる残基の番号を示す。「#」はクローンがスクリーニングで選別された回数を示す。「クローン」は受託されたファージクローン番号を示す。CDR-H2の残基I51、P52a、G55、T57は示さない。各抗体を含む残りの残基(1-23、35-49、57-88及び98-107)は図15のV3に記載される通りである。「X」は配列が不明であることを示す。

【図13】溶液結合競合ELISAを用いて選別したF(ab)'2ファージのIC50値と、BAFF存在下でのmBR3又はhBR3の細胞外ドメインに結合したF(ab)'2ファージの割合。

【図14】BAFFの濃度を漸増したときのmBR3-FcコートウェルへのF(ab)'2ファージ結合の阻害を示すELISAアッセイ。

【図15】カバット番号付けシステムに従って番号付けしたファージ由来V3抗BR3抗体の可変ドメイン配列。

【図16】(A)V3由来クローンの配列、(B)F(ab)'2ファージのIC50値とハイブリッドmBAFFによるBR3への結合プロッキング。LC-CDR2の残基51(A)、52(S)及び54(L)は示さない。

【図17】V3-1由来クローンの残基とそのIC50値を示す。

【図18】親和性改善V3-46sファージクローンと、マウス及びヒトのBR3への結合についてのファージIC50値を示す。示したアミノ酸は、カバット番号付けシステムに従って、配列番号194-207の残基番号27-32('L1')、49-55('L2')及び88-94('L3')である。

【図19】BJAB細胞への抗BR3 mAbの競合的及び直接的な結合を示す。(A)BAFF競合的結合アッセイ。(B)直接的結合アッセイ。アイソタイプコントロールは結合を示さず、検出抗体はマウスIgG1、IgG2a及びIgG2bに等しく結合した。

【図20A-B】BJAB細胞(ヒトBR3)へのV3-1m及びB9C11結合による競合的及び直接的な結合アッセイの結果を示す(それぞれA及びB)。

【図20C-D】BHK細胞(マウスBR3)へのV3-1m及びB9C11結合による競合的及び直接的な結合アッセイの結果を示す(それぞれC及びD)。

【図21A-B】抗ヒトBR3 mAb特徴付けについての競合的ELISAを示す。示した濃度のmAbを一定量のビオチン化mAb9.1(A)又は2.1(B)とともにインキュベートした。

【図21C-D】抗ヒトBR3 mAb特徴付けについての競合的ELISAを示す。示した濃度のmAbを一定量のビオチン化11G9(C)又は1E9(D)とともにインキュベートした。

【図22】マウスBR3へのV3-1m、B9C11及びP1B8の競合的結合を示す。ビオチン化V3-1m(A)とビオチン化B9C11(B)を用いて競合的ELISAを行った。

【図23】抗体2.1、11G9及び9.1が2つの異なるドナーのB細胞の増殖を阻害したことを示す(それぞれA及びB)。

10

20

30

40

50

【図24】抗体V3-1mが(A)抗IgM(5ug/ml)+BAFF(2ng/ml)又は(B)抗IgM(5ug/ml)+BAFF(10ng/ml)により刺激されたB細胞増殖を阻害したことを示す。

【図25】9.1-RFがBAFF依存性のヒトB細胞増殖をブロックし、アゴナイズしなかったことを示す。(A)抗IgM+BAFF+9.1-RFにて処理したヒト一次B細胞。(B)抗IgM+9.1-RFにて処理したヒト一次B細胞。

【図26】2.1-46がB細胞増殖を刺激したことを示す。(A)抗IgM+BAFF+2.1-46にて処理した細胞。(B)抗IgM+2.1-46にて処理した細胞。

【図27】ショットガンa1aスキャニング結果に基づくBR3と抗体11G9、2.1、9.1及びV3-1との相互作用の様々な位置の図解を示す。丸で囲んだ残基はO結合グリコシル化の起こりうる部位を示す。 10

【図28】B細胞マーカに対する抗体を用いた、慢性リンパ急性白血病(CLL)患者の末梢血におけるB細胞集団を示す。A、C及びDは、抗CD19抗体と、抗CD27抗体、抗CD20抗体又は抗CD5抗体の何れかを用いたFACS分析を示す。Bは、悪性の集団におけるBR3発現を示す棒グラフである。囲みは悪性の集団を示す。

【図29A-B】ヒト化抗BR3抗体と(A)BJAB細胞及び(B)Ramos細胞を用いたADC活性アッセイの結果を示す。

【図29C】ヒト化抗BR3抗体と(C)WIL2s細胞を用いたADC活性アッセイの結果を示す。

【図30】V3-1、BR3-Fc又はコントロール抗体による処理の7日後の血液(A-C)、リンパ節(D-F)及び脾臓(G-I)中のマウスB細胞のフローサイトメトリー分析を示す。 20

【図31】V3-1、BR3-Fc又はコントロール抗体による処理後第1日目、第3日目、第7日目及び第15日目の(A)1mlの血液に含有するマウスB細胞の絶対数；(B)リンパ節中のB細胞の%；(C)濾胞性B細胞(FO-CD21+CD23+)の絶対数又は(D)脾臓中の周辺帯B細胞(MZ-CD21high CD23low)を示す。

【図32A】コントロール抗体、BR3-Fc又はV3-1による処理後第15日目のマウスのB細胞集団を示す。(A)処理後のマウスの脾臓又はパイエル板におけるB細胞集団のFACS分析。

【図32B】コントロール抗体、BR3-Fc又はV3-1による処理後第15日目のマウスのB細胞集団を示す。(B)処理後の脾臓における形質芽細胞の棒グラフ。 30

【図32C】コントロール抗体、BR3-Fc又はV3-1による処理後第15日目のマウスのB細胞集団を示す。(C)処理後のパイエル板における胚中心細胞の棒グラフ。

【図33】ADC活性とBAFFブロッキング能を有する抗BR3抗体、非ブロッキング抗BR3抗体、Fc欠損変異体抗BR3抗体又はBR3-Fcを用いた処理後第6日目のBALB/cマウスの血液(A)及び脾臓(B)におけるB細胞の減少を示す。

【図34】抗BR3抗体、mV3-1、mBR3-Fc及びコントロール抗体によるNZB×WF1マウス(ループス腎炎モデル)の処置の結果を示す。(A)コントロールマウスと比較したときの抗BR3抗体処置マウスとBR3-Fc処置マウスの時間的減少経過を示す。(B)BR3-Fc($p<0.01$)、コントロール($p<0.03$)及びmV3-1($p<0.001$)で処置したマウスの血液1ml当たりのB細胞数を示す。(C)BR3-Fc、コントロール及びmCB1で処理したマウスの脾臓当たりのB細胞の総数を示す($p<0.00001$)。(B)の横線と(C)はグループの平均レベルを示す。データは個々のマウスのデータポイント($n=25$)として表す。 40

【図35A-C】示したように(第4日目)ヒトPBM C及び抗BR3抗体又はmBR3-Fcで処理したSCIDモデルマウスにおけるB細胞枯渇を示す。(A)活性化/GC B細胞の割合(CD19hi/CD38int)、(B)活性化/GC B細胞の数、(C)形質芽細胞の割合(CD19lo/CD38hi/CD139neg)。

【図35D-E】示したように(第4日目)ヒトPBM C及び抗BR3抗体又はmBR3-Fcで処理したSCIDモデルマウスにおけるB細胞枯渇を示す。(D)形質芽細胞の数、 50

(E)活性化 / G C 細胞の割合(CD19hi/CD38+).

【図36】平衡状態(pH6.0及びpH7.4)のヒト又はカニクイザル(cyno)のFcRnへの9.1RF(A)、9.1RFN434A(B)及び9.1RFN434W(C)抗体の結合を示す。Reqは平衡状態のチップからの反応単位の数である。

【図37A-B】抗BR3抗体又はハーセプチン(登録商標)抗体(ポジティブコントロール)へ結合するFcレセプターを用いたELISAアッセイを示す。A:FcRⅠ。B:FcRⅠⅠA。

【図37C-D】抗BR3抗体又はハーセプチン(登録商標)抗体(ポジティブコントロール)へ結合するFcレセプターを用いたELISAアッセイを示す。C:FcRⅠⅠB。D:FcRⅠⅠⅠ(F158)。

【図37E】抗BR3抗体又はハーセプチン(登録商標)抗体(ポジティブコントロール)へ結合するFcレセプターを用いたELISAアッセイを示す。E:FcRⅠⅠⅠ(V158)。

【図38A】抗CD20抗体(2H7)処置に対する抗BR3抗体(V3-1)処置の1時間後、第1日目、第8日目又は第15日目の血液中のB細胞レベルの分析。

【図38B】抗CD20抗体(2H7)処置に対する抗BR3抗体(V3-1)処置の1時間後、第1日目、第8日目又は第15日目のリンパ節中のB細胞レベルの分析。

【図39A】抗CD20抗体処置に対する抗BR3抗体(V3-1)処置の第1日目、第8日目又は第15日目の濾胞性B細胞中のB細胞レベルの分析。

【図39B】抗CD20抗体処置に対する抗BR3抗体(V3-1)処置の第1日目、第8日目又は第15日目の周辺帯B細胞中のB細胞レベルの分析。

【図40】9.1RFで処置したカニクイザルの血液(A)及び組織(B)中のB細胞枯渇を示す。データはATA-サルのものである(20mg/kgで処置した5匹のカニクイザル; 2mg/kgで処置した3匹のカニクイザル)。

【図41】9.1RF又は9.1RFN434Wで処置したカニクイザルの血液中のB細胞集団のレベルを時間の経過とともに示す。(A)CD20+/CD21+細胞、(B)CD21+/CD27+細胞及び(C)CD21+/CD27-細胞。

【図1】

2.1 移植片-可変軽鎖領域

23
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S E S V D D Y
 35
G I S F M H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y R A S D L E S G V P S
 49
 R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T S
 88
98
K D P W T F G Q G T K V E I K
 107

2.1 移植片-可変重鎖領域

25
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G D S I T R G
 36
Y W N W V R Q A P G K G L E W V G Y I N Y S G T T Y Y N P S L K
 48
 66
S R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
 93
 103
T P H T Y G A M D Y W G Q G T L V T V S S
 113

【図2】

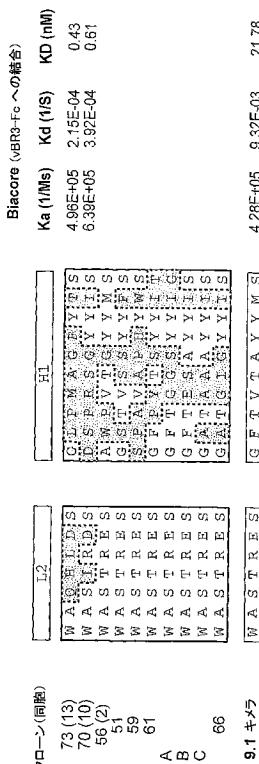
9.1 移植片-可変軽鎖領域

23
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K S S Q S L L Y S
 35
S N Q N N Y L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y W A S T R E S G V
 49
 57
 88
 P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 98
99
Y Y T Y P Y T F G Q G T K V E I K
 107

9.1 移植片-可変重鎖領域

25
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T V T A Y
 36
Y M S W V R Q A P G K G L E W V G F I R D K A N G Y T T E Y N P
 48
 66
S V K G R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y
 93
 98
Y C A Q V R R A I D Y W G Q G T L V T V S S
 103
 113

【図4】



【図3】

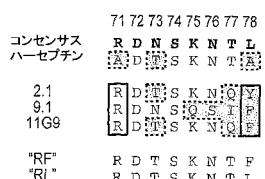
11G9 移植片-可変軽鎖領域

23
 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R S S Q S L V H S
 35
N G N T Y L H W Y Q Q K P G K A P K L L I Y K V S N R F S G V P
 49
 57
 88
 S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C S Q S
 98
T H V P P E T F G Q G T K V E I K
 107

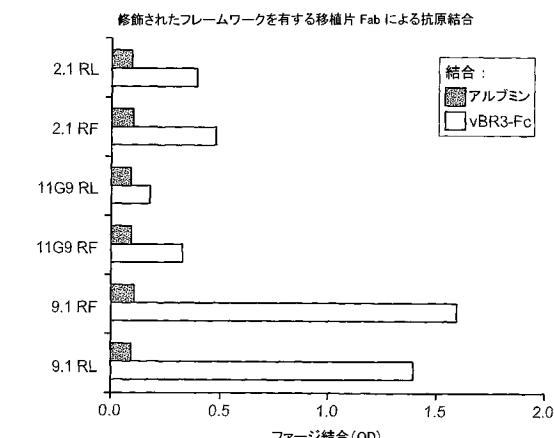
11G9 移植片-可変重鎖領域

25
 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G D S I T S G
 36
Y W N W V R Q A P G K G L E W V G Y I S Y S G S T Y Y N P S L K
 48
 66
S R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A
 93
G L D G L Y W Y F D V W G Q G T L V T V S S
 103
 113

【図5】

ヒトとマウスのV_Hフレームワークの比較

【図6】



【 図 7 】

		H3										フージ ELISA (nM)	
		T P H T Y G A M D Y										クローン (同胞)	
RF	フレームワーク	T	T	L	P	Y	G	A	M	D	Y	2.1-RL	22 ±
		I	N	S	N	P	Y	G	A	M	D	2.1-40	1.0 ±
		I	N	N	M	Y	G	A	M	D	2.1-46 (7)	1.2 ± 29	
		T	T	N	H	L	G	A	M	D	2.1-30 (12)	1.0 ± 0.4	
		R	R	P	H	N	D	G	A	M	D	2.1-27	
		R	R	P	H	N	D	G	A	M	D	2.1-36	
		R	R	P	H	N	D	G	A	M	D	2.1-31	
RL		T P H T Y G A M D Y										2.1-RL	0.4 ±
		I	N	A	N	Y	G	A	M	D	Y	2.1-93 (2)	4.1 ± 40
		T	S	H	N	T	G	I	M	D	Y	2.1-94 (2)	0.8 ± 4.7
		I	N	S	N	P	Y	G	A	M	D	2.1-89 (4)	3.8 ± 31
		T	L	E	P	Y	G	A	M	D	Y	2.1-40L	1.5 ± 1.2

【 四 8 】

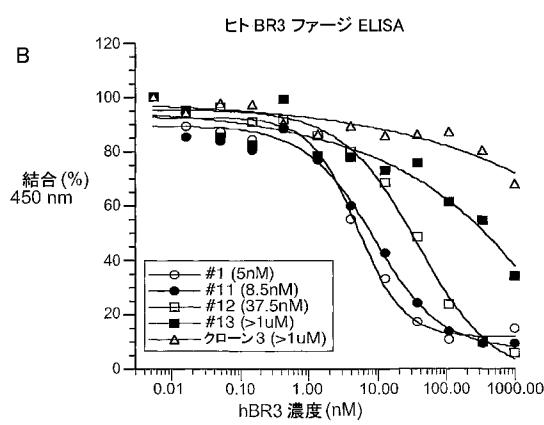
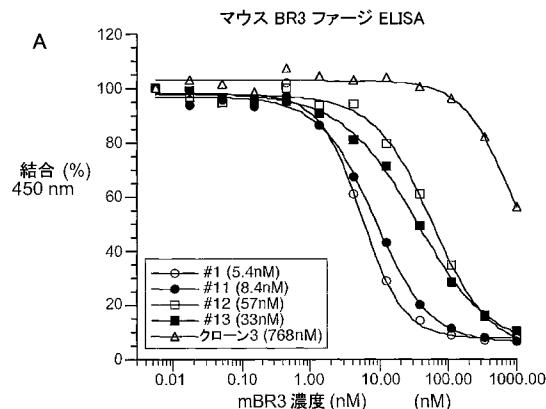
RL フレームワーク	H1	クローン (同胞)	ファージ ELISA IC50
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-RL	303
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-9	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-44	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-13	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-47 (2)	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-28	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-43	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-16	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-70	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-30 (4)	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-91 (2)	56
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-32	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-37 (14)	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-29	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-10	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-24	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-39 (2)	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-31	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-18	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-23	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-90 (7)	2.2
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-41	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-95	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-14	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-57	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-15	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-54	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-12	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-34 (2)	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-26	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-71	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-5 (2)	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-75 (3)	5.3
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-88 (12)	5
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-79	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-66 (3)	
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-69 (3)	
RF フレームワーク			
	G F T V T A S Y Y M S	9.1-48	2.6

【 図 9 】

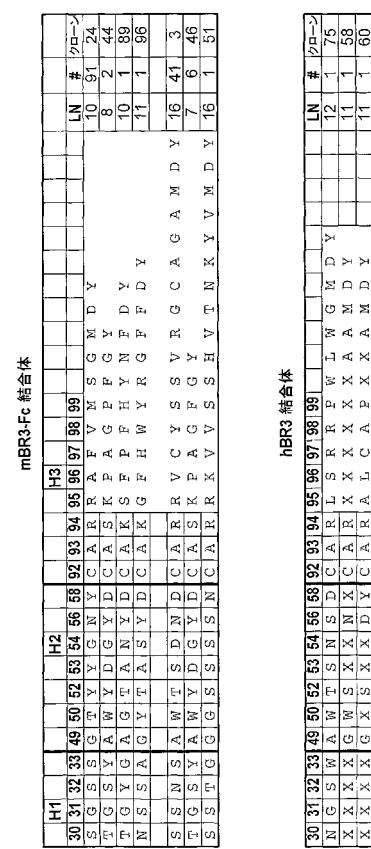
【 図 1 0 】

		Biacore (nM)		YBR5-Ec		BRs ecD	
11g9	H1	H3					
RF ブレーマーク	G D S I T S G Y W N	G L D G I Y W Y F D V		キメラ	>100	21.5 ± 2.8	
—	G D S I T S G Y W N	G L D G I Y W Y F D V	11g9-36	2.31	0.7		
—	G D S I T S G Y W N	G L D G I Y W Y F D V	11g9-46	5.4 ± 5.7	1.5 ± 1.4		
2.1	RF ブレーマーク	T P H T Y G A M D Y		キメラ	0.92	0.115 ± 0.005	
		T P H T Y G A M D Y	2.140	3.20	8.7		
		T P H T Y G A M D Y	2.146	0.13	0.27		
		T P H T Y G A M D Y	2.130	0.07	0.08		
RL	ブルーマーク	T P H T Y C A M D Y	2.1 RL	11.20	10.0		
		T P H T Y C A M D Y	2.194	1.67	0.82		
		T P H T Y C A M D Y	2.140L	3.49	35.8		
9.1	L2	H1					
W A S T R E S	G F T V T A Y Y M S			キメラ	21.8	0.245 ± 0.005	
ハセブチン ブレーマーク	G I P Y A G T Y Y I S			9.1-7.3	0.45	0.32	
W A S T R E S	G I P Y A G T Y Y I S			9.1-10	0.38 ± 0.20	0.15 ± 0.03	
W A S T R E S	G S P R S S Y Y I S						
RN ブレーマーク	G F T V T A Y Y M S			9.1-8	1.10	6.3	
RF ブレーマーク	G F T V T A Y Y M S			9.1-F	6.4	0.1	

【図11】



【図12】



【図16】

クローン	CDR-LC						CDR-HC																	
	L2			L3			H1			H3														
50	53	55	91	92	93	94	30	31	32	33	95	96	97	98	99									
V3	S	F	Y	S	Y	T	T	S	S	N	S	R	V	C	Y	S	S	V	R	G	C	A	G	A
V3-1	S	F	Y	S	R	I	T	S	S	N	S	R	V	C	Y	N	R	L	G	V	C	A	G	G
V3-11	S	F	Y	T	S	P	S	S	S	N	S	R	V	C	Y	N	N	L	G	V	C	A	G	A
V3-12	S	F	Y	S	Y	S	T	S	S	N	S	R	V	C	Y	D	R	A	R	V	C	A	G	A
V3-13	G	N	Y	S	H	A	S	S	R	R	S	R	V	C	Y	S	S	S	V	R	G	C	A	G

A

クローン	ファージ IC50 (nM)			ブロック
	mBR3-ECD	hBR3-ECD	ミニ-BR3	
V3	>1000	>1000	>1000	++++
V3-1	5.4	5	5.4	++++
V3-11	8.4	8.5	11	++++
V3-12	57	37.5	35	+++
V3-13	33	>1000	473	+++

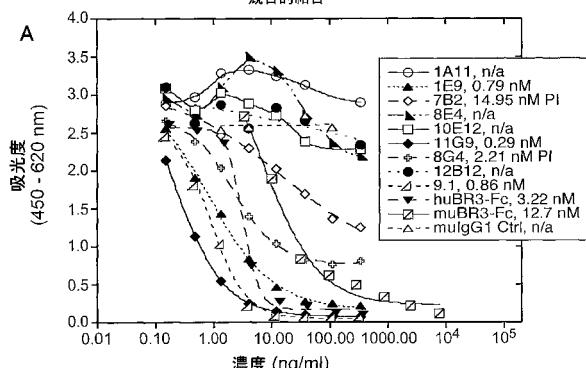
B

クローン	ファージ IC50 (nM)												mBR3	hBR3
	CDR-LC			CDR-HC			H3			CDR-HC				
V3-1	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	16.1	1.3
V3-11	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	40.9	2.5
V3-12	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6.1	11.6
V3-13	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	16.8	1.7
1A11	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	19	1.3
1E9	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	24	0.6
8E4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	27	1.4
10E12	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	34	0.3
11G9	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	35	0.8
11G9	0.29	n/a											21.9	0.2
12B12	n/a												37	1.3
9.1	0.86	n/a											0.6	0.4
huBR3-Fc	3.22	n/a											0.8	0.2
muBR3-Fc	12.7	n/a											0.8	
muIgG1 Ctrl	n/a													

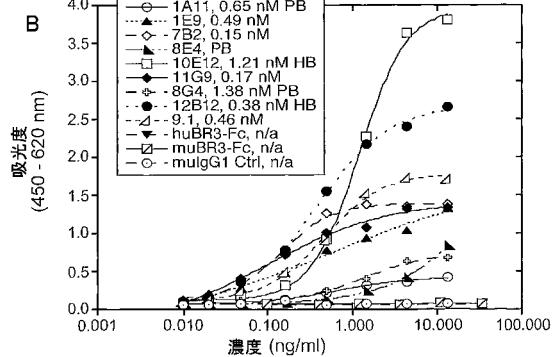
【図18】

CDR-LC	L1	L2	L3	名稱	ファージ IC50 (nM)			
					mBR3	hBR3	ASSS(H1)	
91	92	93	94	28	29	30	31	32
91	92	93	94	33	34	35	36	37
91	92	93	94	49	50	51	52	53
91	92	93	94	54	55	56	57	58
91	92	93	94	59	60	61	62	63
91	92	93	94	64	65	66	67	68
91	92	93	94	69	70	71	72	73
91	92	93	94	74	75	76	77	78
91	92	93	94	79	80	81	82	83
91	92	93	94	84	85	86	87	88
91	92	93	94	89	90	91	92	93
91	92	93	94	94	95	96	97	98
91	92	93	94	99	100	101	102	103

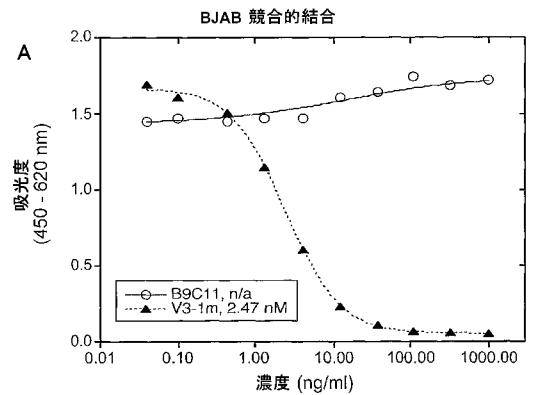
競合的結合



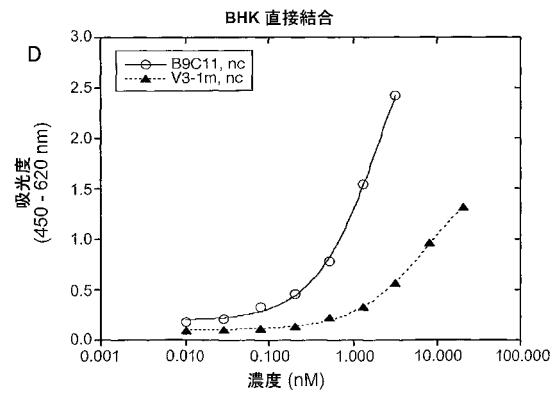
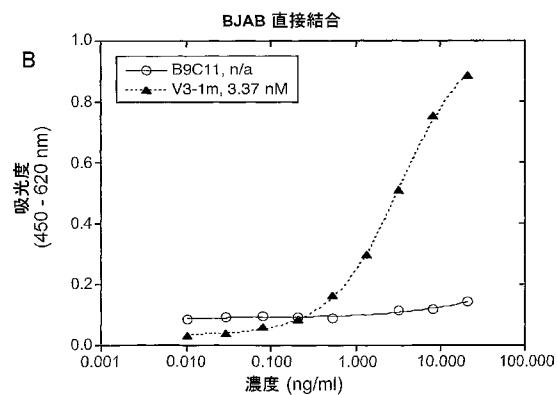
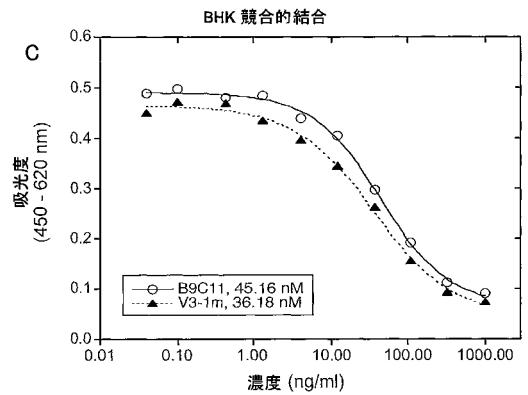
直接結合



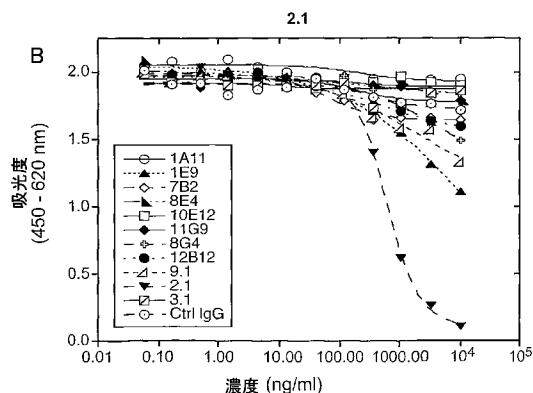
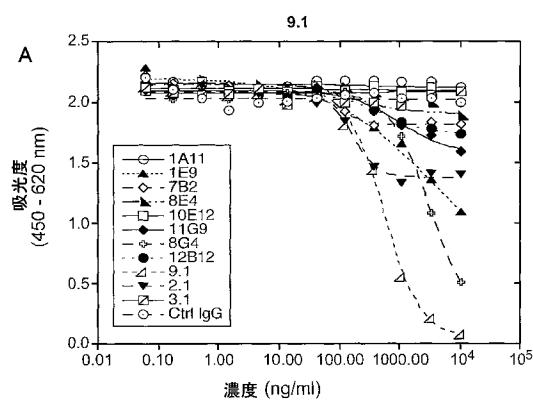
【図20A-B】



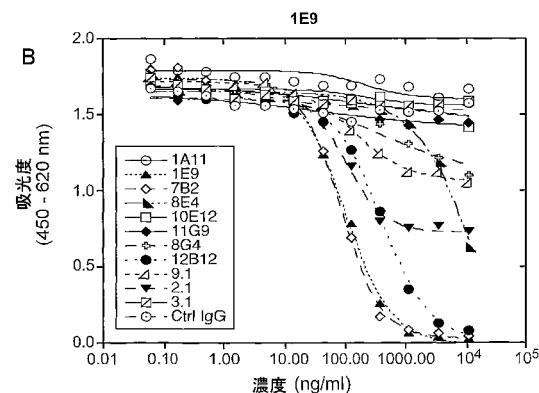
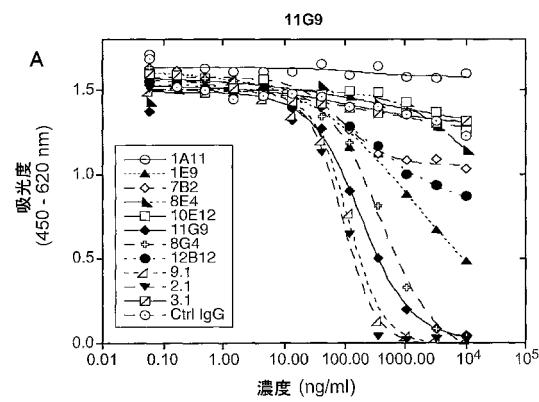
【図20C-D】



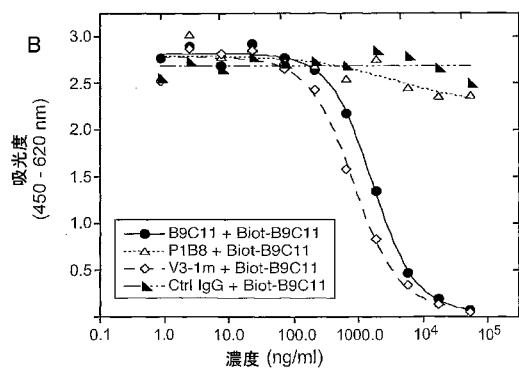
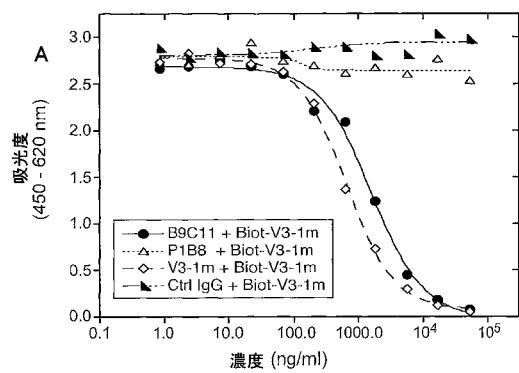
【図21A-B】



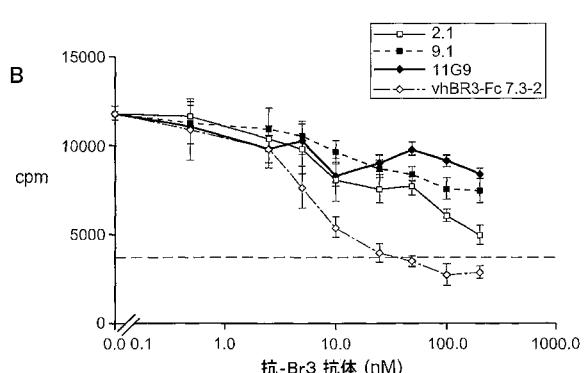
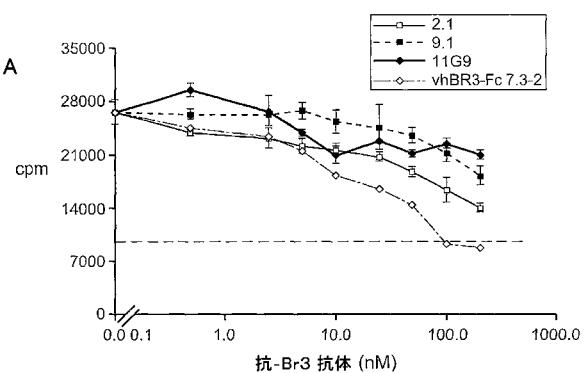
【図21C-D】



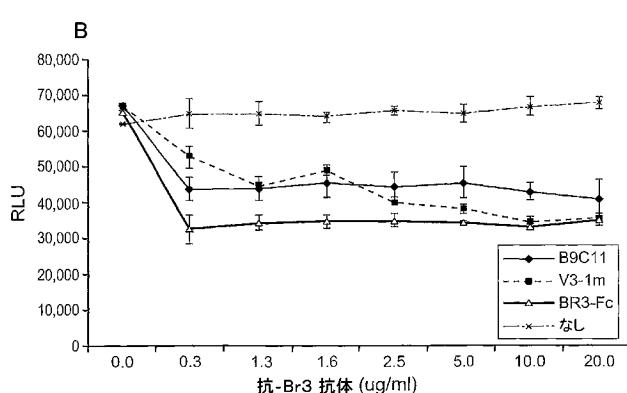
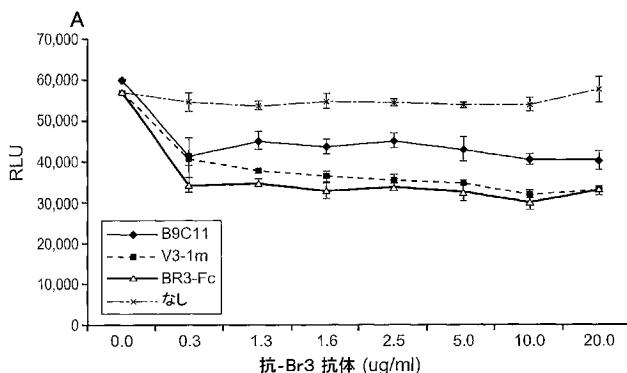
【図22】



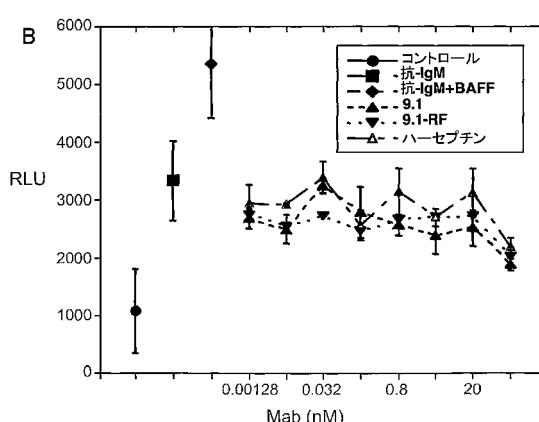
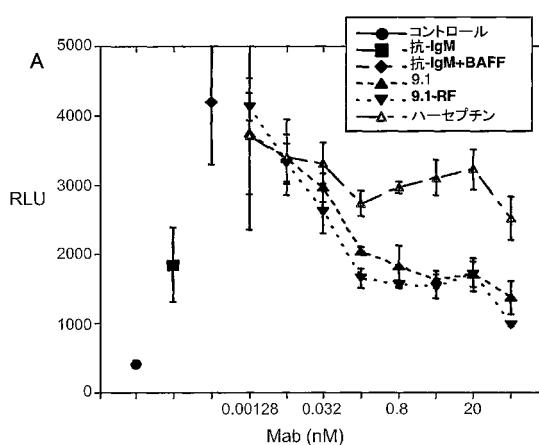
【図23】



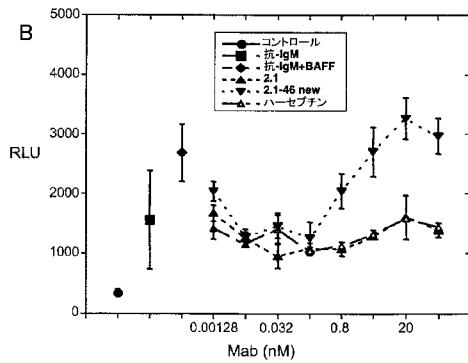
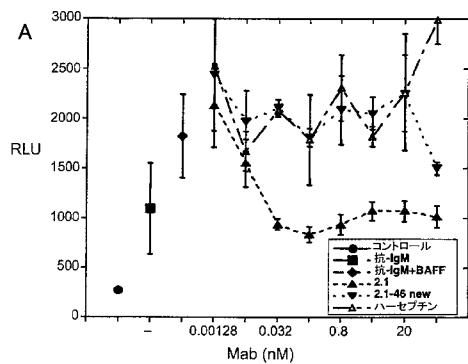
【図24】



【図25】



【図26】



【図27】

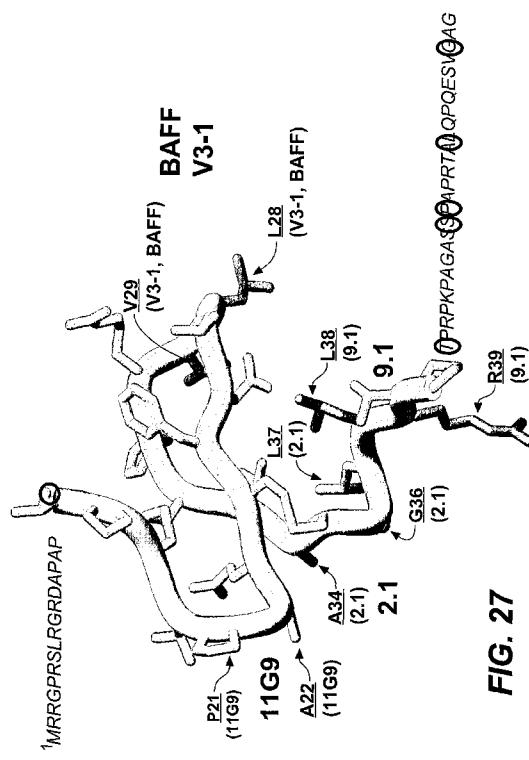
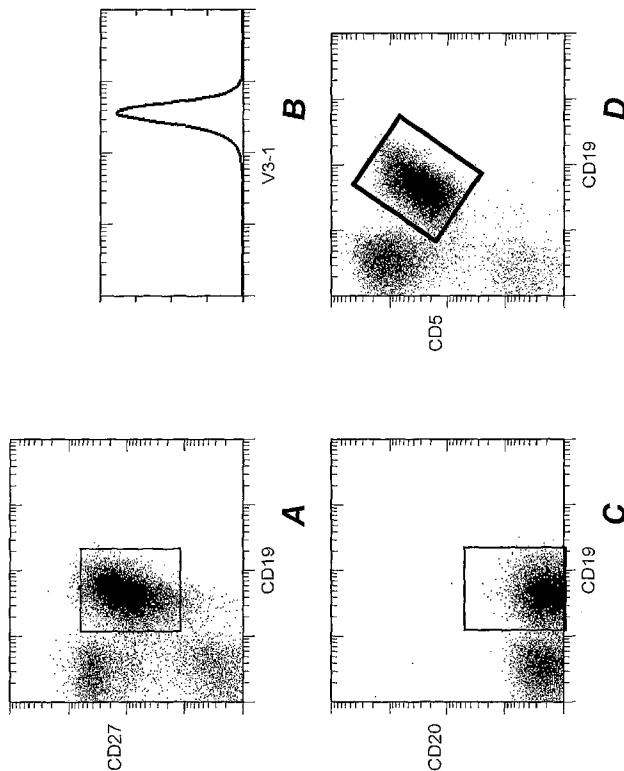
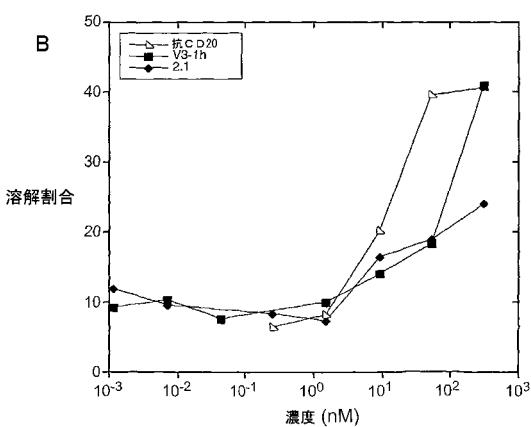
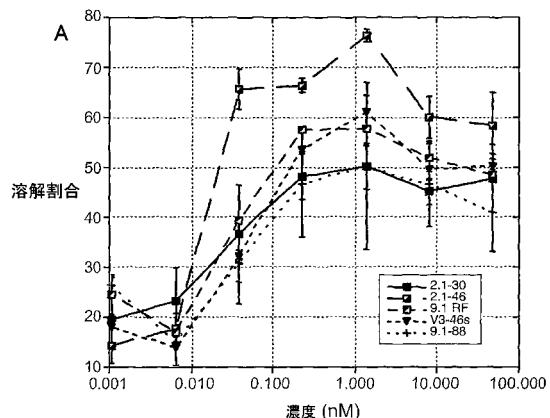


FIG. 27

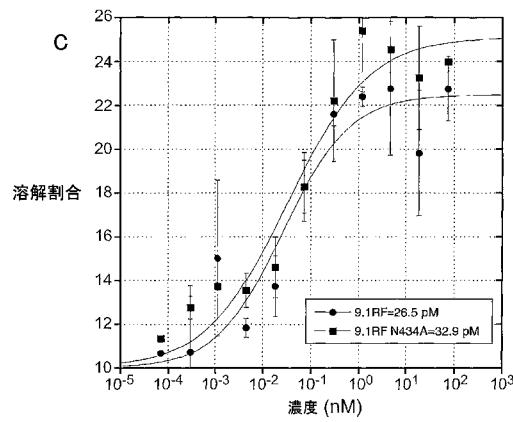
【図28】



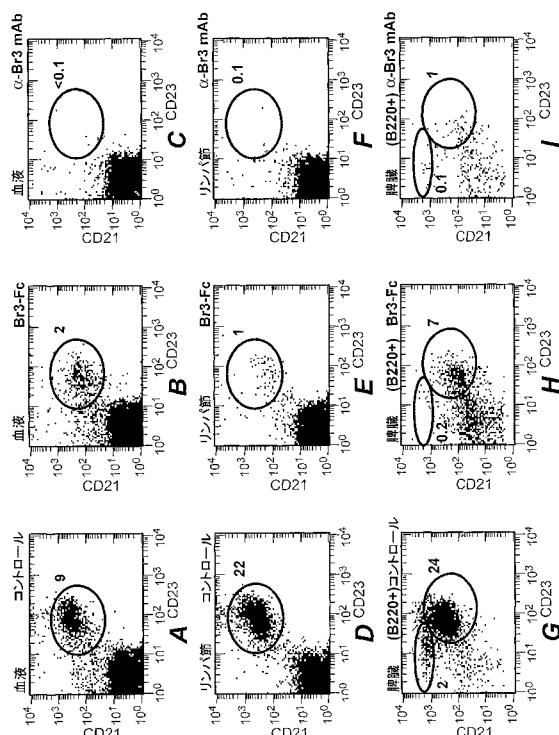
【図29 A - B】



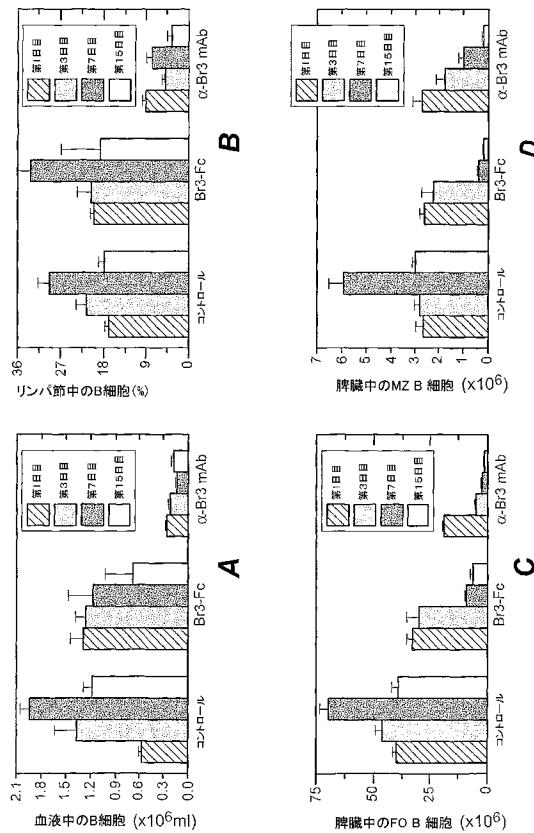
【図 29C】



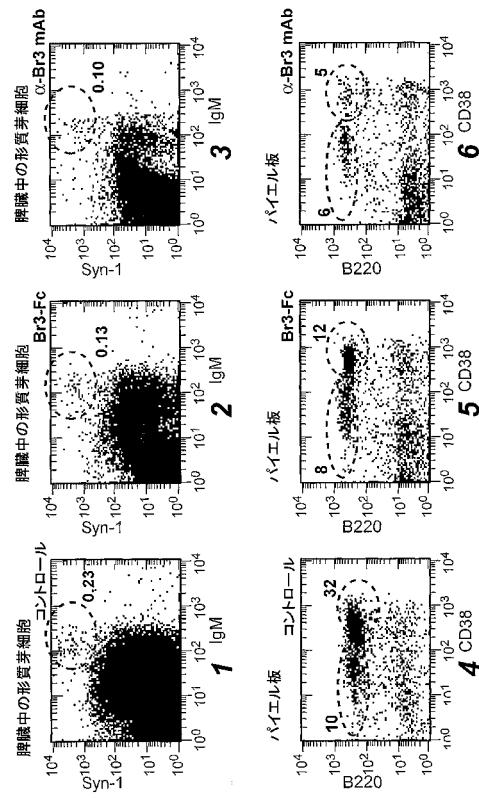
【図 30】



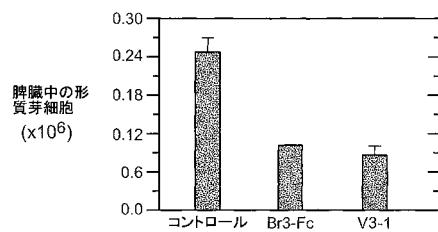
【図 31】



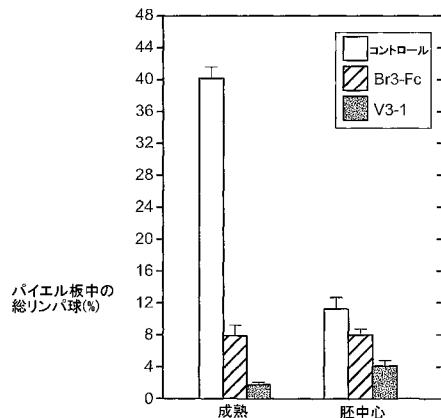
【図 32A】



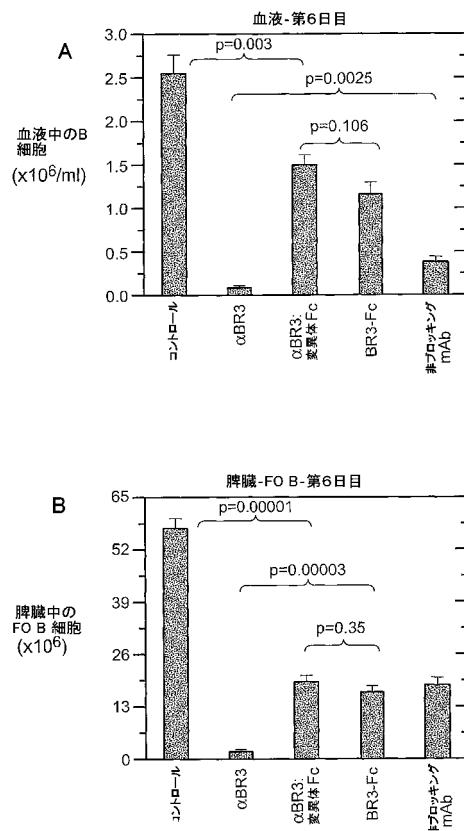
【図32B】



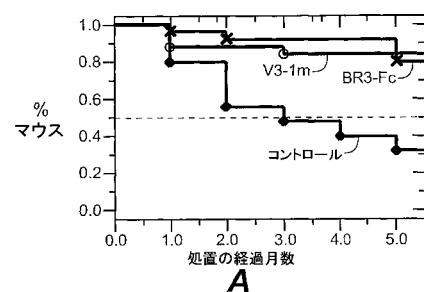
【図32C】



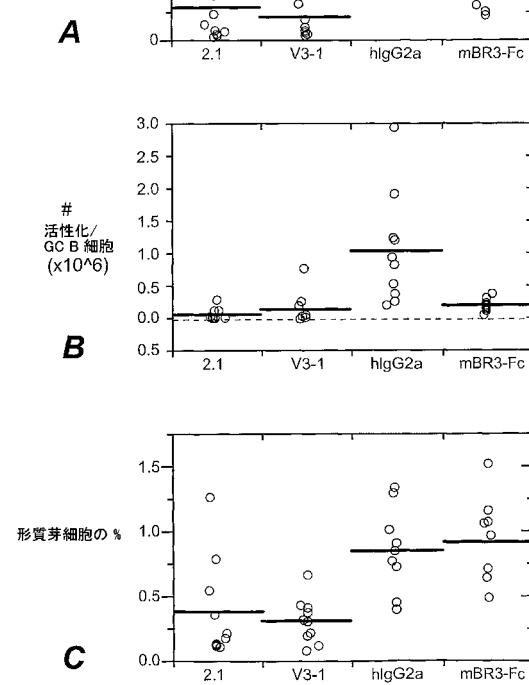
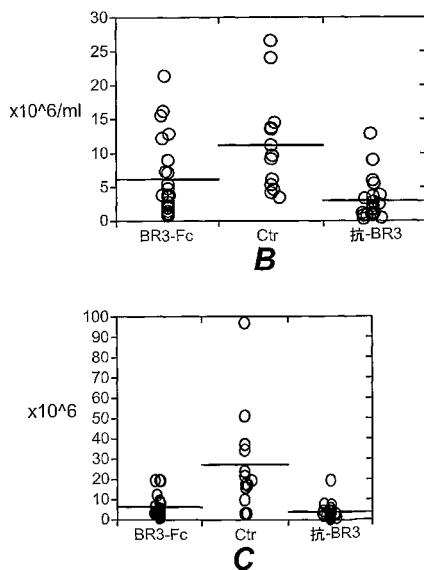
【図33】



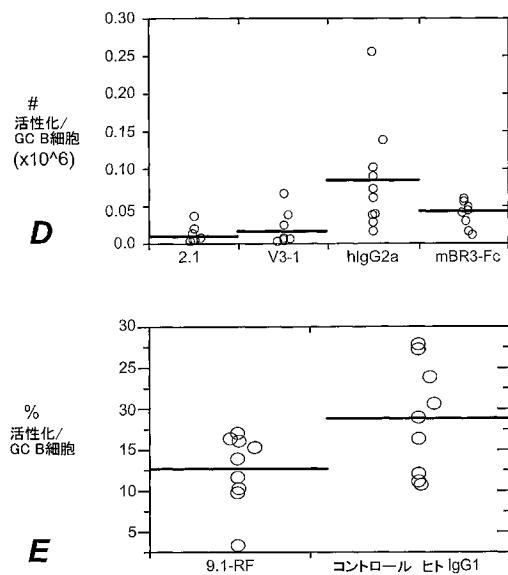
【図34】



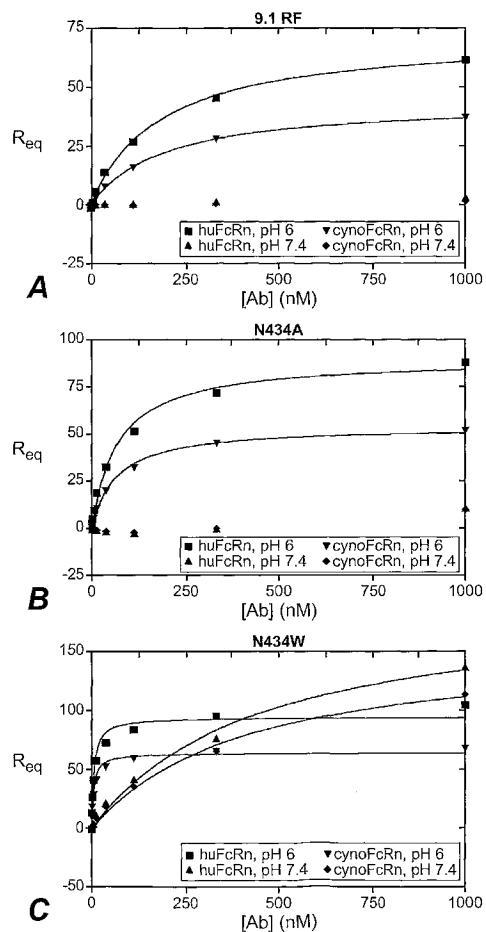
【図35A-C】



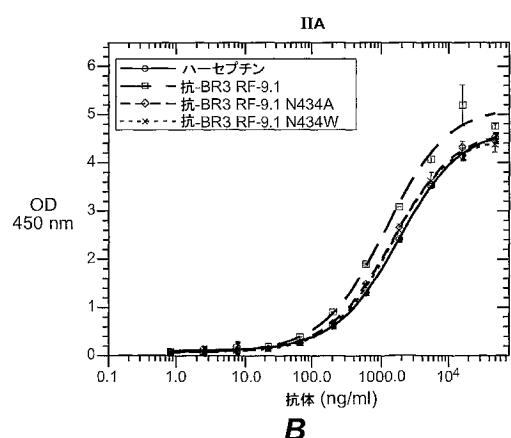
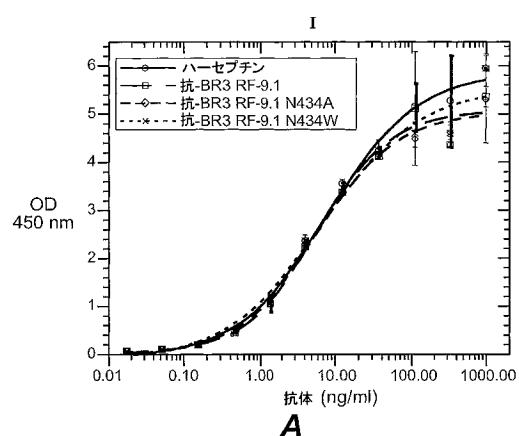
【図35D-E】



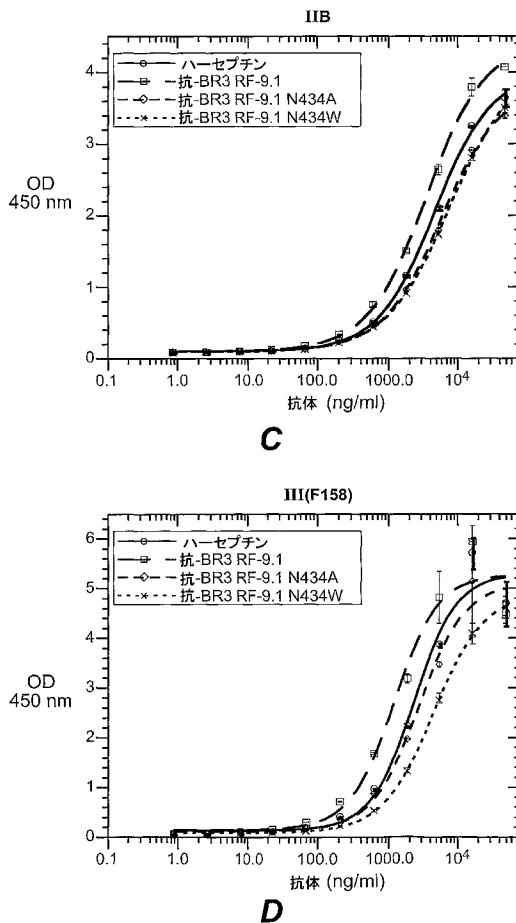
【図36】



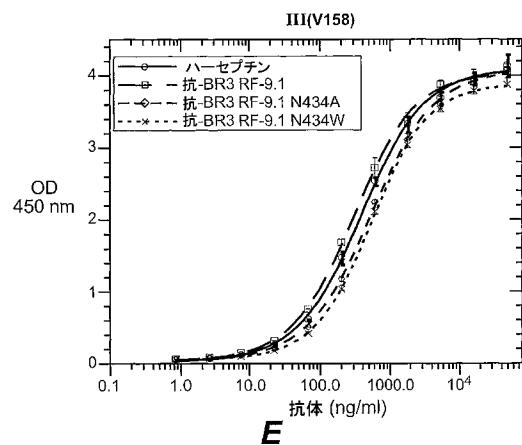
【図37A-B】



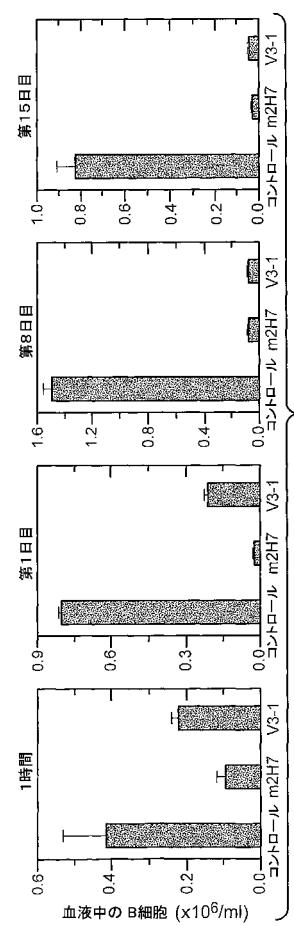
【図37C-D】



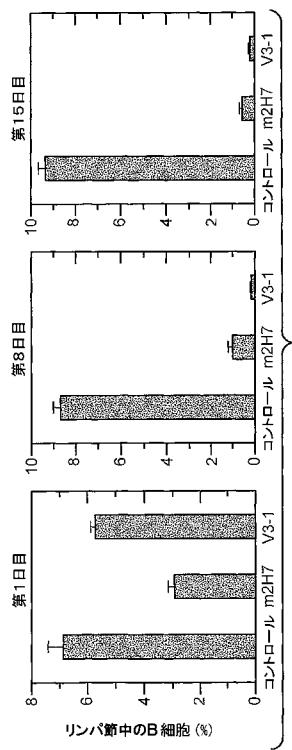
【図 3 7 E】



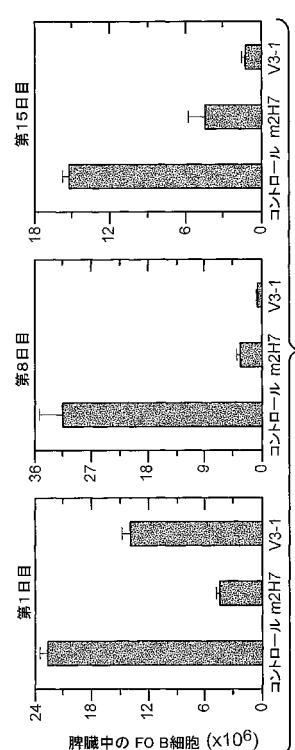
【図 3 8 A】



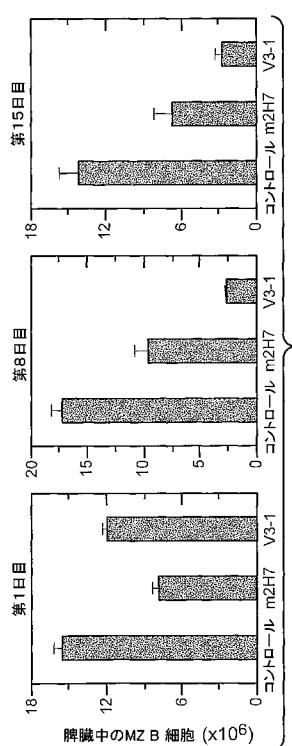
【図 3 8 B】



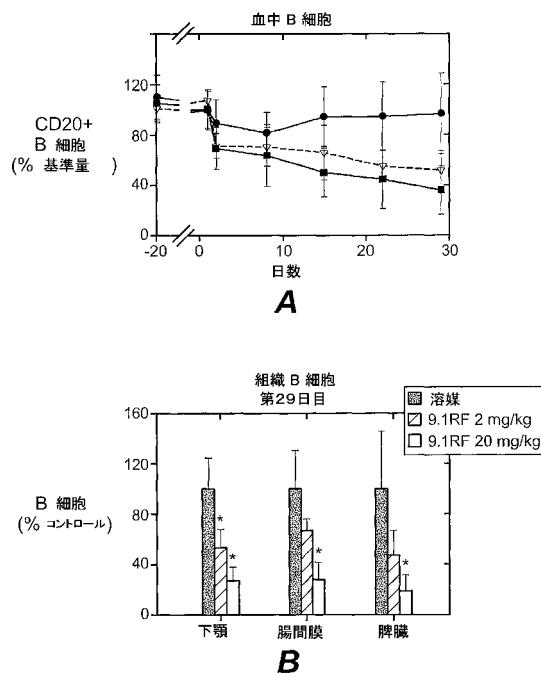
【図 3 9 A】



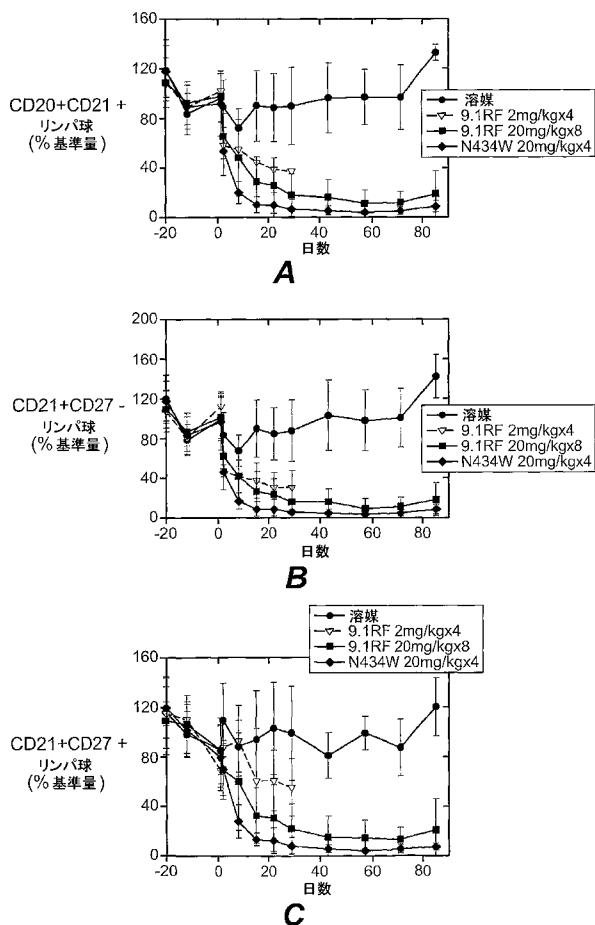
【図 3 9 B】



【図 4 0】



【図 4 1】



【配列表】

2008526205000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成19年10月10日(2007.10.10)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトB R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、表2に記載の抗体の何れか一のH1、H2及びH3領域のそれぞれに少なくとも70%の相同性を有するH1、H2及びH3領域を有する抗体。

【請求項2】

ヒトB R 3 細胞外ドメイン配列に結合し、表2に記載の抗体の何れか一のL1、L2及びL3領域のそれぞれに少なくとも70%の相同性を有するL1、L2及びL3領域を有する抗体。

【請求項3】

ヒトエフェクター細胞の存在下にて抗体依存性細胞障害(ADCC)を有するかないしは、ヒト野生型IgG Fcを含有する抗体と比較してヒトエフェクター細胞の存在下にてADCCを亢進している、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項4】

ヒト、カニクイザル及びアカゲザルのB細胞からなる群から選択される少なくとも一の靈長類B細胞を枯渇することができる、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項5】

野生型又は天然の配列のIgG Fcを含有する抗体と比較して、インビボの半減期が増加している、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項6】

ヒト又はヒト化である、請求項1又は2に記載の抗体。

【請求項7】

表2に記載の抗体の何れか一のVHドメインに少なくとも70%の相同性を有する、請求項6に記載の抗体。

【請求項8】

配列番号4-13、15、16-18、20、22、24、26、28-73、75-76、78、80-85、87-96、98、100、102、104、106、107、109-110、112、116、118、120、122、124-127及び129-131の何れか一のH3配列を含有してなる、請求項6に記載の抗体。

【請求項9】

さらに、表2に開示される抗体の何れか一のH1及びH2の配列を含有してなる、請求項8に記載の抗体。

【請求項10】

さらに、表2に開示される抗体の何れか一のL1、L2及びL3の配列を含有してなる、請求項9に記載の抗体。

【請求項11】

A T C C 寄託番号P T A - 6 3 1 7として寄託されるHuV3-46s-H-IgG核酸配列にコードされるポリペプチド配列及びA T C C 寄託番号P T A - 6 3 1 8として寄託されるHuV3-46s-L-IgG核酸配列によってコードされるポリペプチド配列を含んでなる、請求項6に記載の抗体。

【請求項12】

H u V 3 - 4 6 s である、請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

(1) QVRRALDY (配列番号 2 1 2)を含有する H 3 高頻度可変領域 (H V R 3) ; と (2) RDTSKNTF (配列番号 2 1 0)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (H C - F R 3) 又は (3) RDTSKNTL (配列番号 2 1 1)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (H C - F R 3) を含んでなる抗 B R 3 抗体。

【請求項 1 4】

さらに、H 1 高頻度可変領域 (H V R 1) 内に残基 GFTVTAYYMS (配列番号 2 1 4) と H 2 高頻度可変領域 (H V R 2) 内に残基 GFIRDKANGYTTEYNPSVKG (配列番号 2 1 3) を含んでなる、請求項 1 3 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 1 5】

さらに、配列番号 5、6 - 9、1 1 - 1 3、1 6 - 1 8、3 5 - 3 6、3 7 - 7 3、7 5 - 7 6 及び 8 1 - 8 5 の何れか一の抗体配列の残基番号 4 9 - 6 5 (カバット番号付け) を含有する H V R 2 と残基番号 2 6 - 3 5 を含有する H V R 1 とを含んでなる、請求項 1 3 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 1 6】

QVRRALDY (配列番号 2 1 2)を含有する H 3 高頻度可変領域 (H V R 3) ; と W-A-X3-X4-X5-X6-S (配列番号 2 1 5)を含有する L 1 高頻度可変領域 (L V R 1) であって、X3がQ又はSであり、X4がH又はIであり、X5がL又はRであり、X6がD又はEである ; X1-X2-P-X4-X5-G-X7-Y-X9-S (配列番号 2 1 6)を含有する H 1 高頻度可変領域 (H V R 1) を含んでなり、X1がG又はDであり、X2がL又はSであり、X4がM、R又はVであり、X5がA又はSであり、X7がF、H又はYであり、X9がT又はIである ; 配列番号 2 1 5 の配列を含有する L V R 1 ; 及び配列番号 2 1 6 の配列を含有する H V R 1 の何れか一又は複数を含んでなる、抗 B R 3 抗体。

【請求項 1 7】

(1) 配列 X1-X2-X3-X4-X5-G-A-M-D-Y (配列番号 2 1 7) を含有し、X1がT、N又はRであり、X2がT、S、L、N又はPであり、X3がL又はNであり、X4がP、F、L、Y又はNであり、X5がD又はYである、H V R 3 と、(2) RDTSKNTF (配列番号 2 1 0)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (H C - F R 3) とを含んでなる B R 3 結合抗体。

【請求項 1 8】

前記 H V R 3 が配列番号 6 - 9 及び 1 6 - 1 8 の何れか一の抗体の残基番号 9 4 - 1 0 2 (カバット番号付け) を含有する、請求項 1 7 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 1 9】

(1) 配列 X1-X2-X3-X4-X5-G-X7-M-D-Y (配列番号 2 1 8) を含有し、X1がT又はNであり、X2がA、T又はSであり、X3がN、H又はLであり、X4がP、F、Y又はNであり、X5がT又はYであり、X7がA又はEである、H V R 3 と、(2) RDTSKNTL (配列番号 2 1 1)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (H C - F R 3) を含んでなる抗 B R 3 抗体。

【請求項 2 0】

前記 H V R 3 が配列番号 5 及び 1 0 - 1 3 の何れか一の抗体の残基番号 9 4 - 1 0 2 (カバット番号付け) を含有する、請求項 1 9 に記載の抗 B R 3 抗体。

【請求項 2 1】

配列番号 7 - 1 3 及び 1 6 - 1 8 の何れか一の抗体配列の残基番号 9 4 - 1 0 2 (カバット番号付け) を含有する H V R 3 を含んでなる、請求項 1 又は 6 に記載の抗体。

【請求項 2 2】

(1) 配列番号 8 1 - 8 3 の何れか一の抗体配列の残基 9 4 - 1 0 2 (カバット番号付け) を含有する H V R 3 と、(2) RDTSKNTF (配列番号 2 1 0)を含有する重鎖フレームワーク 3 領域 (H C - F R 3) を含んでなる、請求項 1 又は 6 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

RVCYN-X6-LGVCAGGMDY (配列番号 2 2 0)を含有し、X 6 が R 又は H である H V R 3 を含んでなる抗 B R 3 抗体。

【請求項 2 4】

さらに、配列番号 8 6、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、1 0 8、1 1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3及び1 9 4 - 2 0 7の何れか一の抗体配列の残基2 4 - 3 4、残基4 9 - 5 5及び残基8 9 - 9 7(カバット番号付け)をそれぞれ含有するL V R 1、L V R 2及びL V R 3を含んでなる、請求項2 3に記載の抗B R 3抗体。

【請求項 2 5】

配列番号7 - 1 3、1 6 - 1 8、2 4、2 6 - 7 3、7 5 - 7 6、7 8、8 0 - 8 5、8 7 - 9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 4、1 0 6、1 0 7、1 0 9 - 1 1 0、1 1 2、1 1 4、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4 - 1 2 7、1 2 9及び1 9 3の何れか一の抗体配列の残基番号2 6 - 3 5、4 9 - 6 5及び9 4 - 1 0 2(カバット番号付け)をそれぞれ含有するH 1、H 2及びH 3を含んでなる、請求項 1 又は 6に記載の抗体。

【請求項 2 6】

残基QVRRALDY(配列番号2 1 2)又はRVCYNRLGVCAGGMDY(配列番号2 2 1)を含有するH 3;残基GFTVTAYYMS(配列番号2 1 4)、SGFTISSNSIH(配列番号2 2 2)又はSGFTISSSIH(配列番号2 2 4)を含有するH 1;と、残基GFIRDKANGYTTEYNPSVKG(配列番号2 1 3)又はAWITPSDGNTD(配列番号2 2 3)を含有するH 2を含んでなる、請求項 1 又は 6に記載の抗体。

【請求項 2 7】

配列番号1 3、1 5、1 6 - 1 8、2 2、2 4、2 6、2 8 - 7 3、7 5 - 7 6、7 8、8 0 - 8 5、8 7 - 9 6、9 8、1 0 0、1 0 2、1 0 4、1 0 6、1 0 7、1 0 9 - 1 1 0、1 1 2、1 1 6、1 1 8、1 2 0、1 2 2、1 2 4 - 1 2 7及び1 2 9 - 1 3 1の何れか一のV_H配列を含有してなる、請求項 1 ないし 7の何れか一に記載の抗体。

【請求項 2 8】

配列番号3、1 4、2 1、2 3、2 5、2 7、7 4、7 7、7 9、8 6、9 7、9 9、1 0 1、1 0 3、1 0 5、1 0 8、1 1 1、1 1 3、1 1 5、1 1 7、1 1 9、1 2 1、1 2 3及び1 2 8の何れか一のV_L配列を含有してなる、請求項 1 ないし 7の何れか一に記載の抗体。

【請求項 2 9】

配列番号1 2 7又は1 2 9のV_H配列と、配列番号1 2 3又は1 2 8のV_L配列を含んでなる、請求項 1に記載の抗体。

【請求項 3 0】

V 3 - 4 6 sである、請求項 2 9に記載の抗体。

【請求項 3 1】

ヒト抗体又はヒト化抗体である、請求項 2 9に記載の抗体。

【請求項 3 2】

前記抗体が、ヒトB R 3細胞外ドメイン配列に、2 5でのB I A c o r e アッセイにおけるF a bとして、5 0 0 n M以下、1 0 0 n M以下、5 0 n M以下、1 0 n M以下、5 n M以下又は1 n M以下の見かけのK d値で結合する、請求項 1 ないし 1 5の何れか一に記載の抗体。

【請求項 3 3】

細胞障害性剤又は化学療法剤にコンジュゲートされた、請求項 1 ないし 3 2の何れか一に記載の抗体。

【請求項 3 4】

前記細胞障害性剤が放射性同位体又は毒素である、請求項 3 3に記載の抗体。

【請求項 3 5】

前記抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 ないし 3 4の何れか一に記載の抗体。

【請求項 3 6】

前記抗体がヒト化抗体である、請求項 1 ないし 3 5の何れか一に記載の抗体。

【請求項 3 7】

請求項 1 ないし 3 6の何れか一に記載の抗体をコードする単離された核酸分子。

【請求項 3 8】

請求項 1 ないし 3 7 の何れか一に記載の抗体をコードする発現ベクター。

【請求項 3 9】

請求項 3 7 に記載の核酸分子又は請求項 3 8 に記載の発現ベクターを含み、請求項 1 ないし 3 8 の何れか一に記載の抗体を産生する宿主細胞。

【請求項 4 0】

請求項 3 9 に記載の細胞を培養し、該細胞培養物から抗体を回収することを含む、請求項 1 ないし 3 9 の何れか一に記載の抗体の产生方法。

【請求項 4 1】

請求項 1 ないし 4 0 の何れか一に記載の B R 3 結合抗体と担体を含有してなる組成物。

【請求項 4 2】

請求項 1 ないし 4 1 の何れか一に記載の抗体を含有してなる、癌を治療するための医薬。

【請求項 4 3】

請求項 1 ないし 4 2 の何れか一に記載の抗体を含有してなる、B 細胞腫瘍を治療するための医薬。

【請求項 4 4】

請求項 1 ないし 4 3 の何れか一に記載の抗体を含有してなる、自己免疫性疾患を治療するための医薬。

【請求項 4 5】

請求項 1 ないし 4 4 の何れか一に記載の抗体を含有してなる、B 細胞を枯渇ための医薬。

【請求項 4 6】

抗 C D 2 0 抗体治療を受けたことがあるか、受ける予定である患者への投与のための、請求項 4 2 ないし 4 5 の何れか一に記載の医薬。

【請求項 4 7】

前記抗 C D 2 0 抗体がリツキサン(登録商標)抗体である、請求項 4 6 に記載の医薬。

【請求項 4 8】

前記抗 C D 2 0 抗体が h u 2 H 7 又はその機能的な変異体である、請求項 4 6 に記載の医薬。

【請求項 4 9】

B A F F アンタゴニストからなる群から選択される何れかの治療を受けたことがあるか、受ける予定である患者への投与のための、請求項 4 2 ないし 4 5 の何れか一に記載の医薬。

【請求項 5 0】

前記 B A F F アンタゴニストが、B R 3 - F c、T A C I - F c、B C M A - F c、抗 B A F F ペプチボディ、抗 B A F F 抗体及び抗 B R 3 抗体からなる群から選択されるものである、請求項 4 9 に記載の医薬。

【請求項 5 1】

前記癌が、非ホジキンリンパ腫(N H L)、リンパ球優性ホジキン病(L P H D)、滲胞性リンパ腫、多発性骨髄腫、A L L、C L L 及び広汎性大 B 細胞リンパ腫からなる群から選択されるものである、請求項 4 2 又は 4 3 に記載の医薬。

【請求項 5 2】

前記抗体が V 3 - 1 抗体由来である、請求項 4 2 ないし 4 5 の何れか一に記載の医薬。

【請求項 5 3】

前記抗体が 9 . 1 R F の重鎖可変ドメイン(配列番号 3 5)、V 3 - 4 6 s R F の重鎖可変ドメイン(配列番号 1 2 7)を含有するか、あるいは V 3 - 4 6 s 又は H u V 3 - 4 6 s 抗体である、請求項 4 2 ないし 4 5 の何れか一に記載の医薬。

【請求項 5 4】

前記自己免疫性疾患が関節リウマチである、請求項 4 4 に記載の医薬。

【請求項 5 5】

前記抗体が細胞障害性剤又は化学療法剤にコンジュゲートされる、請求項4_2ないし4_6の何れか一に記載の医薬。

【請求項 5 6】

前記細胞障害性剤が放射性同位体又は毒素である、請求項5_5に記載の医薬。

【請求項 5 7】

請求項1ないし5_6の何れか一に記載の抗体を含有してなる、免疫不全性疾患を治療するための医薬。

【請求項 5 8】

前記抗体が2.1抗体に由来する、請求項5_7に記載の医薬。

【請求項 5 9】

前記抗体が2.1-4.6の重鎖可変ドメインを含有する、請求項5_7に記載の医薬。

【請求項 6 0】

試験試料又は被検体における本発明の抗B R 3抗体を結合する工程と、コントロール抗体又はポリペプチドと比較して結合した抗体ないしはポリペプチドを比較する工程を含む、B R 3ポリペプチドの検出方法。

【請求項 6 1】

前記抗B R 3抗体が3.1(ATCC寄託番号PTA-6622)又は12B12.1(ATCC寄託番号PTA-6624)として寄託されるハイブリドーマによって產生される抗体である、請求項6_0に記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/US2005/047072									
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28											
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC											
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K											
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched											
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal											
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;">WO 02/24909 A (BIOGEN, INC; AMBROSE, CHRISTINE, M; THOMPSON, JEFFREY, S) 28 March 2002 (2002-03-28) example 16</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1</td> </tr> <tr> <td style="text-align: center; padding: 2px;">A</td> <td style="padding: 2px;">WO 00/42072 A (GENENTECH, INC) 20 July 2000 (2000-07-20) cited in the application claims 1-49; figures 1-25</td> <td style="text-align: center; padding: 2px;">1</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	WO 02/24909 A (BIOGEN, INC; AMBROSE, CHRISTINE, M; THOMPSON, JEFFREY, S) 28 March 2002 (2002-03-28) example 16	1	A	WO 00/42072 A (GENENTECH, INC) 20 July 2000 (2000-07-20) cited in the application claims 1-49; figures 1-25	1
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.									
X	WO 02/24909 A (BIOGEN, INC; AMBROSE, CHRISTINE, M; THOMPSON, JEFFREY, S) 28 March 2002 (2002-03-28) example 16	1									
A	WO 00/42072 A (GENENTECH, INC) 20 July 2000 (2000-07-20) cited in the application claims 1-49; figures 1-25	1									
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.											
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed											
T later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family											
Date of the actual completion of the international search 28 June 2006		Date of mailing of the international search report 06/07/2006									
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer van Klompenburg, W									

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/047072

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.: 2-143 because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2005/047072

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 2-143

The present application contains 143 claims, of which 51 are independent. There is no clear distinction between the independent claims because of overlapping scope. There are so many claims, and they are drafted in such a way that the claims as a whole are not in compliance with the provisions of clarity and conciseness of Article 6 PCT, as it is particularly burdensome for a skilled person to establish the subject-matter for which protection is sought. The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search (PCT Guidelines 9.19 and 9.25).

The search was based on the subject-matter that, as far as can be understood, could reasonably be expected to be claimed later in the procedure, and the corresponding claim, namely an antibody or polypeptide that binds to a human BR3 extracellular domain sequence and which has Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity as reflected by the subject-matter of claim 1

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2005/047072

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 0224909	A 28-03-2002	AU	8885801 A1	02-04-2002
		BG	107621 A	30-01-2004
		BR	0113921 A	14-12-2004
		CA	2422622 A1	28-03-2002
		CN	1622995 A	01-06-2005
		EE	200300107 A	15-02-2005
		EP	1352063 A2	15-10-2003
		HU	0401591 A2	29-11-2004
		JP	2004509624 T	02-04-2004
		MX	PA03002328 A	06-06-2003
		NO	20031248 A	16-05-2003
		NZ	525187 A	24-02-2006
		PL	366331 A1	24-01-2005
		SK	4712003 A3	07-10-2003
WO 0042072	A 20-07-2000	AU	778683 B2	16-12-2004
		AU	2850500 A	01-08-2000
		BR	0008758 A	04-12-2001
		CA	2359067 A1	20-07-2000
		CN	1343221 A	03-04-2002
		EP	1141024 A2	10-10-2001
		HU	0104865 A2	29-04-2002
		JP	2003512019 T	02-04-2003
		MX	PA01007170 A	30-07-2002
		PL	349770 A1	09-09-2002
		ZA	200105484 A	29-07-2002

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	L
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
A 6 1 P 3/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 5/14 (2006.01)	A 6 1 P 3/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 5/14	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
A 6 1 P 11/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 11/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)	A 6 1 P 11/00	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)	A 6 1 P 11/02	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)	A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 17/14 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 19/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 17/14	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/00	
A 6 1 P 21/04 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)	A 6 1 P 21/04	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/04	
A 6 1 P 31/06 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 31/06	
A 6 1 P 37/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
	A 6 1 P 37/08	
	A 6 1 P 43/00	1 0 1
	A 6 1 P 43/00	1 0 5
	G 0 1 N 33/53	D

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,NL,PL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. UNIX

(74)代理人 100101199
弁理士 小林 義教

(72)発明者 アンブローズ, クリストイン エム.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01867, リーディング, ウェークフィールド ストリート 197

(72)発明者 バラツ, メルセデス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94545, ヘイウォード, ドリフトウッド ストリート 2735

(72)発明者 デフォージ, ローラ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044, パシフィカ, マンザニタ ドライブ 1175

(72)発明者 デニス, マーク エス.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94070, サン カルロス, プリマス 120

(72)発明者 フー, ジャーメイン
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94404, パシフィカ, アマポーラ アベニュー 149

(72)発明者 ハースト, スティーブン ディー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94110, サン フランシスコ, 8番, ハリソン ストリート 2501

(72)発明者 リー, チンウェイ ヴィー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94044, フォスター シティ, 112番, シー スプレイ レーン 840

(72)発明者 ロウマン, ヘンリー ビー.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94018, エル グラナダ, サン フアン アベニュー 400

(72)発明者 マーティン, フラビアス
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94545, ヘイウォード, ドリフトウッド ストリート 2735

(72)発明者 ナカムラ, ジェラルド アール.
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94127, サン フランシスコ, ポルトラ ドライブ 1529

(72)発明者 セシャサイエー, ダーヤ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94587, ユニオン シティ, ケンウッド ストリート 4819

(72)発明者 スタロヴァスニク, メリッサ
アメリカ合衆国 カリフォルニア 94116, サン フランシスコ, ドランテス アヴェニュー 190

(72)発明者 トンプソン, ジェフリー エス.
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02180, ストーンハム, ニューコーム ロード 60

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 CA07 DA02 DA05 DA11 EA02 EA04
FA02 GA11 HA01 HA03 HA15
4B064 AG27 CA19 CE10 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA90X AA90Y AB01 BA01 CA25 CA44 CA46
4C085 AA13 AA14 AA21 BB11 CC03 DD61 EE01 EE03
4H045 AA11 AA20 AA30 BA41 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	多肽与BR3的结合及其用途		
公开(公告)号	JP2008526205A	公开(公告)日	2008-07-24
申请号	JP2007549554	申请日	2005-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	健泰科生物技术公司		
申请(专利权)人(译)	Genentech公司 Biogen Idec公司, Emuei公司		
[标]发明人	アンブローズクリスティンエム バラツツメルセデス デフォージローラ デニスマーカエス フージャーメイン ハーストスティーブンディー ¹ リーチンウェイヴィー ¹ ロウマンヘンリービー ¹ マーティンフラビアス ¹ ナカムラジェラルドアール ¹ セシヤサイエーダーヤ ¹ スタロヴァスニクメリッサ ¹ トンプソンジェフリー ¹ エス ¹		
发明人	アンブローズ, クリストイン エム. バラツツ, メルセデス デフォージ, ローラ デニス, マーク エス. フー, ジャーメイン ハースト, スティーブン ディー. リー, チンウェイ ヴィー. ロウマン, ヘンリー ビー. マーティン, フラビアス ナカムラ, ジェラルド アール. セシヤサイエー, ダーヤ スタロヴァスニク, メリッサ トンプソン, ジェフリー エス.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12P21/08 C07K16/46 C12N5/10 A61K39/395 A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 G01N33/53		
CPC分类号	A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/2878 C07K2317/34 C07K2317/732		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C12P21/08 C07K16/46 C12N5/00.A A61K39/395.L A61K39/395.N A61K39/395.T A61P1/04 A61P1/16 A61P3/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P7/00 A61P7/06 A61P9/00 A61P9/10 A61P11/00 A61P11/02 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P17/00 A61P17/06 A61P17/14 A61P19/00 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P25/04 A61P27/02 A61P29/00 A61P31/06 A61P35/00 A61P35/02 A61P37/00 A61P37/08 A61P43/00 C07K16/2878 C07K2317/34 C07K2317/732 D		

F-TERM分类号

4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA03 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA19 4B064/CE10 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/BB11 4C085/CC03 4C085/DD61 4C085/EE01 4C085/EE03 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74

优先权

60/640323 2004-12-31 US

外部链接

[Espacenet](#)

摘要(译)

本发明涉及新的BR3结合抗体和多肽，包括拮抗剂和激动剂多肽。本发明还涉及BR3结合抗体和多肽在例如治疗方法，筛选方法，诊断方法，测定和蛋白质纯化方法中的用途。

元の残基	例示的置換	好みの置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu