

(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2004-500070
(P2004-500070A)

(43) 公表日 平成16年1月8日(2004.1.8)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00 Z N A A	4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 4
A 6 1 K 38/00	A 6 1 K 39/395 H	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 V	4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 121 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2001-549423 (P2001-549423)	(71) 出願人	502227136 ミュラー-ヘルメリンク, ハンス, コンラート
(86) (22) 出願日	平成12年12月22日 (2000.12.22)		
(85) 翻訳文提出日	平成14年6月24日 (2002.6.24)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/013238		ドイツ連邦共和国 ヴェルツブルク 97082 ハイブリッヒーツォイナーストラッセ 72
(87) 国際公開番号	W02001/047953	(71) 出願人	502227147 グライナー, アクセル
(87) 国際公開日	平成13年7月5日 (2001.7.5)		ドイツ連邦共和国 トリーフェンシュタイン 97855 シュロス ホンブルク (番地なし)
(31) 優先権主張番号	199 62 583.2	(74) 代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳
(32) 優先日	平成11年12月23日 (1999.12.23)		
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 形質細胞に対する抗体

(57) 【要約】

本発明は、抗体の作製方法、形質細胞と特異的に反応する抗体、かかる抗体をコードする遺伝子、かかる抗体により標識される抗原、該抗原に対するさらなる抗体および該抗体の作製方法、ならびにかかる抗体の使用に関する。また、本発明は、(a) 本明細書において規定する抗体の結合部位を含む第1ドメイン、および(b) CD3抗原を特異的に認識する免疫グロブリン鎖または抗体の結合部位を含む第2ドメインを含有する単鎖多機能ポリペプチドに関する。さらに、本発明の化合物を含んでなる組成物およびキットを開示する。好ましくは、該組成物は、医薬用および/または診断用組成物である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも一方の軽鎖（L - 鎖）の可変領域（Fw（L））が以下のアミノ酸配列の少なくとも1つまたはその一部：

D I V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S L S C （FW - 1；配列番号：1）

K S S Q S L L D S D G K T Y L N （CDR - 1；配列番号：2）

W L L Q R P G Q S P K R L I S （FW - 2；配列番号：3）

L V S K L D S （CDR - 2；配列番号：4）

G V P D R F T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C （FW - 3；配列番号：5）

W Q G T H L P W T （CDR - 3；配列番号：6）および/または

F G G G T K L E I K R （FW - 4；配列番号：7）

を有する、

および/または少なくとも一方の重鎖（H - 鎖）の可変領域（Fw（H））が以下のアミノ酸配列の少なくとも1つまたはその一部：

Q V Q L Q Q S G P E L V K T G A S V K I S C K G S G Y S F S （FW - 1；配列番号：8）

G Y Y M H （CDR - 1；配列番号：9）

W V K Q S H G K R L E W I G （FW - 2；配列番号：10）

Y I S G Y N G D T R Y N Q K F R G （CDR - 2；配列番号：11）

K A T F I V D I S S R T A Y M Q F N S L T S E D S A V Y Y C A R （FW - 3；配列番号：12）

G G Y Y G Y V D Y （CDR - 3；配列番号：13）および/または

W G Q G T T L T V S S （FW - 4；配列番号：14）

を有することを特徴とする抗体。

【請求項 2】

少なくとも一方の軽鎖（L - 鎖）に対して以下のヌクレオチド配列またはその一部：

g a a g c a c g c g t a g a t a t c g t g a t g a c c c a a a c t c c a c t
c a c t t t g t c g g t t a c c a t t g g a c a a c c a g c c t c c c t c t
c t t g c a a g t c a a g t c a g a g c c t c t t a g a t a h t g a t g g a
a a g a c a t a t t t g a a t t g g t t g t t a c a g a g g c c a g g c c a
g t c t c c a a a g c g c c t a a t c t c t c t g g t g t c t a a a t t g g
a c t c t g g a g t c c c t g a c a g a t t c a c t g g c a g t g g a t c a
g g g a c a g a t t t c a c a c t g a a a a t c a g c a g a g t g g a g g c
t g a g g a t t t g g g a g t c t a t t a t t g c t g g c a a g g t a c a c
a t c t t c c g t g g a c a t t c g g t g g a g g c a c c a a g c t g g a a
a t c a a a c g g g c t g a t g c t g c g g c c g c t g g a t c c a t c t t
c

を含有する、

および/または少なくとも一方の重鎖（H - 鎖）に対して以下のヌクレオチド配列またはその一部：

c g c c a t g g c c g c g g g a t t c c g g c c a t g g c g c a g g t g c a
g c t g c a g c a g t c t g g a c c t g a g c t a g t g a a g a c t g g g g
c t t c a g t g a a g a t a t c t t g t a a g g g t t c t g g t t a c t c a
t t c a g t g g t t a c t a c a t g c a c t g g g t c a a g c a g a g c c a
t g g a a a g a g g c t t g a g t g g a t t g g a t a t a t t a g t g g t t
a t a a t g g t g a t a c t a g g t a t a a t c a g a a g t t c a g g g g c
a a g g c c a c a t t t a t t g t a g a c a t a t c c t c c a g g a c a g c
c t a c a t g c a g t t c a a c a g c c t g a c a t c t g a a g a c t c t g
c g g t c t a t t a c t g t g c a a g a g g g g g t t a c t a c g g c t a c

10

20

30

40

50

g t g g a c t a c t g g g g c c a a g g c a c c a c c c t c a c a g t c t c
 c t c a g c c a a a a c g a c a c c c a a g c t t g t c t a t c c a c t g g
 c c c c t g g t a a t c a c t g t g c g g c c g c c g

を含有する遺伝子によりコードされることを特徴とする抗体。

【請求項 3】

免疫グロブリン Gであることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の抗体。

【請求項 4】

両軽鎖および / または両重鎖が同じアミノ酸配列を有することを特徴とする請求項 1 ~ 3
 いずれか記載の抗体。

【請求項 5】

ハイブリドーマ細胞株 D S M A C C 2 4 4 1 により産生される請求項 1 ~ 4 いずれか
 記載の抗体。

10

【請求項 6】

多機能抗体であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 いずれか記載の抗体。

【請求項 7】

毒素もしくはサイトカインもしくは抗体フラグメントもしくは酵素などのタンパク質、ま
 たはホルモン、蛍光染料、ビオチンおよび / または放射性同位体とコンジュゲートした抗
 体であることを特徴とする請求項 1 ~ 6 いずれか記載の抗体。

【請求項 8】

毒素、酵素、サイトカインおよび / またはホルモンとの融合タンパク質であることを特徴
 とする前記請求項いずれか記載の抗体。

20

【請求項 9】

以下のヌクレオチド配列またはその一部：

g a a g c a c g c g t a g a t a t c g t g a t g a c c c a a a c t c c a c t
 c a c t t t g t c g g t t a c c a t t g g a c a a c c a g c c t c c c t c t
 c t t g c a a g t c a a g t c a g a g c c t c t t a g a t a h t g a t g g a
 a a g a c a t a t t t g a a t t g g t t g t t a c a g a g g c c a g g c c a
 g t c t c c a a a g c g c c t a a t c t c t c t g g t g t c t a a a t t g g
 a c t c t g g a g t c c c t g a c a g a t t c a c t g g c a g t g g a t c a
 g g g a c a g a t t t c a c a c t g a a a a t c a g c a g a g t g g a g g c
 t g a g g a t t t g g g a g t c t a t t a t t g c t g g c a a g g t a c a c
 a t c t t c c g t g g a c a t t c g g t g g a g g c a c c a a g c t g g a a
 a t c a a a c g g g c t g a t g c t g c g g c c g c t g g a t c c a t c t t
 c

30

および / または以下のヌクレオチド配列またはその一部

c g c c a t g g c c g c g g g a t t c c g g c c a t g g c g c a g g t g c a
 g c t g c a g c a g t c t g g a c c t g a g c t a g t g a a g a c t g g g g
 c t t c a g t g a a g a t a t c t t g t a a g g g t t c t g g t t a c t c a
 t t c a g t g g t t a c t a c a t g c a c t g g g t c a a g c a g a g c c a
 t g g a a a g a g g c t t g a g t g g a t t g g a t a t a t t a g t g g t t
 a t a a t g g t g a t a c t a g g t a t a a t c a g a a g t t c a g g g g c
 a a g g c c a c a t t t a t t g t a g a c a t a t c c t c c a g g a c a g c
 c t a c a t g c a g t t c a a c a g c c t g a c a t c t g a a g a c t c t g
 c g g t c t a t t a c t g t g c a a g a g g g g g t t a c t a c g g c t a c
 g t g g a c t a c t g g g g c c a a g g c a c c a c c c t c a c a g t c t c
 c t c a g c c a a a a c g a c a c c c a a g c t t g t c t a t c c a c t g g
 c c c c t g g t a a t c a c t g t g c g g c c g c c g

40

を含有することを特徴とする、抗体をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 10】

請求項 1 ~ 9 いずれか記載の抗体の少なくとも可変領域をコードするヌクレオチド配列。

50

【請求項 1 1】

請求項 9 または 1 0 記載のヌクレオチド配列を含有するベクターであって、該ベクターが、任意に、請求項 1 0 記載のヌクレオチド配列と組み合わせて該抗体の他方の免疫グロブリン鎖の可変領域を含有してなるベクター。

【請求項 1 2】

請求項 9 もしくは 1 0 記載のヌクレオチド配列を含有してなるか、または請求項 1 1 記載のベクターを含有してなる宿主細胞。

【請求項 1 3】

請求項 1 ~ 1 0 いずれか記載の抗体を産生しうる連続的継代安定抗体産生細胞株。

【請求項 1 4】

ハイブリドーマ細胞株、好ましくは寄託番号 D S M A C C 2 4 4 1 を有するハイブリドーマ細胞株である請求項 1 3 記載の細胞株。

【請求項 1 5】

リンパ球形質細胞系細胞段階を含めた該細胞段階に至るまでの形質細胞分化株の B 細胞で動物を免疫し、調製された抗体を常套的に該動物の血液から単離することを特徴とする、形質細胞に対する抗体の調製方法。

【請求項 1 6】

(a) 請求項 1 2、1 3 または 1 4 記載の細胞を培養する工程、および
(b) 培養物から抗体、その機能性フラグメントまたは (1 もしくは複数の) 免疫グロブリン鎖を単離する工程
を含む、形質細胞を認識しうる抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導体の調製方法。

【請求項 1 7】

請求項 1 ~ 8 いずれか記載の抗体と結合する、および / または該抗体により認識されることを特徴とする抗原。

【請求項 1 8】

ヒト形質細胞によりその表面に提示され、かつ約 9 4 k D または約 5 5 k D の分子量を有することを特徴とする請求項 1 7 記載の抗原。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 記載の抗原のエピトープ。

【請求項 2 0】

請求項 1 7 ~ 1 9 いずれか記載の抗原またはエピトープと結合する、および / または該抗体またはエピトープを認識することを特徴とする抗体。

【請求項 2 1】

請求項 2 0 記載の抗体の少なくとも一方の可変領域をコードするヌクレオチド配列。

【請求項 2 2】

請求項 1 0、1 1 もしくは 2 1 記載のヌクレオチド配列によりコードされるか、または請求項 1 5 もしくは 1 6 記載の方法により得られうる抗体、そのフラグメントもしくは誘導体または免疫グロブリン鎖。

【請求項 2 3】

請求項 1 7 または 1 9 いずれか記載の抗原またはエピトープで動物を免疫し、形成された抗体を常套的に該動物の血液から単離することを特徴とする、形質細胞に対する抗体の調製方法。

【請求項 2 4】

抗体をモノクローナル抗体として産生する細胞株を常套的に作製するために、免疫した動物の細胞を用いることを特徴とし、かつこの細胞株を培養し、産生された抗体を単離することを特徴とする、請求項 1 5 または 1 6 記載の抗体の調製方法。

【請求項 2 5】

対応する抗原を同定するための請求項 1 ~ 9、2 0 または 2 2 いずれか記載の抗体の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

形質細胞を特異的に標識するための請求項 1～9、20 または 22 いずれか記載の抗体の使用。

【請求項 27】

形質細胞を標識するさらなる抗体を引き続いて調製するための請求項 1～9、20 または 22 いずれか記載の抗体の使用。

【請求項 28】

(a) 請求項 1～9、20 または 22 いずれか記載の抗体または免疫グロブリンの結合部位を含む第 1 ドメイン、および

(b) CD3 抗原を特異的に認識する免疫グロブリン鎖または抗体の結合部位を含む第 2 ドメイン

を含有してなる単鎖多機能ポリペプチド。

【請求項 29】

前記ドメインがポリペプチドリンカーにより連結されてなる請求項 28 記載のポリペプチド。

【請求項 30】

前記第 1 および / または第 2 ドメインが、天然抗体由来の V_H 領域および V_L 領域を擬態するか、またはこれらに相当する請求項 28 または 29 記載のポリペプチド。

【請求項 31】

前記抗体が、モノクローナル抗体、合成抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体である請求項 28～30 いずれか記載のポリペプチド。

【請求項 32】

前記ドメインが抗体の可変領域の単鎖フラグメントである請求項 28～31 いずれか記載のポリペプチド。

【請求項 33】

二重特異性単鎖抗体である請求項 28～32 いずれか記載のポリペプチド。

【請求項 34】

配列番号：21 に示す核酸分子によりコードされる請求項 28～33 いずれか記載のポリペプチド。

【請求項 35】

配列番号：22 に示すアミノ酸配列を含有してなる請求項 28～33 いずれか記載のポリペプチド。

【請求項 36】

発現する際、請求項 28～35 いずれか記載のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。

【請求項 37】

請求項 36 記載のポリペプチドを含有してなるベクター。

【請求項 38】

請求項 36 記載のポリヌクレオチドまたは請求項 37 記載のベクターでトランスフェクトした細胞。

【請求項 39】

請求項 1～9、20 または 22 いずれか記載の抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導體、請求項 28～35 いずれか記載の多機能ポリペプチド、請求項 10、11、21 または 36 いずれか記載のヌクレオチド配列 / ポリヌクレオチド、請求項 37 記載のベクター、請求項 12 または 38 記載の細胞を含有してなる組成物。

【請求項 40】

任意に、薬学的に許容され得る担体をさらに含有する医薬組成物である請求項 39 記載の組成物。

【請求項 41】

任意に、適当な検出手段をさらに含む診断用組成物である請求項 39 記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2】

自己免疫疾患および/または腫瘍、例えば多発性骨髄腫、リンパ腫および/または形質細胞腫の治療のための、請求項 1 ~ 9、20 または 22 いずれか記載の抗体、請求項 28 ~ 35 いずれか記載の多機能ポリペプチド、請求項 10、11、21 または 36 いずれか記載のヌクレオチド配列/ポリヌクレオチド、請求項 37 記載のベクター、請求項 12 または 38 記載の細胞の使用。

【請求項 4 3】

自己免疫疾患、腫瘍、例えば多発性骨髄腫および/またはリンパ腫の治療のための医薬品の調製のための、請求項 1 ~ 9、20 または 22 いずれか記載の抗体、請求項 28 ~ 35 いずれか記載の多機能ポリペプチド、請求項 10、11、21 または 36 いずれか記載のヌクレオチド配列/ポリヌクレオチド、請求項 37 記載のベクター、請求項 12 または 38 記載の細胞の使用。

10

【請求項 4 4】

請求項 1 ~ 9、20 または 22 いずれか記載の抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導体、請求項 17 または 18 記載の抗原、請求項 19 記載のエピトープ、請求項 28 ~ 35 いずれか記載の多機能ポリペプチド、請求項 10、11、21 または 36 いずれか記載のヌクレオチド配列/ポリヌクレオチド、請求項 37 記載のベクター、請求項 12 または 38 記載の細胞を含んでなるキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、形質細胞に対する抗体の作製方法、抗体、かかる抗体をコードする遺伝子、かかる抗体により標識される抗原、該抗原に対するさらなる抗体および該抗体の作製方法、ならびにかかる抗体の使用に関する。また、本発明は、(a) 本明細書において規定する抗体の結合部位を含む第 1 ドメイン、および (b) CD3 抗原を特異的に認識する免疫グロブリン鎖または抗体の結合部位を含む第 2 ドメインを含有する単鎖多機能ポリペプチドに関する。かかる抗体および/または単鎖多機能ポリペプチドは、生物学的および医学的診断の分野において、ならびに自己免疫疾患または形質細胞腫もしくはリンパ腫などの腫瘍の治療において特に必要とされる。本発明はまた、該抗体および/または単鎖多機能ポリペプチドをコードする核酸分子/ポリヌクレオチド、ならびに該核酸分子/ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび宿主細胞を提供する。最後に、本発明は、本発明の化合物を含有してなる組成物を提供する。好ましくは、該組成物は、医薬用および/または診断用組成物である。

20

30

【0002】

動物生体において、およびヒトにおいてもまた、免疫システムは 2 通りの異なる様式で刺激(抗原)に应答する。一方で、異物として認識される抗原に対する抗体が形質細胞(分化 B リンパ球)により産生される体液性免疫応答が生じる。他方で、T リンパ球による細胞性免疫応答が生じ得、これが B 細胞を刺激する。

【0003】

体液性免疫応答により産生される抗体は、抗原決定基、すなわち抗体と結合する抗原上の特異的領域(エピトープ)に対するものである。これらの抗体は、それぞれ同一の 2 種の鎖、重鎖(H鎖)および軽鎖(L鎖)からなる(各 L 鎖はジスルフィド結合により一方の H 鎖に連結しており、各ペアは抗原決定基の特異的結合部位を形成する)、球状タンパク質(免疫グロブリン Ig、例えば、IgM または IgG)である。

40

【0004】

任意の抗原に対する抗体は、動物生体に抗原を播種し、続いて、その体液性免疫応答によって該播種した抗原に対する抗体が形成されるといような常套手法により産生される。これらの抗体は、その後、単離されうる。さらに、最近では、いわゆるモノクローナル抗体を作製することが可能である。この目的のために、増殖中の骨髄腫細胞を、免疫した動物生体由来の B 細胞と融合させ、これが B 細胞として対応する抗体を産生する。その結果、ハイブリドーマ細胞が形成され、これは、一方で骨髄腫細胞のように増殖し、他方で形

50

質細胞のように抗体を形成する。これらのハイブリドーマ細胞を培養し、産生されたモノクローナル抗体を培養物から得る。これらの一般に知られ、かつ頻繁に使用される方法に関しては、例えば、Greiner A.ら Laboratory Investigation (1994)、70巻、572-578頁、およびそこに記載の他の出展を参照されたい。

【0005】

したがって、モノクローナル抗体技術は、多数の同一抗体の産生を可能にする。

【0006】

抗体産生形質細胞へのB細胞の分化の間、ヒトおよび動物における重篤な疾患をもたらす種々の障害が生じ得る。B細胞レベルでは、内因性細胞が抗体によって誤って検出することにより、例えば、対応する形質細胞により該内因性細胞に対する多数の抗体が産生および分泌される自己免疫疾患を生じ得る。他方、B細胞は、制御不能に分裂を開始し、それにより腫瘍(リンパ腫)が形成され得る。さらに、かかる無制限の増殖は、形質細胞レベルでも知られている(症候群:形質細胞腫、多発性骨髄腫)。

10

【0007】

多発性骨髄腫は、骨髄における悪性形質細胞の蓄積および特異的免疫グロブリン、通常モノクローナルIgGまたはIgAの産生の増加を特徴とする形質細胞障害である。明白な多発性骨髄腫の一般的な合併症には、再発性の細菌感染、貧血、骨溶解性病変および腎不全が含まれる。多発性骨髄腫は、西洋諸国において癌に関連するすべての死の約1%を占める。その疫学的様式は依然として不明であり、その原因は未知である(BatailleおよびHarousseau, 1997, N. Engl. J. Med. 336)

20

【0008】

該疾患を治療するために、関与している変性細胞を免疫学的に検出することが必要である。

【0009】

先行技術において、すべての形質細胞を認識する、形質細胞に対する抗体が記載されているのは真実である。しかしながら、これらの抗体に対応する抗原は、細胞内のみ存在し、したがって検出前に細胞を破壊する必要がある(Andersonら(1984) J. Immunol., vol. 132, 3271-3179参照のこと)。したがって、形質細胞を破壊せずにこれを検出することは不可能であった。

30

【0010】

さらに、表面抗原に対する抗体が知られている(Andersonら(1984) J. Immunol., vol. 132, 3172-3179, Andersonら(1983) J. Immunol., vol. 130, 1132-1138, Tongら(1987) Blood, vol. 69, 238-148 または Turleyら(1994), J. Clin. Pathol., vol. 47, 418-422 参照のこと)。しかしながら、これらの抗体は、特異性を持たず、未成熟前駆細胞および成熟形質細胞の両方を検出する。これらの研究によると、分化した抗体分泌段階の形質細胞は、B細胞段階に典型的な表面抗原を失う。したがって、成熟細胞(抗体そのものを形成する分化形質細胞)から未熟前駆細胞(骨髄細胞またはB細胞)を分取することが不可能であった。

40

【0011】

結果的に、抗体受容体(抗原決定基)として機能しうる特異的表面分子(cluster of differentiation, CD)を検出することは、これまでは不可能であった。それが完全に分化した状態により、無傷の形質細胞は、免疫学的にほとんど認識できないか、区別不可能である。

【0012】

したがって、成熟形質細胞を特異的に攻撃する、前述の症候群の治療は知られていない。

【0013】

50

このように、前述の症候群に対してこれまで利用可能な唯一の治療は、特にマルチモード (multimode) 化学療法の形態の化学療法である。しかしながら、これは、化学療法の一般に知られた欠点を有する。これまでに知られた該治療コンセプトの概要は、例えば、Lokhorst H. M. ら、Br. J. Haematol. (1999)、106巻、18-27頁に記載されている。

【0014】

上記の高用量化学療法および自己由来幹細胞/骨髄移植に関してある程度進歩したにも関わらず、多発性骨髄腫はなお、平均余命が約3~5年の治療不可能な疾患である (Peest (1995) Eur J Cancer 31a:146-151; Attal (1996) N Engl J Med 335:91-97)。この厳しい (bleak) 状況が、代替治療ストラテジーの研究を刺激しており、なかでも免疫療法的ストラテジーの役割が大きくなっている。形質細胞の除去一般および特に多発性骨髄腫の治療のための、抗体に基づくストラテジーの開発は、安定な形質細胞特異的表面抗原がこれまでに見つかっていないという事実により妨げられている (Batailleおよび Harousseau, 1997, loc. cit.; Hallek, 1998 Blood 91, 3-21; また、Greiner, 2000, Virchows Arch 437, 372-379も参照のこと)。これまで、B細胞発達の初期段階でのB細胞分化に関する研究作業がたくさん行われてきたが、形質細胞までの途中で分化が終結することに関してほとんどわかっていない。したがって、その本質的な理由は、形質細胞に特異的な抗体が形質細胞の同定のために利用し得ないということである。形質細胞に関してこれまで公表されているCD44、CD38、PC-1、PCA-1、MMA、BB-1またはVS38などの抗体は、反応する範囲が広いという不都合ならびに種々の他の組織および細胞質抗原とも反応するという不都合を有する。正常形質細胞および悪性形質細胞は、いくつかの十分に特性付けされた表面マーカーを発現するが、それらはすべて、形質細胞非特異的であることがわかっている。CD38は、分化関連抗原というよりむしろ活性化関連抗原であり、系統制限 (lineage restriction) がない (Funaro, 1990; Alessio, 1990, J. Immunol. 145, 878-884)。CD56は、NK細胞上でも発現されるN-CAMスプライスバリエーションである (Pellat-Deceunynck ら、1998, Leukemia 12, 1977-1982; Robillard, 1998, Clin. Cancer Res. 4, 1521-1526), 3)。CD138 (シンデカン-1) もまた、上皮上で発現される (Sebestyen, 1999, Br. J. Haematol. 104, 412-419; Maatta, 1999, J. Biol. Chem. 274, 9891-9898; Anttonen, 1999, Br. J. Cancer 79, 558-564; Kato, 1995, Mol. Biol. Cell 6, 559-576)。最近記載された形質細胞関連抗原HM1.24は、骨髄間質細胞などの他の細胞型によっても発現されることがわかった (Batailleおよび Harousseau, 1997, loc. cit.; Hallek, 1998, loc. cit.; Greiner, 2000, loc. cit.; Ohtomo, 1999, Biochem. Biophys. Res. Commun. 258, 583-591)。このように、上記抗体のすべてが形質細胞および多発性骨髄腫細胞を特異的に同定するわけではない。

【0015】

リンパ腫細胞を排除するための、抗体に基づくアプローチは、人間において、標準IgG抗体および放射性免疫コンジュゲートの形態のいずれかで有効であることが証明されている。そのような分子は、CD20およびCD52を認識する抗体に基づくものである (リチュキマブ、イブリチュモマブ、トシチュモマブ、キャンパス-1H)。これらの抗体に基づくアプローチは、リンパ腫および白血病の治療において非常に有望な結果を示すが、標的は形質細胞悪性腫瘍 (形質細胞腫/多発性骨髄腫) に適さない。

【0016】

10

20

30

40

50

形質細胞は、すべてのB細胞のうちたった1%を占め、ごく少数のみがパンB細胞（pan-B cell）マーカーであるCD19（通常CD19ネガティブ）およびCD20（20%未満）を発現する。したがって、CD19またはCD20に対する抗体に基づく治療アプローチは、形質細胞の少数のサブセットのみを標的とする一方で、非形質B細胞の望ましくない排除による大きな細胞毒性応答を誘導する。

【0017】

結果として、本発明は、形質細胞を特異的に標識する抗体の調製方法を提案する課題および該抗体を提案する課題に取り組むものである。さらに、本発明は、対応する抗体をコードする遺伝子およびかかる抗体の使用を提案する課題に取り組むものである。さらにまた、本発明は、かかる抗体により標識される抗原を提案する課題に取り組むものである。また、本発明の技術的課題は、形質細胞悪性腫瘍を緩和、予防または治療するための手段および方法を提供することであった。

10

【0018】

この課題は、本発明の抗体、単鎖ポリペプチド、抗原、該抗体、該単鎖ポリペプチドもしくは該抗原をコードするヌクレオチド配列、さらなる抗体および/または単鎖ポリペプチドの使用およびこれらを調製する方法により解決される。有利な態様は添付の請求の範囲において特定化される。

【0019】

特異的抗原に対する抗体を得るために、当該技術水準では、対応する抗原を動物生体に播種する（例えば、注射により）ことが提案されており、その結果、体液性免疫応答によりこの抗原に対する抗体が形成される。産生された抗体を、続いて分離および精製しうる。これまで、この方法は、無傷の成熟形質細胞では、表面上に抗原決定基がほとんどないため結果が良好でなかった。この方法では、形質細胞に特異的な特異的抗体を調製することはおそらく不可能であり、形質細胞に関しては播種を行う試みは結果が良好でなかった。

20

【0020】

これは本発明の起点であり、本発明では、普及した教示とは対照的に、リンパ球形質細胞系細胞段階を含めた該細胞段階に至るまでの形質分化株のB細胞で動物生体を免疫する。したがって、先行技術とは対照的に、播種に用いるのは所望の抗原、すなわち形質細胞ではなく、その前駆細胞である。しかしながら、驚いたことに、まさにこの方法は、対応する前駆細胞段階を標識せずに形質細胞を特異的に標識する抗体を得ることを可能にする。この理由は、対応する前駆細胞が播種後、動物生体においてさらに形質細胞へと発達し、形質細胞が、形質細胞の直接免疫では生じ得ない特異的抗体反応を誘発するためであろう。現在、該動物生体由来の対応する脾臓細胞を骨髓腫細胞と融合させてハイブリドーマ細胞とすることにより、産生された抗体をモノクローナル抗体としてかかる免疫した動物生体から容易に得ることが可能である。この点について、モノクローナル抗体の産生方法の一般に知られた技術水準に関する記載がある（本明細書中の以下の記載も参照のこと）。

30

【0021】

抗体は、本質的に、そのL鎖およびH鎖の可変領域（Fw）により規定される。L鎖およびH鎖のそれぞれのその他の領域（Fc）は、該抗体の抗原特異性に何ら貢献せず、各場合で異なる抗体クラスにおいて大きくは変わり得ない。

40

【0022】

本発明の抗体は、軽鎖（L鎖）の少なくとも1つの可変領域（Fw（L））が以下のアミノ酸配列の少なくとも1つまたはその一部：

D I V M T Q T P L T L S V T I G Q P A S L S C （可変領域FW - 1；配列番号：1）

K S S Q S L L D S D G K T Y L N （相補性決定領域CDR - 1；配列番号：2）

W L L Q R P G Q S P K R L I S （可変領域FW - 2；配列番号：3）

L V S K L D S （相補性決定領域CDR - 2；配列番号：4）

G V P D R F T G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C （可変領域FW - 3；配列番号：5）

50

W Q G T H L P W T (相補性決定領域 C D R - 3 ; 配列番号 : 6) および / または
F G G G T K L E I K R (可変領域 F W - 4 ; 配列番号 : 7)

を有する、

および / または重鎖 (H - 鎖) の少なくとも 1 つの可変領域 (F w (H)) が以下のアミノ酸配列の少なくとも 1 つまたはその一部 :

Q V Q L Q Q S G P E L V K T G A S V K I S C K G S G Y S F S (可変領域 F W - 1 ; 配列番号 : 8) ,

G Y Y M H (相補性決定領域 C D R - 1 ; 配列番号 : 9)

W V K Q S H G K R L E W I G (可変領域 F W - 2 ; 配列番号 : 10)

Y I S G Y N G D T R Y N Q K F R G (相補性決定領域 C D R - 2 ; 配列番号 : 11) 10

K A T F I V D I S S R T A Y M Q F N S L T S E D S A V Y Y C A R (可変領域 F W - 3 ; 配列番号 : 12)

G G Y Y G Y V D Y (相補性決定領域 C D R - 3 ; 配列番号 : 13) および / または
W G Q G T T L T V S S (可変領域 F W - 4 ; 配列番号 : 14)

を有することを特徴とする。

【 0 0 2 3 】

これらの抗体はまた、該抗体の個々の鎖 (L - 鎖および H - 鎖) をコードする遺伝子が、L - 鎖に対して以下 :

```

g a a g c a c g c g t a g a t a t c g t g a t g a c c c a a a c t c c a c t
c a c t t t g t c g g t t a c c a t t g g a c a a c c a g c c t c c c t c t
c t t g c a a g t c a a g t c a g a g c c t c t t a g a t a h t g a t g g a
a a g a c a t a t t t g a a t t g g t t g t t a c a g a g g c c a g g c c a
g t c t c c a a a g c g c c t a a t c t c t c t g g t g t c t a a a t t g g
a c t c t g g a g t c c c t g a c a g a t t c a c t g g c a g t g g a t c a
g g g a c a g a t t t c a c a c t g a a a a t c a g c a g a g t g g a g g c
t g a g g a t t t g g g a g t c t a t t a t t g c t g g c a a g g t a c a c
a t c t t c c g t g g a c a t t c g g t g g a g g c a c c a a g c t g g a a
a t c a a a c g g g c t g a t g c t g c g g c c g c t g g a t c c a t c t t
c (配列番号 : 15)

```

および / または H - 鎖に対して以下 :

```

c g c c a t g g c c g c g g g a t t c c g g c c a t g g c g c a g g t g c a
g c t g c a g c a g t c t g g a c c t g a g c t a g t g a a g a c t g g g g
c t t c a g t g a a g a t a t c t t g t a a g g g t t c t g g t t a c t c a
t t c a g t g g t t a c t a c a t g c a c t g g g t c a a g c a g a g c c a
t g g a a a g a g g c t t g a g t g g a t t g g a t a t a t t a g t g g t t
a t a a t g g t g a t a c t a g g t a t a a t c a g a a g t t c a g g g g c
a a g g c c a c a t t t a t t g t a g a c a t a t c c t c c a g g a c a g c
c t a c a t g c a g t t c a a c a g c c t g a c a t c t g a a g a c t c t g
c g g t c t a t t a c t g t g c a a g a g g g g g t t a c t a c g g c t a c
g t g g a c t a c t g g g g c c a a g g c a c c a c c c t c a c a g t c t c
c t c a g c c a a a a c g a c a c c c a a g c t t g t c t a t c c a c t g g
c c c c t g g t a a t c a c t g t g c g g c c g c c g (配列番号 : 16)

```

のヌクレオチド配列または対応するそのフラグメントを含有することを特徴とし得る。

【 0 0 2 4 】

各場合における本発明のヌクレオチド配列は、上述のヌクレオチド配列またはその一部を含有し、各場合において上述の抗体、機能性抗体、そのフラグメントおよび / または機能性誘導体に必要な遺伝子の 1 つを提示する。

【 0 0 2 5 】

該抗体は、両軽鎖および両重鎖がそれぞれ同じアミノ酸配列を有する従来の免疫グロブリン、例えば免疫グロブリン G (I g G) でありうる。好ましくは、該抗体はマウス I g G 10

994), 3245-3260)。したがって、本明細書の下記の記載の、および実施例に記載の抗体のこれらの誘導体のすべては、抗体が形質細胞、好ましくはヒト形質細胞に特異的な抗原の少なくとも1つのエピトープを特異的に認識するかぎり本発明の範囲に包含される。本明細書に記載するように、本発明の抗体は、例えば、Fv、FabおよびF(ab)₂を含む完全抗体以外の種々の形態で、ならびに単鎖で存在しうる(例えば、WO88/09344および本明細書の以下の記載を参照のこと)。

【0027】

本発明の抗体、その対応する(1または複数の)免疫グロブリン鎖および/またはその機能性フラグメントおよび誘導体を、当該技術分野で公知の常套的技術、例えば、アミノ酸の(1または複数の)欠失、(1または複数の)挿入、(1または複数の)置換、(1または複数の)付加および/または(1または複数の)組換えおよび/または当該技術分野で公知の任意の他の(1または複数の)修飾を単独または組み合わせて用いることによりさらに修飾することができる。免疫グロブリン鎖のアミノ酸配列の下地となるDNA配列に、かかる修飾を導入するための方法は、当業者に周知である。例えば、サンプルック(Sambrook)、Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.を参照のこと。

【0028】

本発明の好ましい態様では、本発明の抗体は、ハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2441により産生される抗体であり、好ましくは該抗体は、該ハイブリドーマ細胞株により産生される抗体WUE-1である。

該ハイブリドーマ細胞は、ブダペスト条約に従って、ドイツ、ブラウンシュヴァイク(Braunschweig)、培養物所蔵所(culture collection) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbHに、2000年1月1日に寄託された。本明細書に記載の抗体は、とりわけ、形質細胞の免疫学的単離、免疫学的局在化および/または精製に特に有用である。さらにまた、それらは、形質細胞と相互作用しうるか、または形質細胞と相互作用する化合物の検出および/または同定のためのアッセイに使用しうる。

【0029】

本発明はまた、例えば、免疫グロブリンの定常ドメインに連結したWUE-1抗体の可変重鎖ドメインおよび軽鎖ドメインをコードするcDNAのヒトB細胞株へのトランスダクションにより、ヒト化形態の本発明の抗体を産生しうる(ヒト)B細胞株に関する。該cDNAは、当業者に周知の方法、とりわけ、サンプルック(Sambrook), loc. cit. およびオスベル(Ausubel) "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989)に記載されている方法により得られ得る。発現(または配列決定)のための該cDNAのクローニングは、例えば、オーランドイ(Orlandi)、PNAS 86 (1989), 3833-3837に記載のような標準プロトコル、またはmAb WUE-1の可変領域のクローニングを記載した本実施例に示すような標準プロトコルに従いうる。

【0030】

さらにまた、本発明は、本発明の抗体および/または本発明の前述の抗体の任意の免疫グロブリン鎖の少なくとも可変領域をコードするヌクレオチド配列/ポリヌクレオチドを提供する。該領域をコードするポリヌクレオチドは、当業者に周知の方法(とりわけ、オーランドイ(Orlandi)、PNAS 86 (1989), 3833-3837またはサンプルック(Sambrook), loc. cit.に記載のようなクローニング技術を含む)により得ることができる。免疫グロブリンの一形態は、抗体の基本構造ユニットを構成する。この形態は、四量体であり、2つの同一の免疫グロブリン鎖ペア(

10

20

30

40

50

各ペアは、1つの軽鎖と1つの重鎖とを有する)からなる。各ペアにおいて、軽鎖および重鎖の可変領域またはドメインは共に、抗原との結合を担い、定常領域は、抗体エフェクター機能を担う。抗体に加えて、免疫グロブリンは、上述のFv、FabおよびF(ab')₂ならびに単鎖抗体(例えば、Houston, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(1988), 5879-5883 およびBird, Science 242(1988), 423426);本明細書の以下の記載も参照のこと)を含む種々の他の形態(所望の活性を保持している完全長未満のものを含む)で存在しうる。免疫グロブリンの軽鎖または重鎖の可変ドメインは、CDRともよばれる3つの超可変領域が介在した「フレームワーク」領域からなる。フレームワーク領域およびCDRの大きさは、正確に規定されている;例えば、"Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, U.S. Department of Health and Human Services (1990)を参照のこと。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種間で比較的保存されている。構成的軽鎖および構成的重鎖の組合せフレームワーク領域である、抗体のフレームワーク領域は、CDRの位置決定およびアラインメント(alignment)に役立つ。CDRは、主に、抗原のエピトープへの結合を担う。キメラ抗体は、その軽鎖および重鎖の遺伝子が、典型的には遺伝子操作によって、異なる種に属する免疫グロブリンの可変領域および定常領域の遺伝子から構築された抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の該遺伝子の可変セグメントを、ヒト定常セグメントと連結しうる。

10

20

30

40

50

【0031】

したがって、本発明の教示は、可変領域、特に形質細胞を特異的に検出/これと相互作用する抗体のCDRを提供する。該可変領域は、とりわけ、公知の組換え技術により、キメラ、合成などの抗体および/またはその免疫グロブリン分子もしくはその誘導体を作製するのに使用しうる。例えば、本発明の抗体の可変領域を、異なる種の異なるIgサブタイプまたはIg/Igサブタイプの抗体の定常領域と組合せることが想定される。このことは、とりわけ、該抗体のエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)および/または補体依存性細胞毒性の誘導のエフェクター機能を増強するのに特に有用でありうる。当業者は、かかるエフェクター機能が抗体/免疫グロブリン分子の定常部分に大いに依存することを認識しており、それに応じてかかる定常部分を選択しうる。

【0032】

したがって、本発明の抗体は、本発明の抗体の免疫グロブリン重鎖および免疫グロブリン軽鎖の単独または組み合わせのいずれかをコードする組換えDNAセグメントを発現させることにより作製することができる。該ポリヌクレオチドは、例えば、DNA、cDNA、RNA、または合成により作製したDNAもしくはRNA、または任意のこれらのポリヌクレオチドの単独または組合せを含有する組換えにより作製したキメラ核酸分子でありうる。好ましくは、該ポリヌクレオチドはベクターの一部である。かかるベクターは、適切な条件下で適切な宿主細胞内での該ベクターの選択を可能にするマーカー遺伝子などのさらなる遺伝子を含有しうる。好ましくは、本発明のポリヌクレオチドは、原核細胞または真核細胞における発現を可能にする発現制御配列に作動可能に連結している。該ポリヌクレオチドの発現は、翻訳可能なmRNAへのポリヌクレオチドの転写を含む。真核細胞、好ましくは哺乳動物細胞での発現を確実にする調節エレメントは当業者に周知である。それらは、通常、転写の開始を確実にする調節配列ならびに、任意に、転写の終結および転写産物の安定化を確実にするポリAシグナルを含む。さらなる調節エレメントには、転写エンハンサーおよび翻訳エンハンサーおよび/または天然のもしくは異系のプロモーター領域が含まれうる。これに関して、当業者は、軽鎖および/または重鎖の少なくとも可変領域をコードするポリヌクレオチドが両方または一方のみの免疫グロブリン鎖の可変領域をコードしうることを容易に理解する。同様に、該ポリヌクレオチドは、発現に関して、同じプロモーターの制御下であってもよく、別々に制御されてもよい。原核宿主細胞での発現を可能にする考え得る調節エレメントとしては、例えば、大腸菌におけるP_L、l

a c、tr p または t a c プロモーターが挙げられ、真核宿主細胞での発現を可能にする調節エレメントの例には、酵母における A O X 1 または G A L 1 プロモーター、または哺乳動物細胞および他の動物細胞における C M V -、S V 4 0 -、R S V - プロモーター（ラウス肉腫ウイルス）、C M V - エンハンサー、S V 4 0 - エンハンサーまたはグロビンイントロンが挙げられる。抗体誘導体、例えば、単鎖構築物については実施例で後述するように、E F - 2 プロモーターを用い得る。転写の開始を担うエレメントの他に、かかる調節エレメントはまた、該ポリヌクレオチドの下流の S V 4 0 - ポリ - A 部位または t k - ポリ - A 部位などの転写終結シグナルを包含しうる。本文脈において、適切な発現ベクターは、当該技術分野で公知であり、O k a y a m a - B e r g c D N A 発現ベクター p c D V 1（ファルマシア（P h a r m a c i a）社）、p C D M 8、p R c / C M V 10、p c D N A 1、p c D N A 3（インビトロゲン（I n - v i t r o g e n e）社）、p S P O R T 1（ギブコ（G I B C O B R L）社）などである。

好ましくは、発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換またはトランスフェクトしうる、ベクター内の真核生物プロモーターシステムであるが、原核宿主の制御配列もまた使用し得る。いったんベクターが適切な宿主内に取り込まれると、該宿主は、ヌクレオチド配列の高レベル発現に適した条件下に維持され、所望により、免疫グロブリンの軽鎖、重鎖、軽鎖/重鎖二量体もしくは無傷の抗体、結合フラグメントまたは他の免疫グロブリン型の回収および精製を続行しうる。B e y c h o k, C e l l s o f I m m u n o g l o b u l i n S y n t h e s i s, A c a d e m i c P r e s s, N. Y., (1979) 参照のこと。 20

【0033】

上述のように、本発明のヌクレオチド配列ポリヌクレオチドは、例えば、形質細胞の悪性腫瘍に関連する疾患の遺伝子治療または診断のために、細胞内で本発明の抗体を発現させるために単独で、またはベクターの一部として使用することができる。上記抗体の任意の1つをコードする（1または複数の）DNA配列を含有してなるポリヌクレオチドまたはベクターを細胞内に導入すると、次にこれが目的の抗体を産生する。エキソビボまたはインビボ技術によって細胞内に治療用遺伝子を導入することに基づく遺伝子治療は、遺伝子導入の最も重要な応用である。インビトロまたはインビボ遺伝子治療のための適切なベクター、方法、または遺伝子送達システムは、文献に記載されており、当業者に公知である。例えば、G i o r d a n o, N a t u r e M e d i c i n e 2 (1996), 5 34 - 539; S c h a p e r, C i r c. R e s. 79 (1996), 911 - 919; A n d e r s o n, S c i e n c e 256 (1992), 808 - 813; I s n e r, L a n c e t 348 (1996), 370 - 374; M u h l h a u s e r, C i r c. R e s. 77 (1995), 1077 - 1086; W a n g, N a t u r e M e d i c i n e 2 (1996), 714 - 716; W O 94/29469; W O 97/00957, O n o d u a, B l o o d 91 (1998), 30 - 36; V e r z e l e t t i, H u m. G e n e T h e r. 9 (1998), 2244 - 2251; V e r m a, N a t u r e 389 (1997), 239 - 242; 米国特許第5,580,859号明細書; 米国特許第5,589,466号明細書; 米国特許第4,394,448号明細書または S c h a p e r, C u r r e n t O p i n i o n i n B i o t e c h n o l o g y 7 (1996), 635 - 640、および本明細書に引用した文献を参照のこと。本発明のポリヌクレオチドおよびベクターは、細胞内に直接導入するために設計されてもよく、リボソームまたはウイルスベクター（例えば、アデノウイルス、レトロウイルス）を介して導入するために設計されてもよい。好ましくは、該細胞は、生殖細胞、胚細胞もしくは卵細胞またはそれらの誘導体であり、最も好ましくは、該細胞は幹細胞である。この態様は、例えば、本明細書に記載（下記の実施例も参照のこと）の、一方の特異性が、形質細胞関連疾患の治療を容易にしうる形質細胞抗原に対するものである本発明の二重特異性抗体に特に好適である。 40

【0034】

さらに、本発明は、ベクター、特に、本発明の抗体の鎖の可変ドメインをコードするポリ 50

ヌクレオチドを、任意に、本発明の抗体の他の鎖の可変ドメインをコードする本発明のポリヌクレオチドとの組合せで含有してなる、従来より遺伝子操作に用いられているプラスミド、コスミド、ウイルスおよびバクテリオファージに関する。好ましくは、該ベクターは、発現ベクターおよび/または遺伝子導入ベクターまたはターゲティングベクターである。レトロウイルス、ワクシニアウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス、またはウシ乳頭腫ウイルスなどのウイルス由来の発現ベクターを、標的細胞集団に本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを送達するために使用しうる。組換えウイルスベクターを構築するために、当業者に周知の方法を使用することができる。例えば、Sambrook, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. および Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989) に記載の技術を参照のこと。あるいはまた、標的細胞への送達のために、本発明のポリヌクレオチドおよびベクターを、リポソーム内に再構築することができる。本発明のポリヌクレオチド(例えば、配列および発現制御配列をコードする、免疫グロブリン鎖の重鎖および/または軽鎖の可変ドメイン)を含有するベクターを、周知の方法(宿主細胞の型により異なる)により宿主内に導入することができる。例えば、塩化カルシウムトランスフェクションが原核細胞に通常使用されるが、他の宿主細胞には、リン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用されうる。上記 Sambrook 参照のこと。いったん発現されると、本発明の全抗体、その二量体、個々の軽鎖および重鎖または他の免疫グロブリン型を、硫酸沈降法、アフィニティーカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動などを含む当該技術分野の標準手順(Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982) 参照のこと)に従って精製し得る。医薬用途のためには、少なくとも約90~95%の均一度の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98~99%以上の均一度の実質的に純粋な免疫グロブリンが最も好ましい。いったん、部分的または所望の均一度まで精製すると、次に、該ポリペプチドを治療(生体外を含む)に、またはアッセイ手順の開発および実施に使用し得る。

【0035】

本発明はさらにまた、本発明のヌクレオチド配列/ポリヌクレオチドまたはベクターで形質転換した宿主細胞に関する。該宿主細胞は、原核細胞であっても真核細胞であってもよい。宿主細胞内に存在する本発明のポリヌクレオチドまたはベクターは、該宿主細胞のゲノムに組み込まれていてもよく、染色体外に維持されていてもよい。宿主細胞は、任意の原核細胞または真核細胞でありうる。「原核細胞の」という用語は、本発明の抗体の発現のためにDNAまたはRNA分子で、または対応する免疫グロブリン鎖で形質転換またはトランスフェクトされうるすべての細菌を含むことを意図する。原核宿主には、例えば大腸菌、*S. typhimurium*, *Serratia marcescens* および *Bacillus subtilis* などのグラム陰性菌およびグラム陽性菌が含まれ得る。「真核細胞の」という用語は、昆虫、真菌、植物、動物またはヒトの細胞を含むことを意図するが、これらに限定されない。好ましい真菌細胞は、例えば、*Saccharomyces* 属のもの、特に *S. cerevisiae* 種のものである。本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドは、当業者に一般に知られた任意の技術を用いて宿主を形質転換またはトランスフェクトするのに使用することができる。真核細胞または原核細胞それぞれの形質転換またはトランスフェクションの目的のために、形質細胞、例えば、本発明の抗原のエピトープを認識する抗体のコード配列を含有するプラスミドまたはウイルスを使用することが特に好ましい。融合した、作動可能に連結した遺伝子の調製ならびに例えば、哺乳物細胞および細菌におけるその発現のための方法は当該技術分野において周知である(Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989)

。そこに記載された遺伝子構築物および方法は、真核宿主または原核宿主において本発明の抗体を発現させるのに使用することができる。一般に、挿入されたポリヌクレオチドの効率的な転写を促進するプロモーター配列を含有する発現ベクターを、宿主と組み合わせて使用する。発現ベクターは、典型的には、複製起点、プロモーターおよびターミネーター、ならびに形質転換された細胞の表現型選択を提供しうる特異的遺伝子を含有する。形質転換された宿主は、当該技術分野で公知の技術に従って、ファーマンター内で成長させ、最適な細胞増殖が達成されるまで培養することができる。次いで、本発明の抗体またはその対応する（1または複数の）免疫グロブリン鎖を、増殖培地、細胞溶解物または細胞膜の画分から単離し得る。例えば、微生物により発現された本発明の抗体または免疫グロブリン鎖の単離および精製は、例えば本発明の抗体の定常領域に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の使用を含むものなどの、例えば調製用クロマトグラフィーによる分離および免疫学的分離などの常套的な任意の手段でありうる。

10

【0036】

さらなる態様では、本発明は、本発明の抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導体を産生しうる連続的安定継代抗体産生細胞株に関する。該細胞株は、先に本明細書にて記述したように、ハイブリドーマ細胞株、好ましくは寄託番号 D S M A C C 2 4 4 1 を有する該ハイブリドーマ細胞株である。

【0037】

さらに別の態様では、本発明は、リンパ球形質細胞系細胞段階を含めた該細胞段階に至るまでの形質細胞分化株の B 細胞で動物を免疫し、調製された抗体を常套手法により該動物の血液から単離することを特徴とする、形質細胞に対する抗体の調製方法を提供する。とりわけ、下記の実施例で示すように、マウス、好ましくは B A L B / c マウスを標準プロトコルに従って、例えばインピトロで形質細胞に分化しうるリンパ腫細胞株、とりわけ M A L T - 型 (H 3 3 0 2) のリンパ腫で、免疫しうる。

20

【0038】

さらにまた、本発明は、

(a) 抗体、その機能性フラグメント、誘導体または免疫グロブリン鎖を発現し得る、本発明の (宿主) 細胞またはハイブリドーマ細胞を培養する工程、および

(b) 細胞または培養培地から該抗体、その機能性フラグメント、誘導体または免疫グロブリン鎖を単離する工程

30

を含む、形質細胞を認識しうる抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導体の調製方法を提供する。

【0039】

本発明はまた、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターで細胞を遺伝子操作する工程を含む、本発明の抗体またはその対応する（1または複数の）免疫グロブリン鎖を発現しうる細胞の作製方法に関連する。好ましくは、このようにして発現された（1または複数の）免疫グロブリン鎖はトランスフェクトされた細胞の細胞表面上にディスプレイされる。この態様および本明細書に記載の他のいくつかの態様は、上述のものなどのファージディスプレイ技術に適合しうる。本発明の方法により得られ得る細胞は、例えば、本発明の抗体とその抗原との相互作用を試験するために使用することができる。上記の方法により得られ得る細胞はまた、本明細書において以下に言及するスクリーニング方法に使用しうる。さらにまた、本発明のポリヌクレオチド、ベクターまたは細胞を含有するトランスジェニック動物、好ましくはトランスジェニック哺乳動物を、本発明の抗体の大規模生産のために用い得る。

40

【0040】

さらにまた、本発明は、本発明のポリヌクレオチドによりコードされるか、あるいは上述の方法により得られうるか、または上述の方法により作製される細胞から得られ得る本発明の抗体またはそのフラグメントもしくは誘導体または免疫グロブリン鎖に関する。

【0041】

本文脈において、本発明の抗体、そのフラグメントおよび/または誘導体は、当該技術分

50

野で公知の常套法によりさらに修飾しうることも理解される。本発明の抗体を提供することにより、その結合活性に関連する部分を決定することも可能になる。これにより、結合活性に重要な本発明の抗体由来のアミノ酸配列、および異種タンパク質由来であり得る他の機能性アミノ酸配列、例えば、核局在化シグナル、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、ホルモン結合ドメイン、タンパク質タグ(GST、GFP、H-mycペプチド、Flag、HAペプチド)を含有するキメラタンパク質の構築が可能となりうる。

【0042】

本発明の抗体は、例えば毒素、サイトカイン、抗体フラグメントもしくは酵素などのタンパク質、および/または発蛍光団、ビオチンおよび/または放射性同位体との抗体コンジュゲートしても存在しうる。かかる抗体コンジュゲートおよびその調製は、例えば、"G. T. Hermanson" *Bioconjugate Techniques* "Academic Press ISBN 0-12-342336-8, 1995"、特に第8、10、11および13章、または"J. E. Coliganら、"Current Protocols in Immunology" J. Wiley and Sons, Inc. ISBN 0-471-52276-7, 1991"に記載されており、これらはすべて参照により本出願の開示内容に取り込まれる。

放射性同位体のコンジュゲーションは、ヘテロ二官能性キレート形成性活性成分により媒介される(上記G. T. Hermansonの第8章参照のこと)。

好適な放射性同位体には、イットリウム-88、イットリウム-90、インジウム-111、ヨウ素-125、ヨウ素-131、サマリウム-153、ルテチウム-177、レニウム-186、ビスマス-212またはビスマス-213が含まれる。

好適な毒素には、自身を組換え融合毒素の調製に供しうる単鎖毒素である、リシン、組換えリシン、細菌毒素PE(シュードモナス外毒素(Pseudomonas Exotoxin))またはDT(ジフテリア毒素(diphtheria toxin))が含まれる。

毒性抗体とコンジュゲートした抗体は、例えば、米国特許第5,013,547号明細書およびWO 92/07466に開示されている。

【0043】

本出願の本明細書中に取り込まれる先行技術の概要は、

放射免疫療法については、S. J. DeNardoら、「癌における放射標識抗体の新時代("A new era for radiolabeled antibodies in cancer")」、*Current Opinion in Immunology*, 1999, 第11巻, 563-569頁、

免疫毒素については、R. J. Kreitman「癌における免疫毒素("Immunotoxins in Cancer")」、*Current Opinion in Immunology*, 1999, 第11巻, 570-78頁、

二重特異性抗体については、D. M. Segalら、「癌治療における二重特異性抗体("Bispecific antibodies in cancer therapy")」、*Current Opinion in Immunology*, 1999, 第11巻, 558-562頁、

単鎖Fv-抗体の調製については米国特許第5,260,203号明細書、コンジュゲートされる、または単鎖ポリペプチド鎖として発現される抗体フラグメントの調製についてはWO 91/19739、

ヒト化抗体の調製については米国特許第5,859,205号明細書、

キメラ抗体("CDRグラフティング(grafting)")の調製については欧州特許第0 620 276号明細書、

架橋抗体の調製については米国特許第5,714,149号明細書、

抗体-サイトカイン融合タンパク質の調製については、S. D. Gilliesらによる「抗体標的化インターロイキン2は自己由来腫瘍細胞の死滅を刺激する("Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-c

10

20

30

40

50

ell killing of autologous tumor cells”）」、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1992, 第89巻, 1428 - 1432 頁または T. Dreierらによる「マウストランスフェリンレセプターを標的化する組換え免疫サイトカイン；構築および生物学的活性（” Recombinant immunocytokines targeting the mouse transferrin receptor; construction and biological activities”）」、Bioconj. Chem. 1998, 第9巻, 482 - 489頁に記載されている。

【0044】

10

上述の抗体を、形質細胞（好ましくはヒト形質細胞）を同定するため、および例えばそれらを分取するために使用することができる。例えば、この目的のために必要とされるすべてのことは、本発明の抗体を常套的に蛍光色素で標識すること、および蛍光標示細胞分取（FACS）を実施することである。さらなる分離方法は、当該技術分野の技術水準において知られている（例えば、Greiner A.ら（1997）American Journal of Pathology, vol. 150, pages 1583 - 1593 参照のこと）。しかしながら、免疫学的単離および免疫学的分離のさらなる方法は当該技術分野において公知であり、ビーズ、好ましくは磁気ビーズのような固体支持体への結合を含みうる。

【0045】

20

このようにして、すべての形質細胞を血液試料または組織から分離および単離することが可能である。この方法において、腫瘍または自己免疫疾患を引き起こす形質細胞を除去するために、変性した形質細胞もまた除去される。

【0046】

特に、形質細胞の標識および除去は、体外、例えば透析と同様の様式での外部人工血液循環でも行いうる。

【0047】

本発明はまた、本発明の抗体と結合する、および/または該抗体により認識されることを特徴とする抗原に関する。

【0048】

30

本発明の抗原は本発明の抗体により標識される。これらの抗原の1つは、形質細胞の表面タンパク質であり、かつ約94kDまたは約55kDの分子量を有することを特徴とする。本発明の抗原の分子量は、50～60kDの間であり、最も好ましくは約50～55kDであることが特に好ましい。該分子量は、とりわけ、以下の方法を用いて推定することができる。すなわち、スルホ-NHS-ピオチン（MW400；ピアス（Pierce）社）の添加により細胞懸濁物（ 10^7 細胞）をピオチン化する。該細胞、例えば患者の細胞をCHAPS-バッファー中で溶解させ、本明細書において開示した抗体、例えば、ハイブリドーマ細胞株DSM ACC 2441により分泌される抗体を免疫沈降アブローチに使用しうる。免疫沈降した物質をSDS-試料バッファー中で可溶化し得、試料を10%SDS-PAGEを用いて電気泳動させうる。分子量標準品として、SIGMA社のHMW（予備染色していない）のような商業的に入手可能な標準品を使用しうる。電気泳動させたタンパク質をニトロセルロース膜上に移し、免疫沈降させたピオチン化タンパク質をストレプトアビジン-HRP（例えば、ファルマシア社製）およびECL-システムを用いて可視化しうる。この抗原は、形質細胞の表面上だけでなく、細胞のプラスマ内にも存在することがわかった。

40

【0049】

したがって、本発明はまた、上述の抗原および/またはそのエピトープと結合することを特徴とする抗体にも関する。該抗体は、常套法および/または本明細書に記載の方法により得られ得る。特に、該抗体は、本発明の抗原および/またはそのエピトープで動物を免疫し、形成された抗体を該動物の血液から単離することにより得られ得る（とりわけ、H

50

arlowおよび Lane, loc. cit. 参照のこと)。

該抗体(1つまたは複数)はまた、抗体をモノクローナル抗体として産生する細胞株を作製するために、免疫した動物の細胞を用いることにより調製しうる。ここで、この細胞株を培養し、産生された抗体を単離する。好ましくは、該培養細胞は、免疫した動物の脾臓細胞由来の細胞であり、好ましくは該細胞は、骨髄腫細胞との融合により調製したハイブリドーマ細胞である(下記実施例も参照のこと)。

【0050】

本発明の好ましい態様では、本発明の抗体を、対応する抗原を同定および/または特性付けするため、および/または形質細胞、好ましくはヒト形質細胞を特異的に標識/検出/認識するために使用する。該抗体はまた、形質細胞を標識/認識するさらなる抗体、そのフラグメントまたは誘導体を調製するために使用しうる。本発明はまた、このような抗体、そのフラグメントまたは誘導体の少なくとも一方の可変領域をコードするヌクレオチド配列/ポリヌクレオチドに関する。

10

本発明の抗体を用い、本発明の抗原の少なくとも1つのエピトープを有するペプチドに関して大腸菌のcDNA発現ライブラリーを間接的にスクリーニングしうることも強調しておかなければならない(Chang および Gottlieb, J. Neurosci., 8:2123, 1988)。かかる抗原の構造が明らかになると、結合パートナーおよび/またはドメインの合理的な設計が可能となりうる。例えば、フォールディングのシミュレーションおよび構造モチーフのコンピュータによる再設計を、適切なコンピュータプログラムを用いて行い得る(Olszewski, Proteins 25(1996), 286-299; Hoffman, Comput. Appl. Biosci. 11(1995), 675-679)。さらにまた、詳細なタンパク質モデルのコンフォメーション解析およびエネルギー解析のために、コンピュータを用いることができる(Monge, J. Mol. Biol. 247(1995), 995-1012; Renouf, Adv. Exp. Med. Biol. 376(1995), 37-45)。

20

【0051】

この抗原の知見により、同じ抗原に対するさらなる抗体を作製するために、簡便に常套的に、例えばゲル電気泳動により抗原を精製し、次にこの抗原により動物生体を免疫することが可能となった。もちろん、このようにして産生された抗体は、形質細胞が94kD抗原または55kD抗原をその表面上に提示するため、引き続いて形質細胞のみを特異的に再度標識し、上述のようにして使用することができる。

30

【0052】

したがって、形質細胞に対する特異的な任意のさらなる抗体を作製するための明確な(defined)方法が利用可能であり、これは、多くのテキストブック(例えば、Janewayら、Immunologie, 1995, Spektrum-Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford)に記載のような標準免疫学的技術により実施することができる。もちろん、動物を免疫した後、当該技術水準で知られているような常套手法により対応する抗体を再度モノクローナル抗体として作製することができる。

40

【0053】

本発明はまた、ポリペプチドの少なくとも一部が、本発明の抗体の免疫グロブリン鎖の結合部位を含有する多機能ポリペプチドを提供する。

好ましくは、該多機能ポリペプチドは、

(a) 本明細書において規定した免疫グロブリンまたは抗体の結合部位を含む第1ドメイン、および

(b) CD3抗原を特異的に認識する免疫グロブリン鎖または抗体の結合部位を含む第2ドメイン

を含有する単鎖多機能ポリペプチドである。

【0054】

50

本発明による「第1ドメイン」および「第2ドメイン」という用語は、一方の結合部位が、本発明の抗原のエピトープ、例えば形質細胞、好ましくはヒト形質細胞上の抗原の特異的エピトープに対するものであり、他方の結合部位が、T細胞、好ましくはヒトT細胞のCD3抗原に対するものであることを意味する。

本発明において用いられる「結合部位」という用語は、天然の抗体、遊離のscFvフラグメントまたはその対応する免疫グロブリン鎖、好ましくはV_H鎖のようなエピトープに特異的に結合しうる三次元構造を有するドメインを示す。したがって、該ドメインは、抗体または免疫グロブリン鎖のV_Hドメインおよび/またはV_Lドメイン、好ましくは少なくともV_Hドメインを含有しうる。他方において、本発明のポリペプチドに含有される該結合部位は、本発明の抗原およびCD3抗原のそれぞれを認識する抗体または免疫グロブリン鎖の少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含有し得る。この点において、本発明のポリペプチドに存在する結合部位のドメインが抗体に由来しうるだけでなく、CD3または本発明の抗原を認識する、天然の表面受容体またはリガンドなどの他の結合タンパク質に由来しうることは注目すべきことである。本発明によれば、該結合部位はドメインに含有される。

本明細書で用いる「多機能ポリペプチド」という用語は、任意に異なる種(該少なくとも2つの供給源は該結合部位を特定する)に由来する異なる供給源、すなわち2種類の異なる分子由来の少なくとも2種類のアミノ酸配列を含有してなるポリペプチドを示す。したがって、該結合部位は、該多機能ペプチドの機能または機能の少なくともいくつかを特定する。かかるポリペプチドには、例えば、二重特性単鎖(bisc)抗体が含まれる。

本発明において使用される「単鎖」という用語は、ポリペプチドの前記第1および第2ドメインが共有結合により、好ましくは核酸分子によりコードされうるコリニアなアミノ酸配列形態で連結していることを意味する。

CD3は、T細胞上に多分子T細胞受容体複合体の一部として発現され、かつCD3、CD3およびCD3の3種の異なる鎖からなる抗原を示す。例えば、固定化した抗CD3抗体によるT細胞上のCD3のクラスタリングにより、T細胞受容体の結合に類似するが、そのクローンに典型的な特性とは独立したT細胞活性化を導く。実際、ほとんどの抗CD3抗体がCD3鎖を認識する。

CD3抗原を特異的に認識する抗体は、先行技術に記載されており、当該技術分野で公知の常套法により作製することができる。とりわけWO 99/54440参照のこと。

【0055】

単鎖多機能ポリペプチドは、医学目的、例えば腫瘍、特にリンパ腫および/または形質細胞腫、多発性骨髄腫の治療、または自己免疫疾患などの免疫学的障害の治療に特に有用でありうる。

【0056】

本発明のポリペプチドの好ましい態様では、多機能ポリペプチドの該ドメインは、ポリペプチドリンカーにより連結されている。該リンカーは、前記第1および前記第2ドメインとの間に配置され、該ポリペプチドリンカーは、好ましくは、複数の親水性のペプチド結合したアミノ酸を含有し、前記第1ドメインのN末端と前記第2ドメインのC末端とを連結する。

【0057】

本発明のさらに好ましい態様では、上述のポリペプチドの前記第1および/または第2ドメインが、天然抗体由来のV_H領域およびV_L領域を擬態するか、またはこれらに相当する。本発明のポリペプチドに対する結合部位を提供する抗体は、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、二重特異性抗体、合成抗体、Fabフラグメント、FvフラグメントもしくはscFvフラグメントなどの抗体フラグメントなど、または本明細書において先に記載したようなこれらの任意の化学修飾誘導体でありうる。

【0058】

本発明のさらに好ましい態様では、上述のポリペプチドの前記ドメインの少なくとも一方

10

20

30

40

50

が、該抗体の可変領域の単鎖フラグメントである。

【0059】

周知であるように、完全な抗原認識部位および抗体結合部位を含む最小の抗体フラグメントであるFvは、1つの重鎖の可変領域と1つの軽鎖の可変領域(V_H およびV_L)とが非共有結合により会合した二量体からなる。天然の抗体に見られるようなものに相当するこのコンフィギュレーションでは、各可変ドメインの3つの相補性決定領域(CDR)が相互作用してV_H - V_L 二量体の表面上の抗原結合部位を規定する。集合的に6個のCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。CDRに隣接するフレームワーク(FR)は、ヒトおよびマウスなどの異なる種間の天然の免疫グロブリンで本質的に保存されている三次構造を有する。これらのFRは、適切な向きにCDRを保持するために役立つ。定常ドメインは、結合機能には必要とされないが、V_H - V_L 相互作用の安定化を補助し得る。たった1つの可変ドメイン(または、抗原に特異的な3つのCDRだけを含むFvの半分)でも抗原を認識し、これと結合する能力を有するが、通常、完全な結合部位より低いアフィニティーで認識および結合する(Painter, Biochem. 11 (1972), 1327-1337)。したがって、本発明のポリペプチドの結合部位の該ドメインは、同じ免疫グロブリンが異なる免疫グロブリンのいずれかのV_H - V_L、V_H - V_H またはV_L - V_L のペアのドメインでありうる。ポリペプチド鎖内のV_H およびV_L ドメインの順番は、本発明にとって重要ではなく、前述のドメインの順番は、通常機能の損失を何ら伴うことなく逆順にしうる。しかしながら、V_H およびV_L ドメインは、抗原結合部位が適切にフォールディングしうるように配列していることが重要である。多機能ポリペプチドの調製は当該技術分野において周知であり、とりわけ、WO 99/54440またはWO 00/06605に開示されている。

10

20

【0060】

本発明のポリペプチドの好ましい態様では、該ドメインは、V_L WUE - 1 - V_H WUE - 1 - V_H CD3 - V_L CD3の順で配列されており、ここで、「V_L」および「V_H」は、特異的抗WUE - 1抗体および抗CD3抗体のドメインの可変ドメインの軽鎖および重鎖を意味する。

【0061】

先に記述したように、該結合部位は、好ましくは可動性リンカーにより、好ましくは前記ドメイン間に配置されたポリペプチドリンカーにより連結されている。ここで、前記ポリペプチドリンカーは、本発明のポリペプチドが水溶液中に配置されて結合に適したコンフォメーションをとったとき、前記結合部位を含有する前記ドメインの一方のC末端と、前記結合部位を含有する前記ドメインの他方のN末端との間の間隔を埋めるのに十分な長さの、複数の親水性のペプチド結合したアミノ酸を含有する。

30

【0062】

好ましくは、前記ポリペプチドリンカーは、複数のグリシン、アラニンおよび/またはセリン残基を含有する。前記ポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列の複数の連続したコピーを含有することがさらに好ましい。通常、該ポリペプチドリンカーは、1~15個のアミノ酸を含有するが、15個を超えるアミノ酸からなるポリペプチドリンカーも良好に機能しうる。本発明の好ましい態様では、前記ポリペプチドリンカーは1~5個のアミノ酸残基を含有する。

40

本発明の特に好ましい態様では、本発明のポリペプチドの前記ポリペプチドリンカーは、5個のアミノ酸を含有する。下記の実施例で示すように、前記ポリペプチドリンカーは、アミノ酸配列Gly Gly Gly Gly Serを含有することが有利である。

【0063】

本発明の最も好ましい態様では、本明細書で先に定義した多機能ポリペプチドは、単鎖抗体である。多機能ポリペプチドは、下記の実施例および配列番号: 21に示す核酸分子にコードされ、好ましくは配列番号: 22に示すアミノ酸配列を含有することが特に好ましい。

【0064】

50

本発明はさらに、共有結合または非共有結合により連結されている少なくとも1つのさらなるドメインを含有する(多機能)ポリペプチドに関する。したがって、前記多機能ポリペプチドは、WO 00/06605で考察されているような「ヘテロミニボディ」の形態でありうる。

該連結は、当該技術分野において公知の方法および上述の方法による遺伝子融合に基づくものであり得、あるいは、例えば、WO 94/04686に記載されているような化学的架橋により行われ得る。本発明のポリペプチドに存在するさらなるドメインは、好ましくは可動性リンカーにより、有利にはポリペプチドリinkerにより結合部位ドメインの一方に連結されている。ここで、前記ポリペプチドリinkerは、該ポリペプチドが水溶液中に配置されて結合に適したコンフォメーションをとったとき、前記ドメインの一方のC末端と前記ドメインの他方のN末端との間の間隔を埋めるのに十分な長さの、複数の親水性のペプチド結合したアミノ酸を含有する。好ましくは、前記ポリペプチドリinkerは、前述の態様において記載したようなポリペプチドリinkerである。本発明のポリペプチドは、エンテロキナーゼなどのプロテイナーゼが切断可能なリンカーまたは切断部位をさらに含有しうる。下記の実施例もまた参照のこと。

10

【0065】

さらにまた、前記さらなるドメインは、あらかじめ規定した特異性または機能のものでありうる。例えば、文献には、悪性細胞の破壊もしくは位置決定のため、または局在化した薬物または酵素効果の誘導のために、薬物、毒素および酵素などの生体活性物質を身体の特定の位置にターゲティングする概念に対する多数の記載が含まれている。生体活性物質をモノクローナル抗体にコンジュゲートさせることによりこの効果を達成することが提案されている(例えば、N. Y. Oxford University Press; および Ghose, J. Natl. Cancer Inst. 61 (1978), 657-676 参照のこと)。

20

また、本文脈において、本発明のポリペプチドは、当該技術分野で公知の常套法によりさらに修飾しうることも理解される。これにより、本発明のポリペプチド、および異種タンパク質由来であり得る他の機能性アミノ酸配列、例えば、核局在化シグナル、トランス活性化ドメイン、DNA結合ドメイン、ホルモン結合ドメイン、タンパク質タグ(GST、GFP、h-mycペプチド、FLAG、HAペプチド)を含有するキメラタンパク質の構築が可能となりうる。

30

【0066】

本発明の文脈において、本発明はまた、本明細書において先に記載したように、ベクター内に含有される、および/または宿主細胞内にトランスフェクされる、本発明の多機能ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド/核酸分子に関する。一般に、「ポリヌクレオチド」「核酸分子」および「ヌクレオチド配列」という用語は、DNA、RNA、PNAならびに任意のこれらのポリヌクレオチドを単独または組合せで含有する、組換えにより作製したキメラ核酸分子に関する。

【0067】

さらなる態様では、本発明は、本発明の抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導体、多機能ポリペプチド、ヌクレオチド配列/ポリヌクレオチド、ベクターおよび/または細胞を含有してなる組成物に関する。好ましくは前記組成物は、医薬用または診断用組成物である。

40

【0068】

本発明の医薬用組成物は、薬学的に許容され得る担体をさらに含有しうる。適切な医薬用担体の例は、当該技術分野で周知であり、リン酸緩衝生理食塩水、水、油/水エマルジョンなどのエマルジョン、種々の種類の湿潤剤、滅菌溶液などが含まれる。かかる担体を含有する組成物は、周知の常套法により配合しうる。これらの医薬用組成物は、適切な投薬量で被験体に投与しうる。適切な組成物の投与は、様々な様式、例えば、静脈内、腹腔内、皮下、筋肉内、局所または皮内投与により行い得る。投薬治療計画は、担当医師および臨床的因子により決定される。医学分野で周知のように、任意の一患者に対する用量は、

50

患者の体格、体表面積、年齢、投与する具体的な化合物、性別、投与の期間および経路、一般健康状態ならびに同時に投与する他の薬物を含む多くの要因に依存する。通常、該医薬用組成物の標準投薬としての治療計画は、1日あたり1 μ g~10mg単位の範囲内であるべきである。治療計画が連続注入である場合も、それぞれ、1分あたり体重1kgあたり1 μ g~10mg単位の範囲内であるべきである。しかしながら、連続注入のためのより好ましい用量は、1時間あたり体重1kgあたり0.01 μ g~10mg単位の範囲内であろう。特に好ましい用量を本明細書において以下に記載する。進行は定期的な評価により監視しうる。用量は異なりうるが、DNAの静脈投与のための好ましい用量は、DNA分子約10⁶~10¹²コピーである。本発明の組成物は、局所または全身に投与しうる。投与は通常、非経口的、例えば静脈内であり、DNAはまた、例えば、標的部位の内部または外部への微粒子銃送達により、または動脈内の部位へのカテーテルにより標的部位に直接投与しうる。非経口投与のための調製物には、滅菌した水溶液または非水溶液、懸濁液およびエマルジョンが含まれる。非水溶性溶媒の例は、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、オリーブ油などの植物油、およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルである。水溶性担体には、水、アルコール/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液が含まれ、生理食塩水および緩衝媒体が挙げられる。非経口用ビヒクルには、塩化ナトリウム溶液、リンゲルのデキストロース、デキストロースおよび塩化ナトリウム、乳酸加リンゲル液または固定油が含まれる。静脈用ビヒクルには、液体および栄養分補給物、電解質補給物（リンゲルのデキストロースに基づくものなど）などが含まれる。保存料および、例えば抗菌剤、抗酸化剤、キレート化剤および不活性ガスなどの他の添加剤もまた存在してもよい。また、本発明の医薬用組成物は、例えば、血清アルブミンまたは免疫グロブリン（好ましくはヒト由来）のようなタンパク質様担体を含有しうる。さらにまた、本発明の医薬用組成物は、該医薬用組成物の目的用途に応じて生物学的活性剤をさらに含有しうる。かかる活性剤は、胃腸系に作用する薬物、細胞増殖抑制剤、または自己免疫疾患、（多発性）リンパ腫、多発性骨髄腫または形質細胞腫の治療に用いられる薬剤でありうる。

【0069】

本発明により、本発明の種々のポリヌクレオチドおよびベクターが、単独、または標準的なベクターおよび/または遺伝子送達システムの使用との任意の組合せのいずれかで、任意に薬学的に許容されうる担体または賦形剤とともに投与されることが想定される。投与後、該ポリヌクレオチドまたはベクターは被験体のゲノム内に安定的に組み込まれうる。

【0070】

一方で、ある種の細胞または組織に特異的で、かつ該細胞内に存在し続けるウイルスベクターを使用しうる。好適な医薬用担体および賦形剤は当該技術分野において周知である。本発明により調製される医薬用組成物は、悪性腫瘍に関連する種々の疾患、特にリンパ腫、多発性骨髄腫、形質細胞腫および自己免疫疾患の予防または治療または遅滞のために使用することができる。

【0071】

さらにまた、本発明のポリヌクレオチドまたはベクターを含有する本発明の医薬用組成物を遺伝子治療に使用することが可能である。好適な遺伝子送達システムは、リボソーム、受容体媒介送達システム、裸のDNAおよびウイルスベクター、中でもヘルペスウイルス、レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルスなどを含みうる。遺伝子治療のための身体の特定期位への核酸の送達は、Williamsにより記載されたもの（Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726-2729）などのバイオリスティック送達システムを用いても達成しうる。核酸の送達のためのさらなる方法には、例えば、Verma, Gene Ther. 15 (1998), 692-699に記載のような粒子媒介性遺伝子導入が含まれる。

導入されたポリヌクレオチドおよびベクターは、細胞内に導入された後、遺伝子産物を発現し、好ましくは細胞の一生の間、この状態で維持されることを理解されたい。例えば、適切な調節配列の制御下でポリヌクレオチドを安定的に発現する細胞株は、当業者に周知

の方法に従って遺伝子操作しうる。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを用いるよりもむしろ、宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチド、および同じプラスミドまたは別のプラスミドのいずれかにある選択マーカーで形質転換されうる。外来DNAの導入後、遺伝子操作した細胞を富化培地内で1~2日間成長させ得、次いで選択培地に交換する。組換えプラスミド内の選択マーカーは、選択に対する耐性を付与し、染色体内にプラスミドを安定的に組み込み、かつフォーカス形成するまで成長する細胞の選択を可能にし、次にこれをクローニングして細胞株に拡張しうる。かかる遺伝子操作した細胞株はまた、例えばB細胞/T細胞相互作用に關与する化合物の検出のためのスクリーニング方法に特に有用である。

それぞれ、*tk⁻*細胞、*hgprt⁻*細胞または*aprt⁻*細胞における単純ヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(Wigler, Cell 11 (1977), 223)、ヒポキサンチン-グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1962), 2026)およびアデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(Lowy, Cell 22 (1980), 817)を含むいくつかの選択系を使用しうるが、これらに限定されない。また、メトトレキサートに対して耐性を付与する*dhfr*(Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 3567; O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527)、ミコフェノール酸に対する耐性を付与する*gpt*(Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); アミノグリコシドG-418に対する耐性を付与する*neo*(Colberre-Garapin, J. Mol. Biol. 150 (1981), 1); ハイグロマイシンに対する耐性を付与する*hygro*(Santerre, Gene 30 (1984), 147); またはプロマイシン(*pat*、プロマイシンN-アセチルトランスフェラーゼ)の選択の根拠として代謝拮抗物質耐性を用いうる。さらなる選択可能な遺伝子が記載されている。例えば、トリプトファンの代わりにインドールを細胞に利用させる*trpB*、ヒスチジンの代わりにヒスチノールを細胞に利用させる*hisD*(Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 (1988), 8047); およびオルニチンデカルボキシラーゼインヒビターである2-(ジフルオロメチル)-D,L-オルニチン、DFMOに対する耐性を付与するODC(オルニチンデカルボキシラーゼ)(McCologue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed)。

【0072】

本発明の化合物、特に抗体は、フィルタリングシステムに特に有用でありうる。例えば、治療上望ましい場合、本発明の抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導体を、骨髓移植中に患者、例えば形質細胞腫患者の血液または骨髓から悪性形質細胞、例えば腫瘍細胞を除去する、いわゆる「パーキング」ストラテジーに用いうる。

【0073】

上述の本発明の抗体、(多機能)ポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクターまたは(宿主)細胞の任意の1種を含有してなる本発明の診断用組成物は、検出のための適切な手段を任意に含みうる。

【0074】

本発明の抗体および(多機能)ポリペプチドはまた、これらを液相において、または固相担体に結合して使用しうるイムノアッセイにおける使用にも適する。本発明のポリペプチドを利用し得るイムノアッセイの例は、直接または間接のいずれかの形態の競合イムノアッセイおよび非競合イムノアッセイである。かかるイムノアッセイの例は、ラジオイムノアッセイ(RIA)、サンドイッチ(免疫定量アッセイ)およびウエスタンブロットアッセイである。該抗体およびポリペプチドはまた、免疫学的単離アプローチおよび免疫沈降においても有用である。本発明の抗体およびポリペプチドは、多くの異なる担体に結合

10

20

30

40

50

させることができ、該抗体およびポリペプチドに特異的に結合する細胞を単離するのに使用しうる。周知の担体の例には、ガラス、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリカーボネート、デキストラン、ナイロン、アミロース、天然および修飾セルロース、コロイド状金属、ポリアクリルアミド、アガロースおよび磁鉄鉱が含まれる。担体の性状は、本発明の目的のために可溶性または不溶性であり得る。

【0075】

当業者に公知の多くの異なる標識および標識方法がある。本発明において使用しうる標識の種類例は、酵素、放射性同位体、コロイド状金属、蛍光化合物、化学発光化合物および生物発光化合物であり得る（本明細書の上記態様も参照のこと）。本発明の診断用組成物は、形質細胞、好ましくはヒト形質細胞の検出、標識および単離に特に有用である。該診断用組成物はまた、B細胞リンパ腫、B細胞分化のメカニズムまたは形質細胞の生物学のインビボおよびインビトロ研究にも有用である。

10

【0076】

本発明はまた、形質細胞悪性腫瘍、特に多発性骨髄腫、リンパ腫、形質細胞腫（腫瘍）および自己免疫疾患の治療のための医薬組成物の調製のための本明細書において上述した本発明の化合物の使用に関する。

【0077】

本発明はまた、本発明の抗体またはその機能性フラグメントもしくは誘導体、本発明の抗原、本発明のエピトープ、本発明の（多機能）ポリペプチド、本発明のヌクレオチド配列および/または本発明のベクターおよび/または本発明の宿主を含んでなるキットを提供する。

20

【0078】

かかるキットは、バイアル、チューブなどの1つ以上の容器手段を密閉して受容するために区画化された担持手段を含みうる。各容器手段は、該方法で使用する別々の要素の1つを含有する。例えば、1つの容器手段は担体に結合した本発明の抗原またはエピトープを含有し得、第2の容器は可溶性の検出可能に標識された第2抗体を凍結乾燥形態または溶液状で含有しうる。さらに、該担持手段はまた、各々が異なる所定量の本発明の抗原またはエピトープを含有する複数の容器を含みうる。

【0079】

まとめると、形質細胞に関して、細胞質成分に対して特異的な抗体しか当該技術水準ではこれまで得られていなかったため、形質細胞表面を認識することができなかった。本発明の抗体は、形質細胞の細胞表面上に発現される抗原の初めての抗体であり、形質細胞に特異的である。したがって、例えば自己免疫疾患、リンパ腫または形質細胞腫の診断および治療に使用しうる抗体を初めて得ることができ、これまでに当該技術分野で知られた唯一の治療法であった、あらゆる副作用を伴う化学療法に代用法を提供する。

30

【0080】

以下に、本発明による抗体の調製方法の一例、および本発明の抗体の一例を示す。さらに本発明の単鎖多機能化合物の調製および対応するその使用を示す。

【0081】

実施例1：抗体（「Wue-1」）の調製方法

40

a) マウスの免疫

MALT型（細胞株番号H3302/88、A. Greiner博士、Institut fuer Pathologie, Universitaet Wuerzburg）のリンパ腫から得た細胞株の細胞でBALB/cマウスを免疫した。これらの細胞はインビトロで形質細胞に分化しうる。

【0082】

b) 免疫したマウスの脾臓細胞の単離

5mlの無血清RPMIを含むペトリ皿に、滅菌的に取り出した脾臓を入れ、ナイロンゲージネット（孔径100μm）に通した。続いて、細胞懸濁物を5mlピペットで数回再懸濁し、50mlバイアルに移した。このようにして得た脾臓細胞を20mlのHBSS

50

で2回洗浄した。すなわち、各場合において該細胞を1500rpmで5分間遠心分離し、上清みを除去し、ペレットを各場合において20mlのHBSS中に再懸濁した。

【0083】

c) 融合パートナー(骨髄腫細胞)の調製

融合前に、骨髄腫細胞(P3x63Ag8.653、Kearney J. F. ら(1979) Journal of Immunology, 第123巻, 1548-1550頁を参照のこと)をアザグアニン培地(1mg/mlのRPMI+10%FCS)内に数日間維持した。マウスの脾臓の融合には、約 4×10^7 骨髄腫細胞は必要であった(これは、 175 cm^2 のコンフルエントに増殖した細胞培養物のバイアル約1つ分の量である)。EDTAバッファーにより骨髄腫細胞をバイアルの底部から取り出し、続いて、脾臓細胞と同様にHBSSで洗浄し、再度遠心分離してペレット上部の上清みを吸引除去した。

10

【0084】

d) 細胞融合

ステップ2の脾臓細胞を含む懸濁物をステップ3の骨髄腫細胞のペレット上に置き、混合した。

【0085】

標準的手順(例えば、Greiner ら(1994) "Monoclonal gammopathies III. Clinical significance and basic mechanism" (Radlら編), 187-190頁, EURAGE, Leiden, the Netherlands を参照のこと)に従って+37で融合を行った。この目的のために、必要とされる培地はすべて水浴中で+37に予備加熱した。

20

【0086】

脾臓細胞を骨髄腫細胞と混合した後1分以内に、凝集塊の形成を防ぐために、細胞混合物を攪拌しながら、1mlの50%PEGを細胞混合物にゆっくりと滴下した。1.5分間待った後、該混合物を攪拌しながら、最初に15mlの無血清RPMI、次いで20mlのRPMI+10%FCSをゆっくりと該混合物に滴下した。骨髄腫融合パートナー細胞とマウス脾臓細胞との細胞混合物を1500rpmで5分間遠心分離し、上清みを除去し、ペレットを125mlのRPMI+10%FCS+1mlあたり200単位のIL-6+100mlあたり0.5mlのゲンタマイシン中に再懸濁した。このようにして得た細胞懸濁物を5つの24ウェルプレートに数ミリリットルずつ分配した。約24時間培養した後、1mlのRPMI+10%FCS+1mlあたり200単位のIL-6+100mlあたり0.5mlのゲンタマイシン+2xHATを各ウェルに添加した。

30

【0087】

e) ハイブリドーマ細胞の培養

融合したハイブリドーマ細胞に新しい培地(RPMI+10%FCS+1mlあたり200単位のIL-6+100mlあたり0.5mlのゲンタマイシン+1xHAT)を4日ごとに提供した。この目的のために、ウェルの培養上清みは完全に吸引除去し(ハイブリドーマ細胞が接着するように増殖する)、2mlの新しい培地を各ウェルに添加した。14日後、「HAT培地」を「HT培地」(RPMI+10%FCS+1mlあたり200単位のIL-6+100mlあたり0.5mlのゲンタマイシン+1%HAT)と交換した。増殖クローンが顕微鏡の視野を覆っている場合、それらを免疫グロブリン産生について試験した。すべての陽性クローンを小さな培養バイアル(25 cm^2)に移した。

40

【0088】

f) 特異性試験

すべての陽性クローンを、凍結状態で切断し、免疫染色に供することにより特異性について免疫組織化学的に試験した(下記参照)。再クローニングを繰り返し、安定な細胞株を得た。

【0089】

50

g) 産生された抗体の単離

前述の細胞株の培養物の上清みを除去し、硫酸での沈降、続くプロテインAアフィニティークロマトグラフィーにより精製し、標準法 (Greinerら (1994) Lab. Invest., 第70巻, 572-578頁) に従ってN-ヒドロキシ-スクシンイミドエステル (シグマ社、ドイツ) を用いてFITCまたはビオチンで標識した。この細胞株により産生された抗体を以下「Wue-1」という。これは、イソタイプIgG2aにより同定された。

【0090】

h) 抗体Wue-1をアミノ酸配列について特性付けした。その軽鎖(L鎖)の可変領域Fw(L)は、以下の配列

その部分配列

可変領域FW-1に相当するDIVMTQTPLTLSVTIGQPASLSC

相補性決定領域CDR-1に相当するKSSQSLLDSDGKTYLN

可変領域FW-2に相当するWLLQRPQGSPKRLIS

相補性決定領域CDR-2に相当するLVSKLDS

可変領域FW-3に相当するGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC

相補性決定領域CDR-3に相当するWQGTHLPWT

および

可変領域FW-4に相当するFGGGTKLEIKR

を有する。

その重鎖(H鎖)の可変領域Fw(H)は、以下の配列:

QVQLQQSGPELVKLTGASVKISCKGSGYSFSGYYMHWVKQS

HGKRLIEWIGYISGYNGDTRYNQKFRGKATFIVDISSRTAY

MQFNSLTSEDSAVYYCARGGYYGYVDYWGQGTTTLTVSS

その部分配列

可変領域FW-1に相当するQVQLQQSGPELVKLTGASVKISCKGSGYSFS

相補性決定領域CDR-1に相当するGYMHW

可変領域FW-2に相当するWVKQSHGKRLIEWIG

相補性決定領域CDR-2に相当するYISGYNGDTRYNQKFRG

可変領域FW-3に相当するKATFIVDISSRTAYMQFNSLTSEDSAVYYCAR

相補性決定領域CDR-3に相当するGGYYGYVDY

および

可変領域FW-4に相当するWGQGTTTLTVSS

を示す。

【0091】

さらに、抗体Wue-1をコードする遺伝子配列のヌクレオチド配列を解析した。抗体Wue-1の軽L鎖をコードする遺伝子は、以下のヌクレオチド配列を含有する。

g a a g c a c g c g t a g a t a t c g t g a t g a c c c a a a c t c c a c t
c a c t t t g t c g g t t a c c a t t g g a c a a c c a g c c t c c c t c t
c t t g c a a g t c a a g t c a g a g c c t c t t a g a t a h t g a t g g a
a a g a c a t a t t t g a a t t g g t t g t t a c a g a g g c c a g g c c a
g t c t c c a a a g c g c c t a a t c t c t c t g g t g t c t a a a t t g g
a c t c t g g a g t c c c t g a c a g a t t c a c t g g c a g t g g a t c a
g g g a c a g a t t t c a c a c t g a a a a t c a g c a g a g t g g a g g c
t g a g g a t t t g g g a g t c t a t t a t t g c t g g c a a g g t a c a c
a t c t t c c g t g g a c a t t c g g t g g a g g c a c c a a g c t g g a a
a t c a a a c g g g c t g a t g c t g c g g c c g c t g g a t c c a t c t t

10

20

30

40

50

c

(配列番号：15)

【0092】

抗体Wue-1の重H鎖をコードする遺伝子は、以下のヌクレオチド配列を含有する。

c g c c a t g g c c g c g g g a t t c c g g c c a t g g c g c a g g t g c a
 g c t g c a g c a g t c t g g a c c t g a g c t a g t g a a g a c t g g g g
 c t t c a g t g a a g a t a t c t t g t a a g g g t t c t g g t t a c t c a
 t t c a g t g g t t a c t a c a t g c a c t g g g t c a a g c a g a g c c a
 t g g a a a g a g g c t t g a g t g g a t t g g a t a t a t t a g t g g t t
 a t a a t g g t g a t a c t a g g t a t a a t c a g a a g t t c a g g g g c
 a a g g c c a c a t t t a t t g t a g a c a t a t c c t c c a g g a c a g c
 c t a c a t g c a g t t c a a c a g c c t g a c a t c t g a a g a c t c t g
 c g g t c t a t t a c t g t g c a a g a g g g g g t t a c t a c g g c t a c
 g t g g a c t a c t g g g g c c a a g g c a c c a c c c t c a c a g t c t c
 c t c a g c c a a a a c g a c a c c c a a g c t t g t c t a t c c a c t g g
 c c c c t g g t a a t c a c t g t g c g g c c g c c g (配列番号：16)

10

【0093】

i) 上記で使用した物質を以下に明確に示す。

NORAS社製ナイロンゲージ

シグマ社製No. A1007の8-アザグアニン

20

リナリス(Linaris)社製No. F1431KGのHBS5(ハンクス塩)

リナリス社製No. L1253GGのEDTAバッファー

ベーリンガー(Boehringer)社製のPEG(ポリエチレングリコール1500)

リナリス社製No. S3181KGのFKS(ウシ胎児血清)

リナリス社製No. F2613KGのRPMI

リナリス社製No. K1931GGのHAT補給物50x

リナリス社製No. K1932GGのHT補給物50x

リナリス社製No. F1141FGのゲンタマイシン

ファーマノーゲン(Pharmingen)社(ハンブルグ)製のIL-6(インターロイキン-6)

30

【0094】

特異性試験のために、硫酸沈降および続くアフィニティークロマトグラフィーにより抗体を細胞培養物の上清みから精製した。特異性試験は、新しい組織切片、細胞の遠心分離産物および細胞懸濁溶液を用い、免疫組織化学により行った。

【0095】

j) 結果

Wue-1陽性細胞は、二次胚中心内、および辺縁ゾーン内、および扁桃陰窩の下方に免疫組織化学により明白にかつ再現可能に同定された(図1Aおよび図1B)。形態学および免疫組織化学は、Marschalko型またはリンパ球形質細胞系型のいずれかの成熟形質細胞に相当する(挿入図を伴う図1C)。

40

【0096】

図1Aの部分図aに、中央(星型)に胚中心を有する二次リンパ組織およびこの胚中心の上側3分の1における個々の褐色に染色された形質細胞を示す。これはリンパ球から形質細胞になる典型的な成熟ゾーンである。さらに、小節の外側でも、いくつかの陽性に標識された細胞(矢印)が図の上縁部の表面上皮付近に見られる。図1Aの部分図bは、形質細胞株NCI-923の免疫染色を示し、ここで、すべての細胞は、Wue-1で免疫組織化学的に強く陽性に標識されている。標識パターンは各場合において細胞質性であり、膜に現れており、これは、図1Cに示す非透過性FACS染色により示された。

【0097】

50

W u e - 1 はマクロファージまたはTリンパ球などの他のリンパ細胞またはマクロファージと反応せず、末梢血、肝臓組織、腎臓、筋肉、皮膚、膀胱、精巣および卵巣における結合は示さず、胃腸管（胃、腸）の分泌性上皮とは弱く、不定的に反応した。

【0098】

しかしながら、W u e - 1 は、形質細胞由来のすべての悪性腫瘍と反応した。対照的に、正常Tリンパ球およびBリンパ球ならびに初期B細胞分化期由来の腫瘍との反応は陰性であった（図1B）。図1Bの部分図aでは、W u e - 1 陰性反応を生じるリンパ腫の未分化腫瘍部分を除いて、陽性に標識された形質細胞のびまん性宿主で、形質細胞に分化しているB細胞腫瘍（いわゆる小悪性M A L Tリンパ腫）が見られる。図1Bの部分図bでは、悪性形質細胞（いわゆる形成不全形質細胞腫）に相当し、細胞質の染色および膜の染色を有する高度に悪性のリンパ腫がW u e - 1 で標識されている。

10

【0099】

図1Cの左側半分は、正常扁桃リンパ球細胞懸濁物のF A C Sグラフを示す。各場合における細胞の大きさをx軸にプロットし、細胞の顆粒度をy軸にプロットしている。R1およびR2は、2種類の細胞集団を示し、通常の実験に従って、休止期のリンパ球をR1とし、活性化されたリンパ球をR2とする。この概念は、W u e - 1 で染色された、遠心分離された細胞懸濁調製物の挿入した内部図からわかる。この図において、リンパ球形質細胞系形質細胞（矢印）に相当し、R1の小陽性細胞、ならびにR2由来のM a r s c h a l k o型の大形質細胞が見られる。

【0100】

図1Cの右側半分は、4つのヒストグラムを示し、ここで、染色強度をx軸にプロットし、細胞数をy軸にプロットしている。上側の2つのヒストグラムはR1由来のW u e - 1 陽性細胞を示す。左側の上下では、細胞を軽鎖 および 抗原についてさらに染色し、右側の上下では、表面抗原C D 5 4について染色した。非特異的バックグランド染色の程度を示すために、無関連抗原に対する染色を、いわゆるイソタイプ対照として図に示す。成熟形質細胞は、イソタイプ対照と比べて軽鎖およびC D 5 4のいずれも発現しないので、リンパ球形質細胞系細胞（上列）は、軽鎖およびC D 5 4の発現に関して成熟形質細胞（下列）と異なることは顕著である。

20

【0101】

図1Dは、形質細胞株（N C I - H 9 2 9）を抗原供給源としたウエスタンブロットを示す。陽性バンドが約94kDに生じ（図1D）、すなわちW u e - 1 により標識された抗原は、94kDの見かけ分子量を有する。

30

【0102】

図2（ビデオプリント）の説明

図2のすべての部分図a～hは、形質細胞に対して選択的な特異的結合パターンをヒト扁桃に基づいて記載したものである。C y 3 - 蛍光色素とコンジュゲートしたW u e - 1 m A B（赤色染色）を、任意に他の規定された抗原（緑色染色）とともに、二重免疫蛍光を用いるアッセイ技術として使用し、ここでは重複染色シグナルが次いで黄色（緑色と赤色の和）になる。現在一般的に使用されている方法（詳細は、J a n e w a y , I m m u n o l o g i e , S p e k t r u m - V e r l a g , 1 9 9 5 などの関連文献を参照のこと）に従って免疫染色を行った。要約すると、染色は、まず非コンジュゲート抗体（ここでは抗原を緑色で示す）で間接的に行い、次いで、この抗体が緑色蛍光で標識された第2の二次抗体により提示される。次の工程では、W u e - 1 が非特異的に結合できないようにするために、すべての遊離結合価の二次抗体をマウス血清でブロックする。最後に、染色を二次特異性（ここでは赤色標識されたW u e - 1）により行う。数種類の特異性および感受性対照を各実験と平行して行うと組織の染色挙動が示されるが、対応する個々のステップは省略する。

40

【0103】

図2aは、W u e - 1（赤）のC D 4 4（緑）での二重染色を示す。リンパ小節の胚中心が図においてあいまいにしか見えないため、星印で示す。C D 4 4 は成熟B細胞（胚中心

50

付近)および形質細胞(胚中心から離れた部分)を標識し、二重染色が顕著な胚中心から離れた集団でのみスペクトルが重複した。胚中心に位置するが典型的にはCD44陰性である個々の形質細胞に矢印を付している。

【0104】

図2bでは、この所見を再度特に強調する。ここで、胚中心を選択的に示した。G0期を過ぎ(Ki-67-陽性で示される)ており、したがって増殖し、リンパ組織の胚中心に特徴的である細胞は緑色で標識されている。Wue-1陽性細胞は分化し、もはや増殖しない。その結果、二重染色はみられない。

【0105】

図2cでは、リンパ組織内の別の重要な細胞集団からの限界決定を、CD3染色により行った。その結果、扁桃では、Wue-1細胞はT細胞の外側ゾーン(形質細胞に典型的な局在化)を縁取るが、Pan-T細胞マーカーについて陰性である。

【0106】

図2dでは、公知の形質細胞抗体であるが細胞質抗原しか認識しないVS-38を用いて二重染色を行った。したがって、高度に重複が存在し、ほぼ完全に黄色の染色である。さらに、個々の細胞は、VS-38により認識され、T細胞であり得、これはVS-38がWue-1に対して低特異性を有するという事実を示す。

【0107】

図2eは、扁桃表面を緑でマーキングする(上皮マーカーサイトケラチン8)染色を示す。これはまた、上皮内に特徴的に遊走する細胞の場合でさえWue-1が交差反応性を持たないことを示す。

【0108】

図2fでは、機能的に重要な抗原CD95(FAS)との共発現を調べた。形質細胞発現に関するデータはこれまでに公表されていない。

【0109】

図2gでは、Wue-1および、辺縁ゾーンのB細胞(すなわち、形質細胞の直接的な前駆体である細胞)を認識する抗体4D12との組合せを選択した。その結果、移行を特徴づける二重標識細胞も、対応する個々の染色とは別に見られる。

【0110】

図2hでは、対照的に、CD23での二重染色を行ない、二重染色は、胚中心細胞および未成熟B細胞(いわゆる末梢ゾーン細胞)においてみられる。リンパ小節の胚中心の構造および末梢ゾーンの構造は、緑色でマーキングされ、非標識細胞のストリップ(T細胞ゾーンは図2cを、辺縁ゾーンは図2gを参照のこと)およびWue-1陽性外側ゾーンが認められる。

【0111】

Wue-1が形質細胞を特異的に認識するという事実は、多重染色(図1Aおよび2(ピデオプリント))により多数の形態学的試験および免疫組織化学的試験の両方において示されている。特に、Wue-1はまた、逆に担体またはメッセンジャー物質に結合することができ、次いで、インビトロおよびインビボの両方において診断用物質または治療用物質を形質細胞に導くことができる(これは、形質細胞の細胞膜に結合する自身の能力により確実にされる)ため、正常形質細胞および悪性形質細胞の膜表面への結合に対するWue-1の特異性および性質により、Wue-1が価値のある免疫学的ツールとなる。さらに、Wue-1を体外でのフィルターとして治療に使用することができ(いわゆるパーキング)、ここでは、骨髄移植の間に形質細胞腫患者の血液または骨髄から腫瘍細胞が除去される。

【0112】

実施例2: Wue-1は健常形質細胞および悪性形質細胞に高度に特異的である 形質細胞悪性腫瘍(形質細胞腫/多発性骨髄腫)の抗体に基づく治療に対する第1ステップは、形質細胞に特異的なモノクローナル抗体を確立することであった。かかる抗体は、上述したWue-1であった。リンパ組織に対するWue-1の結合特性を調べるため、Wue

- 1のさらなる特性付けを行った。Wue - 1での二重染色のためにヒト扁桃組織および一組の組織マーカーを選択した。Wue - 1 (DSM ACC 2441)を上記実施例に記載のようにして使用した。

簡単には、新鮮な凍結外科的試料の4マイクロメータークリオスタット切片で免疫組織化学的染色を行った。形質細胞が集まっていることが知られている器官、すなわち、骨髄、リンパ節、胸腺および扁桃に特に注目した。さらに、正常末梢血リンパ球のサイトスピン調製物、二次リンパ組織およびリンパ腫細胞懸濁物、ならびに骨髄腫/形質細胞腫細胞株を免疫組織化学的試験に供した。クリオスタットでの二重染色のために、ビオチン標識抗体が結合した切片を、Cy3 - ストレプトアビジン (ダイアノバ (Dianova) 社、ドイツ) を用い、記載 (Greiner (1994) Lab Invest 70: 572 - 578) によりして検出した。3工程インキュベーション手順を用い、希釈した精製モノクローナル抗体Wue - 1およびイソタイプ対照を別文献 (Marx (1992) Lancet 339: 707 - 708) に詳細に記載のように用いてイムノペルオキシダーゼ法を適用した。実験時に新たに切片を調製するまで生検組織をスナップ凍結塊として - 70 で維持した。間接染色に使用したモノクローナル抗体は、CD22、CD23、Ki67、CD10、bcl - 2 (すべてダコ (DAKO) 社製)、4D12 (Smith (1990) Clin Exp Immunol 82: 181 - 187)、VS38 (1994) J Clin Pathol 47: 418 - 422) であった。フローサイトメトリー解析を、FACScan (登録商標) (ベクトン・ディッキンソン (Becton Dickinson) 社) でアルゴンイオンレーザーを488nmで用いて行ない、データの取得および解析にはLYSIS IIを用い、直接コンジュゲートしたモノクローナル抗体 (CD19 HD 37、シグマ (Sigma) 社; CD3 UCHT - 1、シグマ社; CD14; Leu - M3、(ベクトン・ディッキンソン社); CD54、84M10、イムノテック (Immunotech) 社; APO - 1、Behrmann (1994) Eur J Immunol 24: 3057 - 3062); CD66L、DREG 56、ダイアノバ社; CD40、mAb89 Bancheureau (1991) Nature 353: 678 - 679; CD38、AT 13/5、セロテック (Serotec) 社) での三重免疫染色を用いた。Wue - 1を、直接FITCとコンジュゲートさせるか、またはストレプトアビジン - フィコエリトリン (PE、シグマ社) で検出されるビオチン化抗体としてのいずれかで使用した。設備装置設定試料は、未染色試料、およびCD19 - FITC、CD19 - PEおよびCD19 - QRで染色した試料を含んだ。参照物質として正常扁桃由来のCD19 + Bリンパ球を用い、CD19リンパ球の蛍光強度をゲートオン (gating on) した後、前方および側方光散乱の相関的表示における標準位置にB細胞が配置されるように光散乱検出器を調整することにより装置設定を標準化した。CD19 + リンパ球の光散乱から得られたタイト光散乱ゲートを用いて蛍光検出器を調整した後、未染色試料の3つの蛍光検出器の調整を行った。各測定では20000細胞を含んだ。死細胞識別を、7 - アミノ - アクチノマイシンD (7 - AAD、カルバイオケム (Calbiochem) 社、ドイツ) を別文献 (Schmid (1992) Cytometry 13: 204 - 208) に記載のようにして二色免疫蛍光と組み合わせて行った。

【0113】

胚中心の解析により、Wue - 1標識が細胞質Ig、表面Ig、IgイソタイプIgM > IgG > IgA、CD38、VS38、HLA - DRとの強い共同在化を示し、B細胞マーカーCD19、CD22、CD40; 4D12 (辺縁ゾーンのB細胞)、CD136、CD95について弱い染色を観察することができ、CD23、CD44、CD3 (T細胞)、CD14 (マクロファージ)、Ki67、CD66L、CD54、CD10、bcl - 2、bcl - 6、サイトケラチン8、CD68 (マクロファージ) では染色はなかった。副皮質の染色対胚中心の染色における違いは、表面Ig染色の非存在、CD19、CD22、CD40、CD95、HLA - DRなしであり; CD136、CD44、CD54で強い染色が観察され、bcl 2で弱い染色が観察され; 他のすべてのマーカーでは胚

10

20

30

40

50

中心と副皮質との間で変化はなかった。これらの所見は、他のリンパ組織および骨髄で確認した（データ示さず）。さらにまた、Wue - 1は末梢血、肝臓、心臓、筋肉、皮膚、膀胱、卵巣、精巣および中枢神経系と交差反応しなかったが、胃腸組織の分泌性上皮の弱い染色を示した。これらの結果はWue - 1の選択的標識特性を裏付けた。

【0114】

特異的リンパ腫サブタイプを分化させるWue - 1の能力を、上述のようにして解析した多数の患者試料により測定した。Wue - 1は、形質細胞悪性腫瘍（形質細胞腫/骨髄腫）に高度に特異的であり、かつ免疫細胞腫とのみ交差反応性であることが示された。リンパ腫サブタイプを改定欧米人（REAL）分類に従って分類した。陽性染色は、11例の形質細胞腫/骨髄腫試料のうち11例、形質細胞分化を伴う13例のMALT（粘膜関連リンパ組織）型リンパ腫のうち13例で観察されたが、形質細胞分化なしでは全くなかった（19例中0）。6例の免疫細胞腫のうち5例および、13例のびまん性大細胞リンパ腫のうち1例でWue - 1陽性であったが、小節中心リンパ腫（23例中0）、およびマンツル細胞リンパ腫（10例中0）、パーキットリンパ腫（5例中0）、B細胞リンパ球白血病（5例中0）、末梢T細胞リンパ腫（7例中0）、血管性免疫芽球性リンパ腫（9例中0）およびホジキン病（13例中0）では染色は観察されなかった。この高度に選択的な形質細胞腫/骨髄腫の認識は、前述の抗体ではいずれも観察されなかった。

10

【0115】

実施例3：Wue - 1は、高度に選択的な抗体に基づく形質細胞の排除に適する。このWue - 1による形質細胞の選択的認識に基づき、かかる抗体が悪性形質細胞（形質細胞腫/骨髄腫）の標的化排除における使用に好適であろうことは当業者に明白である。標的細胞の抗体媒介性排除に使用される典型的なメカニズムは、放射能（放射性免疫コンジュゲート、DeNardo（1999）*Current Opinion in Immunology* 11, 563 - 569）の標的化送達、毒素（免疫毒素、Kreitman（1999）*Current Opinion in Immunology* 11, 570 - 578）の標的化送達または抗体依存性細胞障害（ADCC）である。ADCCは、Fc - 受容体を有する細胞（単球、マクロファージ、顆粒球）、ナチュラルキラー細胞またはT細胞により媒介されうる。抗体の可変ドメインに連結したエフェクタードメインは、正常なモノクローナル抗体におけるものなどのFcドメイン、またはエフェクター細胞上の他の表面抗原と相互作用するドメインでありうる。

20

30

【0116】

抗体に基づくストラテジーの有望な変形例の1つは、所定の腫瘍標的にエフェクター細胞を再指向させるために、1つの抗体分子において異なる特異性の2つの抗原結合部位を連結することによる二重特異性抗体アプローチである。二重特異性抗体は、インビトロおよびインビボで腫瘍細胞に対して細胞障害性エフェクター細胞を漸増させるのに極めて効率的であるが（StaerzおよびBevan（1986）*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1453 - 1457; LanzavecchiaおよびScheidegger（1987）*Eur. J. Immunol.* 17, 105 - 111.; Kroesen（1995）*Cancer Res.* 55, 4409 - 4415; Kroesen（1995）*J. Hematother.* 4, 409 - 414; Kroesen（1993）*Cancer Immunol. Immunother.* 37, 400 - 407）、臨床的有効性を証明する大規模無作為臨床試験はまだない。これらの有望な抗体構築物がなぜ、臨床試験において無傷の抗体に対して劇的な遅れをとっているのかという主な理由は、充分量の臨床グレード物質を製造することの困難性にある。最近まで、製造および精製プロセスは極めて非効率的であり、ハイブリッド-ハイブリドーマアプローチ、化学結合または組換えFabまたはFvフラグメントの細菌の封入体からの再生を繰り返すか否かに関わらず、収率が低かった。また、これらの産物のほとんどすべては不明確な副生成物による汚染を被る（StaerzおよびBevan, 1986; LanzavecchiaおよびScheidegger, 1987; Mallender（1994）*Biochemistry* 33

40

50

, 10100 - 10108 ; Gruber (1994) J . Immunol . 152 , 5368 - 5374) 。以前に2つの異なる (17 - 1 A x C D 3 および C D 19 x C D 3) 抗体で示されたように、これらの欠点は、Mack (1995) . Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A 92 , 7021 - 7025 and Loeffler (2000) Blood 15 , 2098 - 2103 に記載されているような4つの可変が連結された分子形態の開発により克服しうる。哺乳動物細胞により産生されて得られる組換え60kD分子は、さらなる再生を必要としない十分に活性化形態で高収率で分泌される。

【0117】

Wue - 1モノクローナル抗体の可変領域を、上述のような標準的PCRに基づく手順を用いてクローニングし、Mack (1995) に記載のようにして、Wue - 1可変軽鎖および重鎖を単鎖抗体にし、短鎖ペプチドリナーを介して17 - 1 A x C D 3の抗C D 3単鎖Fv部分を合わせて単鎖二重特異性抗体を合成した。該二重特異性分子をWue - 1 x C D 3と命名した。簡単には、Wue - 1可変領域のコード配列の5'および3'末端からプライマーを選択し、Wue - 1 - V Lの5'末端にBsrG1制限部位を導入し、Wue - 1 - V Hの3'末端にBspE1制限部位を導入し、合成 (Gly₄ Ser₁)₃ リンカーに内部BspE1に制限部位を導入するように設計した。プライマーは、Wue - LC - F : 5' - C T A C A G G T G T A C A C T C C G A T A T C G T G A T G A C C C A A A C T C C - 3' ; 配列番号 : 17、Wue - 1 - LC - R : 5' - T C C T C C T C C G G A G C C G C C G C C G C C A G A A C C A C C A C C A C C C C - C G T T T G A T T T C C A G C T T G G T G C C - 3' ; 配列番号 : 18、Wue - 1 - HC - F : 5' - G G C G G C T C C G G A G G A G G A G A T C T C - A G G T G C A G C T G C A G C A G T C T G G - 3' ; 配列番号 : 19、およびWue - 1 - HC - R : 5' - C C A C C A C C T C C G G A G G A G A C T G - T G A G G G T G G T G C C - 3' ; 配列番号 : 20であった。Wue - 1 x C D 3を、17 - 1 A x C D 3のFlagエピトープが除去されるように設計した。CHO - K1細胞内のWue - 1 x C D 3二重特異性単鎖構築物および安定クローンを、選択マーカージヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) を用いて選択した。DHFRを、内部リボソームエントリー配列を介してWue - 1 x C D 3転写物に連結し、両方の発現単位を同じEF - プロモーター (Mack (1995)) により駆動した。

【0118】

得られたWue - 1 x C D 3構築物は以下のヌクレオチド配列 (配列番号 : 21)

G A A T T C A C C A T G G G A T G G A G C T G T A T C A T C C T C T T C T T
 G G T A G C A A C A G C T A C A G G T G T A C A C T C C G A T A T C G T G A
 T G A C C C A A A C T C C A C T C A C T T T G T C G G T T A C C A T T G G A
 C A A C C A G C C T C C C T C T C T T G C A A G T C A A G T C A G A G C C T
 C T T A G A T A G T G A T G G A A A G A C A T A T T T G A A T T G G T T G T
 T A C A G A G G C C A G G C C A G T C T C C A A A G C G C C T A A T C T C T
 C T G G T G T C T A A A T T G G A C T C T G G A G T C C C T G A C A G A T T
 C A C T G G C A G T G G A T C A G G G A C A G A T T T C A C A C T G A A A A
 T C A G C A G A G T G G A G G C T G A G G A T T T G G G A G T C T A T T A T
 T G C T G G C A A G G T A C A C A T C T T C C G T G G A C A T T C G G T G G
 A G G C A C C A A G C T G G A A A T C A A A C G G G G T G G T G G T G G T T
 C T G G C G G C G G C G G C T C C G G A G G A G G A G G A T C T C A G G T G
 C A G C T G C A G C A G T C T G G A C C T G A G C T A G T G A A G A C T G G
 G G C T T C A G T G A A G A T A T C T T G T A A G G G T T C T G G T T A C T
 C A T T C A G T G G T T A C T A C A T G C A C T G G G T C A A G C A G A G C
 C A T G G A A A G A G G C T T G A G T G G A T T G G A T A T A T T A G T G G
 T T A T A A T G G T G A T A C T A G G T A T A A T C A G A A G T T C A G G G
 G C A A G G C C A C A T T T A T T G T A G A C A T A T C C T C C A G G A C A

GCCTAC ATGCAGTTCA ACAGCCTGAC ATCTGAAGAC TC
 TGCGGTCT ATTA CTGTGC AAGAGGGGGT TACTACGGCT
 ACGTGGACTA CTGGGGGCCAA GGCACCCACCC TCACAGTC
 TC CTCCGGAGGT GGTGGATCCG ATATCAA ACT GCAGCA
 GTCA GGGGCTGAAC TGGCAAGACC TGGGGCCTCA GTGA
 AGATGT CCTGCAAGAC TTCTGGCTAC ACCTTTACTA GG
 TACACGAT GCACTGGGTA AAACAGAGGC CTGGACAGGG
 TCTGGAATGG ATTGGATACA TTAATCCTAG CCGTGGTT
 AT ACTAATTACA ATCAGAAGTT CAAGGACAAG GCCACA
 TTGA CTACAGACAA ATCCTCCAGC ACAGCCTACA TGCA 10
 ACTGAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT CTGCAGTCTA TT
 ACTGTGCA AGATAATTATG ATGATCATT A CTGCCTTGAC
 TACTGGGGCC AAGGCACCAC TCTCACAGTC TCCTCAGT
 CG AAGGTGGAAG TGGAGGTTCT GGTGGAAGTG GAGGTT
 CAGG TGGAGTCGAC GACATTCAGC TGACCCAGTC TCCA
 GCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA GAAGGTCACC AT
 GACCTGCA GAGCCAGTTC AAGTGTAAGT TACATGAACT
 GGTACCAGCA GAAGTCAGGC ACCTCCCCCA AAAGATGG
 AT TTATGACACA TCCAAAGTGG CTTCTGGAGT CCCTTA
 TCGC TTCAGTGGCA GTGGGTCTGG GACCTCATAC TCTC 20
 TCACAA TCAGCAGCAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA CT
 TATTACTG CCAACAGTGG AGTAGTAACC CGCTCACGTT
 CGGTGCTGGG ACCAAGCTGG AGCTGAAACA TCATCACCC
 AT CATCATTAGT CGAC

および以下のアミノ酸配列（配列番号：22）

DIVMTQTPLT LSVTIGQPAS LSCKSSQSLL DSDGKTYL
 NW LLQRPGQSPK RLISLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDF
 TLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHLP WTFGGGKLE IKRG
 GGGSGG GSGGGGGSQV QLQQSGPELV KTGASVKISC KG
 SGYSFSGY YMHVVKQSHG KRLEWIGYIS GYNGDTRYNQ 30
 KFRGKATFIV DISSRTAYMQ FNSLTSEDSA VYYCARGG
 YY GYVDYWGQGT TLTVSSGGGG SDIKLQQSGA ELARPG
 ASVK MSCKTSGYTF TRYTMHWVKQ RPGQGLEWIG YINP
 SRGYTN YNQKFKDKAT LTTDKSSSTA YMQLSSLTSE DS
 AVYYCARY YDDHYCLDYW GQGTTTLTVSS VEGGSGGSGG
 SGGSGGVDDI QLTQSPA IMS ASPGEKVTMT CRASSSVS
 YM NWYQQKSGTS PKRWIYDTSK VASGVPYRFS GSGSGT
 SYS LTISSMEAEDA ATYYCQQWSS NPLTFGAGTK LELK
 HHHHHH

を含有した。

【0119】

トランスフェクトしたCHO細胞を無血清培地で培養し、Wue-1xCD3を上清みから回収した。カチオン交換カラムクロマトグラフィーから始め、続いて固定化金属アフィニティクロマトグラフィー（IMAC）およびゲルろ過の3工程精製でWue-1xCD3を上清みから精製した。単離したタンパク質の純度はSDS-PAGE（示さず）により測定すると>95%であった。適用した条件下で、分子はその単量体型で約54kDと思われる。精製タンパク質の最終収率は約2.5mg/細胞培養上清み1lであった。すべてのクロマトグラフィー工程は、Aekta FPLCシステム（ファルマシア）で行った。すべての化学薬品は、研究グレードのものであり、シグマ社（Deisenhofen）またはメルク（Darmstadt）から購入した。

10

20

30

40

50

【0120】

二重特異性Wue - 1抗体は、患者試料において効率的な抗体依存性細胞障害を媒介する末梢血単核細胞(PBMC)をFicoll(セロメド/バイオクロム(Seromed/Biochrom)社、ドイツ)密度勾配遠心分離により調製し、PHA(1 μ g/ml)およびIL - 2(60U/ml)で刺激した。RPMI、20%FCS(セロメド/バイオクロム社、ドイツ)、ペニシリン/ストレプトマイシンおよびピルベート(共にライフ・テクノロジーズ(Life Technologies)社、ドイツ)でPBMCを培養した。患者のインフォームドコンセントおよび地方倫理委員会の承認を得た後、該患者の細胞を通常の診断用検体から採取した。一次骨髄腫細胞の調製は標準的手順に従った。簡単には、多発性骨髄腫患者の骨髄吸引物由来の単核細胞を、Ficoll密度勾配遠心分離により分離し、抗CD138コート磁気ビーズ(ミルテニ・バイオテック(Miltenyi Biotec)社、ドイツ)とともに15分間4 でインキュベートした。CD138+細胞の分離は、MACS装置(ミルテニ・バイオテック社、ドイツ)において製造業者の指示書に従って実施した。精製後、70~90%の細胞がCD138+であった(データ示さず)。患者のインフォームドコンセントおよび地方倫理委員会の承認を得た後、該患者の細胞を通常の診断用検体から採取した。抗体媒介性細胞障害(ADCC)をフローサイトメトリーにより測定した。富化された多発性骨髄腫細胞を、PKH - 26染料(シグマ社)で製造業者の指示書に従って標識し、PBMC、抗体および2ng/mlのIL - 6(ペプロテック(Protech)、ドイツ)とともに培養した。その後のインキュベーション時、細胞をPBSで洗浄し、プロピジウムヨウ素(Propidium iodine)(PI)(2.5 μ g/ml)で染色した。「Cell - Quest」ソフトウェアを用いる「Facscalibur」フローサイトメーター(ともにベクトン・ディッキンソン社、ドイツ)で解析を行った。生存している骨髄腫細胞は、PKH - 26染料(FL - 2で測定)について陽性であり、FL - 3で測定したPIについて陰性であった。死滅した多発性骨髄腫細胞はPKH - 26およびPIの両方について陽性であった。PBMCはPKH - 26について陰性であった。特異的細胞障害性は、 $100 \times (1 - \text{被検試料中の増殖可能な多発性骨髄腫細胞} / 17 - 1A \times CD3 \text{ 対照試料中の増殖可能な多発性骨髄腫細胞の数})$ として計算した。アッセイは、6日後または培地の色が赤から黄色っぽくなったときに終了した。

【0121】

図3および4に示すように、PHA/IL - 2で予備刺激したPBMCとともに多発性骨髄腫試料をインキュベートした。6つの実験では骨髄ドナーから自己末梢血液試料を得ることが可能であり、5つの実験は健常ドナー由来の同種異系PBMCを用いて行った。自己または同種異系のPBMCを含有する試料間で有意差は見られなかった。殺傷の特異性は、形質細胞上に存在しない上皮表面抗原に結合する二重特異性抗体17 - A \times CD3とのインキュベーションにより制御された。図3は、代表的な実験を示し、PKH - 26染色をx軸に示し、ヨウ化プロピジウム(propidium iodide)をy軸に示す。Wue - 1 \times CD3は、PKH - 26標識された多発性骨髄腫細胞のPI陰性からPI陽性への有意なシフト(細胞溶解を示す)を示す。図4は、抗体濃度の関数としての多発性骨髄腫細胞の特異的溶解を示す。

【0122】

出願人または代理人の 整理番号 E 2915 PCT	国際出願番号
-------------------------------	--------

寄託した微生物または他の生物学的材料に
関する表示

(PCT 規則 13の2)

A. 以下の表示は本出願明細書中に記載の寄託微生物または他の生物学的材料に関する。 頁 11 , 行 2 ~ 7	
B. 寄託の識別 さらなる寄託物は別紙にて識別される <input type="checkbox"/>	
寄託機関の名称 DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
寄託機関の所在地(郵便番号および国名を含む) マシエルオーダー ヴェク (Mascheroder Weg) 1b D-38124 ブラウンシュバイク (Braunschweig) DE	
寄託日 2001年1月4日	受託番号 DSM ACC 2441
C. さらなる表示 (なければ空白のまま) この情報は別紙に続く <input type="checkbox"/>	
D. 表示がなされる指定国(表示がすべての指定国に対してでない場合) EP 出願人はEPC規則28(4)を利用する	
E. 表示の別途追完 (なければ空白のまま) 以下に列挙する表示は後日、国際事務局に提出する(表示の概要を具体的に、例えば「寄託物の受託番号」)	
受領官庁のみ使用	国際事務局のみ使用
<input type="checkbox"/> 本紙は国際出願とともに受領	<input type="checkbox"/> 本紙の国際事務局受領日
担当官	担当官

Form PCT/RO/134 (July 1998)

【図面の簡単な説明】

【図1】

図1は、本発明の抗体を用いた免疫組織化学である。

図1 a は、中央(星型)に胚中心を有する二次リンパ組織およびこの胚中心の上側3分の1における個々の褐色に染色された形質細胞である。

10

20

30

40

50

図 1 a の部分図 b は、形質細胞株 N C 1 - 9 2 3 の免疫染色を示し、ここですべての細胞は W u e - 1 により免疫組織化学的に強く陽性に標識されている。

図 1 b の部分図 a では、W u e - 1 陰性反応を生じるリンパ腫の未分化腫瘍部分を除いて、陽性に標識された形質細胞のびまん性宿主で、形質細胞に分化している B 細胞腫（いわゆる小悪性 M A L T リンパ腫）が見られうる。図 1 b の部分図 b では、高度に悪性のリンパ腫が W u e - 1 により標識され、これは悪性形質細胞（いわゆる退形成形質細胞腫）に相当し、細胞質の染色および膜の染色を有する。

図 1 c の挿入図は、成熟形質細胞の免疫組織化学である（F A C S 解析）。

図 1 d は、形質細胞株（N C I - H 9 2 9）を抗原供給源としたウエスタンブロットである。

10

【図 2】

図 2 のすべての部分図 a ~ h は、形質細胞に対して選択的な特異的結合パターンをヒト扁桃に基づいて記載したものである。

【図 3】

図 3 は、C D 1 3 8 に基づく免疫学的単離により富化された M M 細胞で行った細胞障害性アッセイである。骨髓腫生細胞の画分は、P K H - 2 6 染色（F L - 2 で測定）について陽性であり、P I（F L - 3 で測定）について陰性であった。M M 死細胞は P K H - 2 6 および P I の両方について陽性であった。P B M C は、P K H - 2 6 について陰性であった。P I 陰性骨髓腫細胞の顕著な損失が、4 日間のインキュベーション期間後、b s c 1 7 - 1 A x C D 3 と比べ、b s c W u e - 1 x C D 3 を含有する試料において検出可能であり、E : T 比は 1 0 : 1 である。三連で試料の解析を行うと、自己予備刺激 P B M C による標的細胞の平均特異的溶解は 5 6 % であった。

20

【図 4】

図 4 は、b s c W u e - 1 x C D 3 の用量依存的活性である。アッセイインキュベーション期間は 6 日間であり、E : T 比は 1 0 : 1 である。二連で試料の解析を行うと、自己予備刺激 P B M C による標的細胞の最大特異的溶解は 6 5 % であった。

【 図 1 】

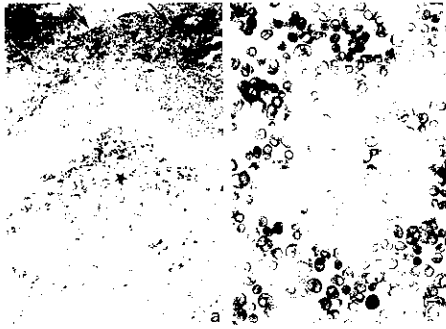


Fig. 1a

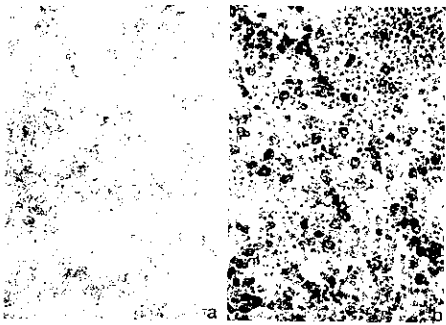


Fig. 1b

Fig. 1c

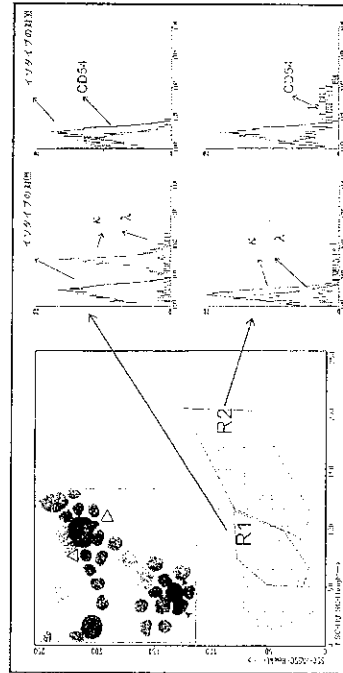
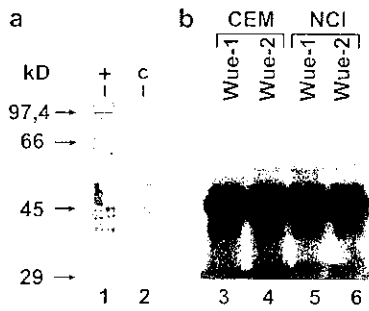


Fig. 1d



【 図 2 】

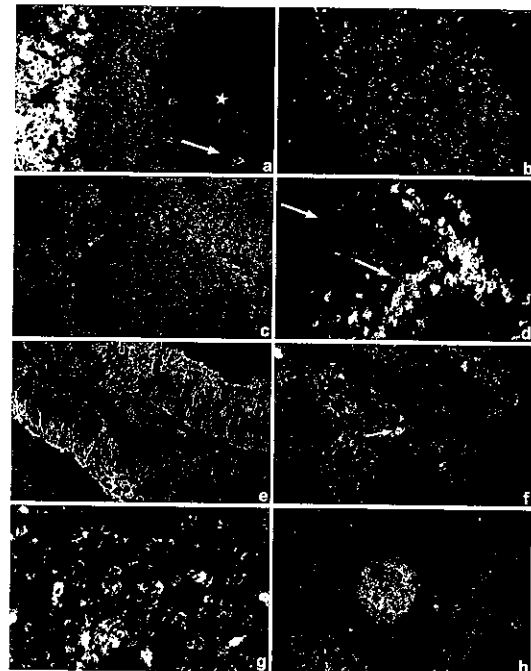


Fig. 2

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
5 July 2001 (05.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/47953 A2

(51) International Patent Classification: C07K 14/00 (74) Agents: VOSSHUS & PARTNER, Stubenstrasse 4, 81675 München (DE)

(21) International Application Number: PCT/EP99/013258

(22) International Filing Date:
22 December 2000 (22.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
199 62 583.2 25 December 1999 (25.12.1999) DE

(71) Applicants and
(72) Inventors: MÜLLER-HERMELINK, Hans, Konrad [DE/DE], Heinrich-Zimmer-Strasse 72, 97082 Würzburg (DE); GREINER, Axel [DE/DE], Schloss Homburg, 97855 Trübenstein (DE)

(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NH, SN, TD, TG).

Published: — Without international search report and to be republished upon receipt of that report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/47953 A2

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST PLASMA CELLS

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing an antibody, to an antibody specifically reacting with plasma cells, to genes which encode such antibodies, to antigens which are labeled by such an antibody, to additional antibodies directed against said antigens and to methods for producing said antibodies and to uses of such antibodies. In addition, the present invention relates to single-chain multifunctional polypeptides comprising (a) a first domain comprising a binding site of the antibodies defined herein and (b) a second domain comprising a binding site of an immunoglobulin chain or an antibody specifically recognizing the CD3 antigen. Furthermore, compositions and kits comprising the compounds of the invention are disclosed. Preferably said compositions are pharmaceutical or diagnostic compositions.

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

ANTIBODIES AGAINST PLASMA CELLS

The present invention relates to a method for producing an antibody against plasma cells, to an antibody, to genes which encode such antibodies, to antigens which are labeled by such an antibody, to additional antibodies directed against said antigens and to methods for producing said antibodies and to uses of such antibodies. In addition, the present invention relates to single-chain multifunctional polypeptides comprising (a) a first domain comprising a binding site of the antibodies defined herein and (b) a second domain comprising a binding site of an immunoglobulin chain or an antibody specifically recognizing the CD3 antigen. Such antibodies and/or single chain multifunctional polypeptides are required, in particular, in the field of biological and medical diagnostics and in the therapy of autoimmune diseases or tumors such as plasmacytomas or lymphomas. The invention also provides for nucleic acid molecules/polynucleotides encoding for said antibodies and/or single chain multifunctional polypeptides, as well as for vectors and host cells comprising said nucleic acid molecules/polynucleotides. Finally, the present invention provides for compositions comprising the compounds of the present invention. Preferably said compositions are pharmaceutical and/or diagnostic compositions.

In animal organisms and in humans, too, the immune system responds to stimuli (antigens) in two different ways. On the one hand, it produces a humoral immune response, wherein antibodies are produced by plasma cells (differentiated B-lymphocytes) which are directed against the antigen recognized as a foreign substance. On the other hand, it may produce a cellular immune response via T-lymphocytes, which in turn stimulate B-cells.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

2

The antibodies which are produced by the humoral immune response are directed against an antigenic determinant, that is to say a specific region (epitope) on the antigen and bind thereto. These antibodies are globular proteins (immunoglobulins Ig, for instance IgM or IgG) consisting of two identical chains each, a heavy chain (H-chain) and a light chain (L-chain), with each one of the L-chain being connected to one H-chain via disulfide bridges and each such pair forming a specific binding site for the antigenic determinant.

Antibodies against any antigens are produced in a conventional manner such that an animal organism is inoculated with the antigen and its humoral immune response subsequently forms antibodies against the inoculated antigen. These antibodies can subsequently be isolated. Moreover, it is nowadays possible to produce so-called monoclonal antibodies. For this purpose, a proliferating myeloma cell is fused with a B-cell from an immunized animal organism, which produces the corresponding antibody, as the B-cell. As a result, hybridoma cells are formed, which proliferate just as the myeloma cells, on the one hand, and form the antibody just as the plasma cell, on the other hand. These hybridoma cells are cultured and obtained from the culture of the monoclonal antibodies produced. Regarding these generally known and frequently used methods, attention is drawn, for instance, to Greiner A. et al. Laboratory Investigation (1994), vol. 70, pages 572-578, and the other source indications contained therein.

Thus, the monoclonal antibody technique allows identical antibodies to be produced in great numbers.

During the differentiation of B-cells into antibody-producing plasma cells various disorders may occur resulting in serious diseases in humans and animals. On the B-cell level, endogenic cells may be wrongly detected by antibodies, thereby producing, for instance, autoimmune diseases, wherein large numbers of antibodies against endogenic cells are produced and secreted by corresponding plasma cells. On the other hand, it is possible that B-cells start to divide in an uncontrolled manner, thereby forming tumors (lymphomas). Moreover, such an unlimited

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

3

proliferation is also known on the plasma cell level (syndromes: plasmocytoma, multiple myeloma).

Multiple myeloma is a plasma cell disorder characterized by the accumulation of malignant plasma cells in the bone marrow and the increased production of a specific immunoglobulin, usually monoclonal IgG or IgA. Common complications of overt multiple myeloma include recurrent bacterial infections, anemia, osteolytic lesions, and renal insufficiency. Multiple myeloma is responsible for about 1 percent of all cancer-related deaths in Western countries. Its epidemiologic pattern remains obscure, and its cause is unknown (Bataille and Harousseau, 1997, N. Engl. J. Med. 338).

In order to treat the disease, it is necessary to immunologically detect the participating degenerated cells.

It is true that the prior art describes antibodies against plasma cells which recognize all plasma cells. However, the antigen corresponding to these antibodies is only present intracellularly, and therefore it is necessary to destroy the cells prior to detection (see Anderson et al. (1984) J. Immunol., vol. 132, 3271-3179). Hence, it is not possible to detect plasma cells without destroying them.

Moreover, antibodies against surface antigens are known (see Anderson et al. (1984) J. Immunol., vol. 132, 3172-3179, Anderson et al. (1983) J. Immunol., vol. 130, 1132-1138, Tong et al. (1987) Blood, vol. 69, 238-148 or Turley et al. (1994), J. Clin. Pathol., vol. 47, 418-422). However, these antibodies have no specificity and detect both immature precursor cells and mature plasma cells. According to these investigations, plasma cells in the differentiated, antibody-secreting stage lose the typical surface antigens of the B-cell stage. Therefore, it is not possible to sort out immature precursor cells (bone marrow cells or B-cells) from mature cells (differentiated plasma cells which form antibodies themselves).

Consequently, it has so far not been possible to detect specific surface molecules (cluster of differentiation, CD) which could serve as antibody receptors (antigenic

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PC/T/EP0013238

4

determinants). Due to their completely differentiated condition, intact plasma cells are immunologically hardly recognizable or distinguishable.

Hence, a therapy of the afore-mentioned syndromes which would specifically attack the mature plasma cells is not known.

Thus, the only therapy so far available for the above-mentioned syndromes is chemotherapy, in particular in the form of the multimode chemotherapy. However, it suffers from the generally known drawbacks of a chemotherapy. An overview of the therapy concepts so far known is for instance contained in Lokhorst H.M. et al., *Br. J. Haematol.* (1999), vol. 106, pages 18 - 27.

Despite some progress with the above mentioned high dose chemotherapy and autologous stem cell/bone marrow transplantation multiple myeloma is still an incurable disease with a median survival of about 3 to 5 years (Peest (1995) *Eur J Cancer* 31a:146-151; Attal (1996) *N Engl J Med* 335:91-97). This bleak situation has stimulated the search for alternative therapeutic strategies, among which immunotherapeutic strategies are playing an increasing role. The development of antibody-based strategies for the removal of plasma cells in general and the treatment of multiple myeloma in particular have been hampered by the fact that suitable plasma cell-specific surface antigens are missing so far (Bataille and Harousseau, 1997, loc. cit.; Hallek, 1998 *Blood* 91, 3-21; see also Greiner, 2000, *Virchows Arch* 437, 372-379). Even if much research work regarding B-cell differentiation in the initial stages of B-cell development has been done so far, little is known about the terminal differentiation on the way to the plasma cell. The reason therefor is essentially that antibodies specific to plasma cells are yet not available for their identification. Antibodies, such as CD44, CD38, PC-1, PCA-1, MMA, BB-1 or VS38, so far published for plasma cells, have the disadvantage of a wide reaction range and of also reacting with various other tissues and with cytoplasmic antigens. Although normal and malignant plasma cells express a number of well characterized surface markers they all have turned out to be non plasma cell-specific. CD38 is an activation rather than a differentiation-associated antigen and lacks lineage restriction (Funaro, 1990; Alessio, 1990, *J. Immunol.* 145, 878-884). CD56 is a N-

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

5

CAM splice variant also expressed on NK-cells (Pellat-Deceunynck et al., 1998, *Leukemia* 12, 1977-1982; Robillard, 1998, *Clin. Cancer Res.* 4, 1521-1526), 3). CD138 (syndecan-1) is also expressed on epithelia (Sebestyen, 1999, *Br. J. Haematol.* 104, 412-419; Maatta, 1999, *J. Biol. Chem.* 274, 9891-9898; Anttonen, 1999, *Br. J. Cancer* 79, 558-564; Kato, 1995, *Mol. Biol. Cell* 6, 559-576). A recently described plasma cell-associated antigen HM1.24 has turned out to be also expressed by other cell types such as bone marrow stromal cells (Bataille and Harousseau, 1997, *loc. cit.*; Hallek, 1998, *loc. cit.*; Greiner, 2000, *loc. cit.*; Ohmoto, 1999, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 258, 583-591). Thus all of the above described antibodies do not specifically identify plasma cells and multiple myeloma cells.

Antibody-based approaches to eliminate lymphoma cells have proven to be effective in man either in the form of standard IgG antibodies as well as radio-immunoconjugates. Those molecules are based on antibodies recognizing CD20 and CD52 (rituximab, ibritumomab, tositumomab, Campath-1H). Although these antibody-based approaches show very promising results in lymphoma and leukemia therapies, the targets are not suitable for plasma cell malignancies (plasmacytoma / multiple myeloma).

Plasma cells constitute only one percent of all B-cells and only a small proportion express the pan-B cell markers CD19 (usually CD19 negative) and CD20 (less than 20%). Thus therapeutic approaches based on antibodies directed against CD19 or CD20 will only target a small subset of plasma cells, while inducing a major cytotoxic response due to the undesired elimination of non-plasma B cells.

Consequently, the present invention addresses the problem of proposing a method for preparing antibodies and of proposing antibodies which specifically label the plasma cells. Moreover, the present invention addresses the problem of proposing genes encoding corresponding antibodies and uses of such antibodies. Furthermore, it addresses the problem of proposing an antigen labeled with such antibodies. In addition, the technical problem of the present invention was to provide for means and methods to alleviate, prevent or cure plasma cells malignancies.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

6

The problem is solved by the antibody, the single-chain polypeptide, the antigen nucleotide sequences encoding said antibody, single-chain polypeptides or antigen, the uses and the methods for preparing additional antibodies and/or single-chain polypeptides of the present invention. Advantageous embodiments are specified in the dependent claims.

In order to obtain antibodies against a specific antigen, the state of the art proposes to inoculate animal organisms with the corresponding antigen (for instance by injection), with the result that they form antibodies against this antigen on account of their humoral immune response. The antibodies produced can subsequently be separated and purified. So far, this method has not been successful with intact mature plasma cells, as they have few antigenic determinants on their surface, with which it would have been possible to prepare specific antibodies specifically for plasma cells. Attempts of carrying out inoculations with plasma cells were not successful therefor.

This is the starting point of the present invention, wherein in contrast to the prevailing teaching, an animal organism is immunized with B-cells of the plasma differentiation line up to and including the lymphoplasmacytoid cell stage. Hence, in contrast to the prior art, it is not the desired antigen, i.e. the plasma cells, but their precursors that are used for inoculation. However, surprisingly, this very method allows antibodies to be obtained which specifically label plasma cells without labeling the corresponding precursor stages. The reason therefor may be that the corresponding precursor cells after inoculation develop further into plasma cells in the animal organism where they trigger a specific antibody reaction, which cannot be produced by direct immunization with plasma cells. From such an immunized animal organism it is now readily possible to obtain the produced antibodies as monoclonal antibodies by fusing corresponding spleen cells from said animal organism with myeloma cells into hybridoma cells. In this respect, reference is made to the generally known state of the art for producing monoclonal antibodies (see also herein below).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

7

Antibodies are essentially defined by the variable regions (Fv) of their L- and H-chains. The other regions (Fc) of the L-chain and H-chain, respectively, make no contribution to the antigen specificity of the antibody and are in each case largely invariable in different antibody classes.

The antibodies of the invention are characterized in that the variable region (Fv(L)) of at least one of its light chains (L-chain) possesses at least one of the following amino acid sequences or a part of it.

DIVMTQTPLTSLVTIGQPASLSC (variable region FW-1; SEQ ID NO: 1),
KSSQSLDSDGKTYLN (complementarity-determining region CDR-1; SEQ ID NO: 2),

WLLQRPGQSPKRLIS (variable region FW-2; SEQ ID NO: 3),
LVSKLDS (complementarity-determining region CDR-2; SEQ ID NO: 4),
GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC (variable region FW-3; SEQ ID NO: 5),
WQGTSLPWT (complementarity-determining region CDR-3; SEQ ID NO: 6)

and/or

FGGGTKLEIKR (variable region FW-4; SEQ ID NO: 7)
and/or the variable region (Fv(H)) of at least one of its heavy chains (H-chain) possesses at least one of the following amino acid sequences or a part thereof:

QVQLQQSGPELVKLGASVKISCKGSGYSFS (variable region FW-1; SEQ ID NO: 8),

GYVMH (complementarity-determining region CDR-1; SEQ ID NO: 9)
WVKQSHGKRLEWIG (variable region FW-2; SEQ ID NO: 10),
YISGYNGDTRYNQKFRG (complementarity-determining region CDR-2; SEQ ID NO: 11),

KATFIVDISSRTAYMQFNLSSEDSAVYYCAR (variable region FW-3; SEQ ID NO: 12),

GGYGYVDY (complementarity-determining region CDR-3; SEQ ID NO: 13)

and/or

WGQGTTLTVSS (variable region FW-4; SEQ ID NO: 14).

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

8

These antibodies can also be characterized in that the gene encoding the individual chains (L-and H-chain) of the antibody contains the following nucleotide sequences or corresponding fragments thereof:

for the L-chain

gaagcagcgc tagatcgt gatgaoccaa actccactca cttgtcggg taaccatgga caaccagcct
 cccctcttg caagcaagt cagagcctct tagatahga tggaaagaca tatttgaatt ggttgata
 gaggccaggc cagtcacca agcgcctaact ctctcggg tctaaattgg actctggagt cctgacaga
 ttcactggca gtagatcagg gacagattc acactgaaaa tcagcagagt ggaggctgag gattgggag
 tctatttg ctgcaagg acacatctc cgtggacatt cggggaggg accaagctgg aatcaaacg
 ggcgtgct cggccgcctg gatcatct c (SEQ ID NO: 15)

and/or for the H-chain

cgccatggcc ggggatcc ggccatggcc cagggcagc tgcagcagc tggacctgag ctagtgaaga
 ctggggctc agtgaagata tctgtaagg gttctggtta ctatcaggt ggttactaca tgcactgggt
 caagcagagc catggaaga ggcttgagtg gatggatai atagtggti ataattgga tactaggat
 aatcagaagt tcaggggcaa ggccacatt atgtagaca tatctccag gacagcciac atgcagttca
 acagcctgac atctgaagac tctcgggtct attactgac aagaggggt tactacggct acgtggacta
 ctggggcaca ggcaccacc tcacagctc ctacgcaaaa acgacacca agctgtata tccactggcc
 cctgtaate actgtcggc cggc (SEQ ID NO: 16)

The nucleotide sequence according to the invention in each case contains the above-mentioned nucleotide sequences or a part thereof and in each case represents one of the genes necessary for the above-mentioned antibody, functional antibody, fragment and/or functional derivative thereof.

The antibody may be a conventional immunoglobulin, for instance an immunoglobulin G (IgG), in which both light chains and both heavy chain each have the same amino acid sequence. Preferably said antibody is a mouse IgG2 or a human IgG1, yet other IgGs are also envisaged. However, the invention also covers

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

9

antibodies which are multifunctional polypeptides and/or bispecific, and for instance contain only one heavy and one light chain as described above, with the result that only one binding site for the plasma cells is formed. Particularly preferred bispecific antibodies are described herein below. It is particularly preferred that said bispecific antibodies are single-chain constructs.

The antibody of the invention can therefore be, e.g., a monoclonal antibody, polyclonal antibody, chimeric antibody, humanized antibody, bispecific antibody, synthetic antibody, antibody fragment such as Fab, Fv or scFv fragments etc., or a chemically modified derivative of any of these. Monoclonal antibodies can be prepared, for example, by the techniques as originally described in Köhler and Milstein, *Nature* 256 (1975), 495, and Galfré, *Meth. Enzymol.* 73 (1981), 3, which comprise the fusion of mouse myeloma cells to spleen cells derived from immunized mammals with modifications developed in the art. Monoclonal antibodies can, inter alia, be obtained by immunizing mice, for example BALB/c mice with human mononuclear blood cells obtainable as described in appended example 1.

Furthermore, additional antibodies or fragments thereof to the aforementioned plasma cells can be obtained by using methods which are described, e.g., in Harlow and Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor, 1988. The antibodies of the invention can be used, for example, for the immunoprecipitation, immunolocalization or purification of plasma cells of the invention as well as for the monitoring of the presence of such plasma cells and for the identification of compounds interacting with the plasma cells according to the invention. For example, surface plasmon resonance as employed in the BIAcore system can be used to increase the efficiency of phage display of antibodies which bind to an epitope recognized by an antibody of the invention (Schier, *Human Antibodies Hybridomas* 7 (1996), 97-105; Malmborg, *J. Immunol. Methods* 183 (1995), 7-13). The production of chimeric antibodies is described, for example, in WO89/09822. Methods for the production of humanized antibodies are described in, e.g., EP-A1 0 239 400 and WO90/07861. Furthermore, human antibodies in general have become accessible since the availability of transgenic mice expressing human antibodies also called xenogenic antibodies (Brüggemann, *Immunol. Today* 17 (1996), 391-397; the general principle for the production of xenogenic antibodies

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

10

such as human antibodies in mice is described in, e.g., WO 91/10741, WO 94/02602, WO 96/34096 and WO 96/33735) and of the combinatorial antibody library and phage display technology allowing the in vitro combination of variable regions of immunoglobulin heavy and light chains (V_H and V_L) and the in vitro selection of their antigen binding specificity (Winter, *Annu. Rev. Immunol.* 12 (1994), 433-455). By using the phage display method, rare events like one specific binding entity out of 10^7 to 10^9 different V_L/V_H - or V_H/V_L -pairs can easily be isolated; this is especially true when the repertoire of variable regions has been enriched for specific binding entities by using B-lymphocytes from immunized hosts as a source for repertoire cloning. In addition, approaches using semisynthetic or fully synthetic V_H - and/or V_L - immunoglobulin chain repertoires have been developed. For example, almost the complete repertoire of unrearranged human V-gene-segments has been cloned from genomic DNA and used for in vitro recombination of functional variable region genes, resembling V-J- or V-D-J-recombination in vivo (Hoogenboom, *J. Mol. Biol.* 227 (1992), 381-388; Nissim, *EMBO J.* 13 (1994) 692-698; Griffiths, *EMBO J.* 13 (1994), 3245-3260). Hence, all these derivatives of the antibody described herein below and in the appended examples are within the scope of the present invention as long the antibody recognizes specifically at least one epitope of an antigen specific for plasma cells, preferably human plasma cells. As discussed herein, the antibody of the invention may exist in a variety of forms besides complete antibodies; including, for example, Fv, Fab and $F(ab)_2$, as well as in single chains; see e.g. WO88/09344 and herein below.

The antibodies of the invention, their corresponding immunoglobulin chain(s) and/or functional fragments and derivatives thereof can be further modified using conventional techniques known in the art, for example, by using amino acid deletion(s), insertion(s), substitution(s), addition(s), and/or recombination(s) and/or any other modification(s) known in the art either alone or in combination. Methods for introducing such modifications in the DNA sequence underlying the amino acid sequence of an immunoglobulin chain are well known to the person skilled in the art; see, e.g., Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

11

In a preferred embodiment of the present invention, the antibody of the invention is the antibody which is produced by the hybridoma cell line DSM ACC 2441, preferably said antibody is the antibody WUE-1 that is produced by said hybridoma cell line.

Said hybridoma cell has been deposited in the culture collection Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) GmbH in Braunschweig, Germany on January 1, 2000, in accordance with the Budapest Treaty. The antibodies as described herein are particularly useful, inter alia, for the immunolocalization, immuno-localization and/or purification of plasma cells. Furthermore, they might be employed in assays for the detection and/or identification of compounds which are capable of interacting with or which are interacting with plasma cells.

The present invention also relates to a (human) B cell line which is capable of producing the antibody of the invention in a humanized form, e.g., by transduction of the cDNA coding for the variable heavy and light chain domains of WUE-1 antibody linked to the constant domains of an immunoglobulin into a human B cell line. Said cDNA is obtainable by methods known to the person skilled in the art and are described, inter alia, in Sambrook, loc. cit. and Ausubel "Current Protocols in Molecular Biology", Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). The cloning of said cDNA for expression (or sequencing) may follow standard protocols as described, e.g., in Orlandi, PNAS 86 (1989), 3833-3837 or as illustrated in appended examples, documenting the cloning of the variable regions of mAb WUE-1.

Furthermore, the present invention provides for a nucleotide sequence/polynucleotide encoding at least a variable region of an antibody of the invention and/or of an immunoglobulin chain of any of the before described antibodies of the invention. Polynucleotides encoding said regions are obtainable by methods which are well known in the art and comprise, inter alia, cloning techniques as described in Orlandi, PNAS 86 (1989), 3833-3837 or Sambrook, loc. cit. One form of immunoglobulin constitutes the basic structural unit of an antibody. This form is a tetramer and consists of two identical pairs of immunoglobulin chains, each pair having one light and one heavy chain. In each pair, the light and heavy chain

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

12

variable regions or domains are together responsible for binding to an antigen, and the constant regions are responsible for the antibody effector functions. In addition to antibodies, immunoglobulins may exist in a variety of other forms (including less than full-length that retain the desired activities), including, the above mentioned Fv, Fab, and F(ab')₂, as well as single chain antibodies (e.g., Huston, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(1988),5879-5883 and Bird, Science 242(1988), 423-426); see also herein below. An immunoglobulin light or heavy chain variable domain consists of a "framework" region interrupted by three hypervariable regions, also called CDRs. The extent of the framework region and CDRs have been precisely defined; see, e.g., "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, U.S. Department of Health and Human Services (1990). The sequences of the framework regions of different light or heavy chains are relatively conserved within a species. The framework region of an antibody, that is the combined framework regions of the constituent light and heavy chains, serves to position and align the CDRs. The CDRs are primarily responsible for binding to an epitope of an antigen. Chimeric antibodies are antibodies whose light and heavy chain genes have been constructed, typically by genetic engineering, from immunoglobulin variable and constant region genes belonging to different species. For example, the variable segments of the genes from a mouse monoclonal antibody may be joined to human constant segments.

Therefore, the teachings of the present invention provide for variable regions, in particular for CDRs of antibodies specifically detecting/interacting with plasma cells. Said variable regions may, inter alia, be employed to generate, via known recombinant techniques, chimeric, synthetic, etc. antibodies and/or immunoglobulin molecules or derivatives thereof. It is, for example, envisaged that the variable regions of the antibodies of the present invention be combined with constant regions of antibodies of a different Ig-subtype or of an Ig-subtype of a different species. This may, inter alia, particularly be useful in enhancing the effector function of said antibody, e.g. the effector function of induction of antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) and/or complement-dependent cytotoxicity. The skilled artisan is aware that such effector functions largely depend on the constant part of the antibody/immunoglobulin molecule and would chose such a constant part

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

accordingly.

Thus, the antibodies of the present invention can be produced by expressing recombinant DNA segments encoding the heavy and light immunoglobulin chain(s) of the antibody invention either alone or in combination. Said polynucleotide may be, e.g., DNA, cDNA, RNA or synthetically produced DNA or RNA or a recombinantly produced chimeric nucleic acid molecule comprising any of those polynucleotides either alone or in combination. Preferably said polynucleotide is part of a vector. Such vectors may comprise further genes such as marker genes which allow for the selection of said vector in a suitable host cell and under suitable conditions. Preferably, the polynucleotide of the invention is operatively linked to expression control sequences allowing expression in prokaryotic or eukaryotic cells. Expression of said polynucleotide comprises transcription of the polynucleotide into a translatable mRNA. Regulatory elements ensuring expression in eukaryotic cells, preferably mammalian cells, are well known to those skilled in the art. They usually comprise regulatory sequences ensuring initiation of transcription and optionally poly-A signals ensuring termination of transcription and stabilization of the transcript. Additional regulatory elements may include transcriptional as well as translational enhancers, and/or naturally-associated or heterologous promoter regions. In this respect, the person skilled in the art will readily appreciate that the polynucleotides encoding at least the variable domain of the light and/or heavy chain may encode the variable domains of both immunoglobulin chains or only one. Likewise, said polynucleotides may be under the control of the same promoter or may be separately controlled for expression. Possible regulatory elements permitting expression in prokaryotic host cells comprise, e.g., the *P_L*, *lac*, *trp* or *tac* promoter in *E. coli*, and examples for regulatory elements permitting expression in eukaryotic host cells are the *AOX1* or *GAL1* promoter in yeast or the CMV-, SV40-, RSV-promoter (Rous sarcoma virus), CMV-enhancer, SV40-enhancer or a globin intron in mammalian and other animal cells. As documented in the appended examples for the antibody derivative, e.g. a single-chain construct, the EF-2 promoter may be employed. Beside elements which are responsible for the initiation of transcription such regulatory elements may also comprise transcription termination signals, such as the SV40-poly-A site or the tk-poly-A site, downstream of the polynucleotide. In

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

14

this context, suitable expression vectors are known in the art such as Okayama-Berg cDNA expression vector pcDV1 (Pharmacia), pCDM8, pRc/CMV, pcDNA1, pcDNA3 (In-vitro gene), pSPORT1 (GIBCO BRL).

Preferably, the expression control sequences will be eukaryotic promoter systems in vectors capable of transforming or transfecting eukaryotic host cells, but control sequences for prokaryotic hosts may also be used. Once the vector has been incorporated into the appropriate host, the host is maintained under conditions suitable for high level expression of the nucleotide sequences, and, as desired, the collection and purification of the immunoglobulin light chains, heavy chains, light/heavy chain dimers or intact antibodies, binding fragments or other immunoglobulin forms may follow; see, Beychok, Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, N.Y., (1979).

As described above the nucleotide sequence polynucleotide of the invention can be used alone or as part of a vector to express the antibody of the invention in cells, for, e.g., gene therapy or diagnostics of diseases related to malignancies of plasma cells. The polynucleotides or vectors containing the DNA sequence(s) encoding any one of the above described antibodies is introduced into the cells which in turn produce the antibody of interest. Gene therapy, which is based on introducing therapeutic genes into cells by *ex-vivo* or *in-vivo* techniques is one of the most important applications of gene transfer. Suitable vectors, methods or gene-delivery systems for *in-vitro* or *in-vivo* gene therapy are described in the literature and are known to the person skilled in the art; see, e.g., Giordano, Nature Medicine 2 (1996), 534-539; Schaper, Circ. Res. 79 (1996), 911-919; Anderson, Science 256 (1992), 808-813; Isner, Lancet 348 (1996), 370-374; Muhlhauser, Circ. Res. 77 (1996), 1077-1086; Wang, Nature Medicine 2 (1996), 714-716; WO94/29469; WO 97/00957, Onodua, Blood 91 (1998), 30-36; Verzeletti, Hum. Gene Ther. 9 (1998), 2244-2251; Verma, Nature 389 (1997), 239-242; US 5,580,859; US 5,589,466; US 4,394,448 or Schaper, Current Opinion in Biotechnology 7 (1996), 635-640, and references cited therein. The polynucleotides and vectors of the invention may be designed for direct introduction or for introduction via liposomes, or viral vectors (e.g. adenoviral, retroviral) into the cell. Preferably, said cell is a germ line cell, embryonic cell, or egg cell or derived therefrom, most preferably said cell is a stem

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

15

cell. This embodiment is particularly suited for bispecific antibodies of the invention, e.g., with one specificity against a plasma cell antigen which would facilitate the treatment of plasma cell related diseases described herein (see also appended examples).

Furthermore, the present invention relates to vectors, particularly plasmids, cosmids, viruses and bacteriophages used conventionally in genetic engineering that comprise a polynucleotide encoding a variable domain of a chain of an antibody of the invention; optionally in combination with a polynucleotide of the invention that encodes the variable domain of the other chain of the antibody of the invention. Preferably, said vector is an expression vector and/or a gene transfer or targeting vector. Expression vectors derived from viruses such as retroviruses, vaccinia virus, adeno-associated virus, herpes viruses, or bovine papilloma virus, may be used for delivery of the polynucleotides or vector of the invention into targeted cell population. Methods which are well known to those skilled in the art can be used to construct recombinant viral vectors; see, for example, the techniques described in Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989). Alternatively, the polynucleotides and vectors of the invention can be reconstituted into liposomes for delivery to target cells. The vectors containing the polynucleotides of the invention (e.g., the heavy and/or light variable domain(s) of the immunoglobulin chains encoding sequences and expression control sequences) can be transferred into the host cell by well-known methods, which vary depending on the type of cellular host. For example, calcium chloride transfection is commonly utilized for prokaryotic cells, whereas calcium phosphate treatment or electroporation may be used for other cellular hosts; see Sambrook, *supra*. Once expressed, the whole antibodies, their dimers, individual light and heavy chains, or other immunoglobulin forms of the present invention, can be purified according to standard procedures of the art, including ammonium sulfate precipitation, affinity columns, column chromatography, gel electrophoresis and the like; see, Scopes, "Protein Purification", Springer-Verlag, N.Y. (1982). Substantially pure immunoglobulins of at least about 90 to 95% homogeneity are preferred, and 98 to 99% or more homogeneity most

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

16

preferred, for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the polypeptides may then be used therapeutically (including extracorporeally) or in developing and performing assay procedures.

The present invention furthermore relates to host cells transformed with a nucleotide sequence/polynucleotide or vector of the invention. Said host cell may be a prokaryotic or eukaryotic cell. The polynucleotide or vector of the invention which is present in the host cell may either be integrated into the genome of the host cell or it may be maintained extrachromosomally.

The host cell can be any prokaryotic or eukaryotic cell. The term "prokaryotic" is meant to include all bacteria which can be transformed or transfected with a DNA or RNA molecules for the expression of an antibody of the invention or the corresponding immunoglobulin chains. Prokaryotic hosts may include gram negative as well as gram positive bacteria such as, for example, *E. coli*, *S. typhimurium*, *Serratia marcescens* and *Bacillus subtilis*. The term "eukaryotic" is meant to include but not being limited to insect, fungal, plant, animal or human cells. Preferred fungal cells are, for example, those of the genus *Saccharomyces*, in particular those of the species *S. cerevisiae*. A polynucleotide coding for an antibody of the invention can be used to transform or transfect the host using any of the techniques commonly known to those of ordinary skill in the art. Especially preferred is the use of a plasmid or a virus containing the coding sequence of the antibody recognizing plasma cells, e.g. and epitope of the antigen of the invention for purposes of eukaryotic or prokaryotic transformation or transfection, respectively. Methods for preparing fused, operably linked genes and expressing them in, e.g., mammalian cells and bacteria are well-known in the art (Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, 1989). The genetic constructs and methods described therein can be utilized for expression of the antibody of the invention in eukaryotic or prokaryotic hosts. In general, expression vectors containing promoter sequences which facilitate the efficient transcription of the inserted polynucleotide are used in connection with the host. The expression vector typically contains an origin of replication, a promoter, and a terminator, as well as specific genes which are capable of providing phenotypic selection of the transformed cells. The transformed hosts can be grown in

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

17

fermentors and cultured according to techniques known in the art to achieve optimal cell growth. The antibody or its corresponding immunoglobulin chain(s) of the invention can then be isolated from the growth medium, cellular lysates, or cellular membrane fractions. The isolation and purification of the, e.g., microbially expressed antibodies or immunoglobulin chains of the invention may be by any conventional means such as, for example, preparative chromatographic separations and immunological separations such as those involving the use of monoclonal or polyclonal antibodies directed, e.g., against the constant region of the antibody of the invention.

In a further embodiment the present invention relates to a continuous, stable antibody-producing cell line which is capable of producing an antibody or a functional fragment or derivative thereof of the invention. Said cell line may be, as discussed herein above, a hybridoma cell line, preferably the hybridoma cell line having the deposit number DSM ACC 2441.

In yet another embodiment, the present invention provides for a method for preparing an antibody against plasma cells, characterized in that an animal is immunized with B-cells of the plasma cell differentiation line up and including the lymphoplasmacytoid cell stage and the prepared antibody is isolated in a conventional manner from the blood of the animal.

As, inter alia, illustrated in the appended examples, mice, preferably BALB/c mice may be immunized according to standard protocols with, e.g. a lymphoma cell line, inter alia a lymphoma of the MALT-type (H3302), capable of differentiating into a plasma cell in vitro.

Furthermore, the invention provides for preparing an antibody or a functional fragment or derivative thereof capable of recognizing plasma cells comprising

- (a) culturing the (host) cell or hybridoma cell of the present invention, capable of expressing an antibody, functional fragment, derivative thereof or an immunoglobulin chain and
- (b) isolating said antibody, functional fragment, derivative or immunoglobulin chain thereof from the cells or the culture medium.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

18

The present invention also involves a method for producing cells capable of expressing an antibody of the invention or its corresponding immunoglobulin chain(s) comprising genetically engineering cells with the polynucleotide or with the vector of the invention. Preferably, the immunoglobulin chain(s) thus expressed are displayed on the cell surface of the transfected cell. This embodiment as well as some others mentioned herein may be adapted for phage display techniques such as described above. The cells obtainable by the method of the invention can be used, for example, to test the interaction of the antibody of the invention with its antigen. The cells obtainable by the above-described method may also be used for the screening methods referred to herein below. Furthermore, transgenic animals, preferably mammals, comprising a polynucleotide, vector or cells of the invention may be used for the large scale production of the antibody of the invention.

Furthermore, the invention relates to an antibody of the invention or a fragment or a derivative thereof or immunoglobulin chain encoded by a polynucleotide according to the invention or obtainable by the above-described method or from cells produced by the method described above.

In this context it is also understood that the antibodies, fragments and/or derivatives thereof according to the invention may be further modified by conventional methods known in the art. By providing the antibodies according to the present invention it is also possible to determine the portions relevant for their binding activity. This may allow the construction of chimeric proteins comprising an amino acid sequence derived from an antibody of the invention which is crucial for binding activity and other functional amino acid sequences e.g. nuclear localization signals, transactivating domains, DNA-binding domains, hormone-binding domains, protein tags (GST, GFP, h-myc peptide, Flag, HA peptide) which may be derived from heterologous proteins.

The antibodies of the invention can also be present as antibody conjugates, for instance with proteins, such as toxins, cytokines, antibody fragments or enzymes, and/or with fluorophores, biotin and/or radioisotopes. Such antibody conjugates and

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

19

their preparation are described for instance in "G. T. Hermanson "Bioconjugate Techniques" Academic Press ISBN 0-12-342336-8, 1995", in particular in chapters 8, 10, 11 and 13, or in "J. E. Coligan et al. "Current Protocols in Immunology" J. Wiley and Sons, Inc. ISBN 0-471-52276-7, 1991", all of which are incorporated by reference into the disclosure content of this application.

Conjugation of radioisotopes is mediated by hetero-bifunctional chelate-forming active ingredients (see above, under G. T. Hermanson, Chapter 8).

Suitable radioisotopes include yttrium-88, yttrium-90, indium-111, iodine-125, iodine-131, samarium-153, lutetium-177, rhenium-186, bismuth-212 or bismuth-213.

Suitable toxins include ricin, recombinant ricin, bacterial toxins PE (Pseudomonas Exotoxin) or DT (diphtheria toxin) which are single-chain toxins lending themselves to the preparation of recombinant fusion toxins.

Antibodies which are conjugated with toxic antibiotics are disclosed, for instance, in US 5,013,547 and WO 92/07466.

An overview of the prior art which is hereby incorporated into the present application is given:

for radioimmunotherapy by S. J. DeNardo et al. in "A new era for radiolabeled antibodies in cancer?", *Current Opinion in Immunology*, 1999, vol. 11, pages 563-569,

for immunotoxins by R. J. Kreitman in "Immunotoxins in Cancer", *Current Opinion in Immunology*, 1999, vol. 11, pages 570-78,

for bispecific antibodies by D. M. Segal et al. in "Bispecific antibodies in cancer therapy", *Current Opinion in Immunology*, 1999, vol. 11, page 558-562,

for the preparation of single-chain Fv-antibodies in US 5,260,203,

for the preparation of antibody fragments conjugated or expressed as a single polypeptide chain in WO 91/19739,

for the preparation of humanized antibodies in US 5,859,205,

for the preparation of chimeric antibodies ("CDR grafting") in EP 0 620 276,

for the preparation of cross-linked antibodies in US 5,714,149,

for the preparation of antibody-cytokine fusion proteins by S. D. Gillies et al. in "Antibody-targeted interleukin 2 stimulates T-cell killing of autologous tumor cells", *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 1992, vol. 89, pages 1426 - 1432 or

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

20

by T. Dreier et al. in "Recombinant immunocytokines targeting the mouse transferrin receptor; construction and biological activities", *Bioconjug. Chem.* 1998, vol. 9, pages 482 - 489.

The afore-mentioned antibodies can be used to identify plasma cells (preferably human plasma cells), and, for instance, to sort them out. For instance, all that is needed for this purpose is to label the antibodies of the invention with a fluorochrome in a conventional manner and to carry out fluorescence-activated cell sorting (FACS). Additional separation methods are known from the state of the art (see for instance Greiner A., et al. (1997) *American Journal of Pathology*, vol. 150, pages 1583 - 1593). However, further methods of immunoisolation and immunoseparation are known in the art and may comprise the binding to solid supports, like beads, preferably magnetic beads etc.

In this manner, it is possible to separate and isolate all plasma cells from a blood sample or tissue. In this process, the degenerated plasma cells are also removed, in order to eliminate the plasma cells causing the tumor or the autoimmune disease.

In particular, labeling and removal of the plasma cells can also be carried out outside the body, for instance in an outer artificial blood circulation in a manner similar to dialysis.

The invention also relates to an antigen, characterized in that it binds to and/or is recognized by the antibody of the invention.

The antigen of the invention is labeled by the antibody of the invention. One of these antigens is characterized in that it is a surface protein of plasma cells and possesses a molecular weight of about 94 kD or of about 55 kD. It is in particular preferred that the molecular weight of the antigen of the present invention is between 50 and 80 kD, most preferably around 50 to 55 kD. Said molecular weight can be deduced employing, inter alia, the following method: A cell suspension (10^7 cells) is biotinylated by addition of sulfo-NHS-biotin (MW 400; Pierce). Said cells, for example patient cells, may be lysed in CHAPS-buffer and antibodies as disclosed

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

herein, e.g. the antibody secreted by the hybridoma cell line DSM ACC 2441, may be employed in immunoprecipitation approaches. Immunoprecipitated material may be solubilized in SDS-sample buffer and the sample may be electrophoresed employing a 10% SDS-PAGE. As molecular weight standards, commercially available standards like HMW standards from SIGMA (not-prestained) may be employed. The electrophoresed proteins may be transferred onto a nitrocellular membrane and the immunoprecipitated, biotinylated proteins can be visualized employing Streptavidin-HRP (e.g. from Pharmacia) and ECL-systems. This antigen has been found to occur not only on the surface of the plasma cells but also in their cell plasma.

Therefore, the present invention also relates to antibodies which are characterized in that it binds the above described antigen and/or an epitope thereof. Said antibody may be obtained by conventional methods and/or methods described herein. In particular, said antibody may be obtained by immunizing an animal with the antigen of the invention and/or with an epitope thereof and by isolating the formed antibody from the blood of said animal (see, inter alia, Harlow and Lane, loc. cit.).

The antibody(ies) may also be prepared by using the cells of the immunized animal to produce a cell line which produces said antibody as a monoclonal antibody, in that this cell line is cultured and the antibody produced is isolated. Preferably said cultural cell is a cell derived from a spleen cell of the immunized animal, preferably said cell is a hybridoma cell prepared by fusion with a myeloma cell (see also appended examples).

In a preferred embodiment of the invention, the antibody of the invention is used for identifying and/or characterizing the corresponding antigen and/or for specifically labeling/detecting/recognizing plasma cells, preferably human plasma cells. Said antibody may also be employed to prepare additional antibodies, fragments or derivatives thereof which label/recognize plasma cells. The invention also relates to the nucleotide sequences/polynucleotides encoding at least one variable region of these antibodies, fragments or derivatives thereof.

It has to be stressed that also a cDNA expression library in *E. coli* can be screened indirectly for peptides having at least one epitope of the antigen of the invention

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

22

using antibodies of the invention (Chang and Gottlieb, *J. Neurosci.*, 8:2123, 1988). After having revealed the structure of such antigens the rational design of binding partners and/or domains may be possible. For example, folding simulations and computer redesign of structural motifs can be performed using appropriate computer programs (Olszewski, *Proteins* 25 (1996), 286-299; Hoffman, *Comput. Appl. Biosci.* 11 (1995), 675-679). Furthermore, computers can be used for the conformational and energetic analysis of detailed protein models (Monge, *J. Mol. Biol.* 247 (1995), 995-1012; Renouf, *Adv. Exp. Med. Biol.* 376 (1995), 37-45).

The knowledge of this antigen now allows this antigen to be purified in a simple conventional manner, for instance by gel electrophoresis, and an animal organism to be immunized in turn by this antigen, in order to produce additional antibodies against the same antigen. Of course, the thus produced antibodies then again label only plasma cells specifically, as the cells present the 94 kD-antigen or the 55 kD antigen on their surfaces, and can be used as described above.

Hence, a defined method for producing any additional antibodies specifically directed against plasma cells is available which can be carried out by standard immunological techniques, as described in many textbooks (for instance Janeway et al., *Immunologie*, 1995, Spektrum-Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford). Of course, after immunization of the animal, the corresponding antibody can again be produced as a monoclonal antibody in a conventional manner, as known from the state of the art.

The present invention also provides for multifunctional polypeptides wherein at least one part of this polypeptide comprises a binding site of an immunoglobulin chain or of an antibody of this invention.

Preferably said multifunctional polypeptide is a single-chain multi-functional polypeptide comprising

- (a) a first domain comprising a binding-site of an immunoglobulin chain or an antibody as defined herein; and
- (b) a second domain comprising a binding site of an immunoglobulin chain or an antibody specifically recognizing the CD3 antigen.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

The terms "first domain" and "second domain" in accordance with the present invention mean that one binding site is directed against an epitope of the antigen of the invention, e.g. an specific epitope of an antigen on plasma cells, preferably of human plasma cells, the other binding site is directed against the CD3 antigen of T cells, preferably human T cells.

The term "binding site" as used in accordance with the present invention denotes a domain comprising a three-dimensional structure capable of specifically binding to an epitope like native antibodies, free scFv fragments or one of their corresponding immunoglobulin chains, preferably the V_H chain. Thus, said domain can comprise the V_H and/or V_L domain of an antibody or an immunoglobulin chain, preferably at least the V_H domain. On the other hand, said binding sites contained in the polypeptide of the invention may comprise at least one complementarily determining region (CDR) of an antibody or immunoglobulin chain recognizing the antigen of the invention and CD3 antigens, respectively. In this respect, it is noted that the domains of the binding sites present in the polypeptide of the invention may not only be derived from antibodies but also from other binding proteins recognizing CD3 or the antigen of the invention, such as naturally occurring surface receptors or ligands. In accordance with the invention, said binding site is comprised in a domain.

The term "multifunctional polypeptide" as used herein denotes a polypeptide comprising at least two amino acid sequences derived from different origins, i.e. from two different molecules, optionally derived from different species wherein at least two of said origins specify the binding sites. Accordingly, said binding sites specify the functions or at least some functions of said multifunctional peptide. Such polypeptides include, for example, bispecific single-chain (bsc) antibodies.

The term "single-chain" as used in accordance with the present invention means that said first and second domain of the polypeptide are covalently linked, preferably in the form of a co-linear amino acid sequence encodable by a nucleic acid molecule.

CD3 denotes an antigen that is expressed on T-cells as part of the multimolecular T-cell receptor complex and that consists of three different chains CD3 ϵ , CD3 δ and CD3 γ . Clustering of CD3 on T-cells, e.g., by immobilized anti-CD3-antibodies, leads

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

24

to T-cell activation similar to the engagement of the T-cell receptor but independent from its clone typical specificity. Actually, most anti-CD3-antibodies recognize the CD3 ϵ -chain.

Antibodies that specifically recognize the CD3 antigen are described in the prior art and can be generated by conventional methods known in the art, see, inter alia, WO 99/54440.

The single chain multifunctional polypeptide may be particularly useful in medical purposes, e.g. the treatment of tumors, in particular of lymphomas and/or plasmacytomas, multiple myelomas or in the treatment of immunological disorders, like autoimmune diseases.

In a preferred embodiment of the polypeptide of the invention said domains of the multifunctional polypeptide are connected by a polypeptide linker. Said linker is disposed between said first and said second domain, wherein said polypeptide linker preferably comprises plural, hydrophilic, peptide-bonded amino acids and connects the N-terminal end of said first domain and the C-terminal end of said second domain.

In a further preferred embodiment of the invention said first and/or second domain of the above-described polypeptide mimic or correspond to a V_H and V_L region from a natural antibody. The antibody providing the binding site for the polypeptide of the invention can be, e.g., a monoclonal antibody, polyclonal antibody, chimeric antibody, humanized antibody, bispecific antibody, synthetic antibody, antibody fragment, such as Fab, Fv or scFv fragments etc., or a chemically modified derivative of any of these as discussed herein above.

In a further preferred embodiment of the invention at least one of said domains in the above-described polypeptide is a single-chain fragment of the variable region of the antibody.

As is well known, Fv, the minimum antibody fragment which contains a complete antigen recognition and binding site, consists of a dimer of one heavy and one light

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

25

chain variable domain (V_H and V_L) in non-covalent association. In this configuration that corresponds to the one found in native antibodies the three complementarity determining regions (CDRs) of each variable domain interact to define an antigen binding site on the surface of the V_H - V_L dimer. Collectively, the six CDRs confer antigen binding specificity to the antibody. Frameworks (FRs) flanking the CDRs have a tertiary structure which is essentially conserved in native immunoglobulins of species as diverse as human and mouse. These FRs serve to hold the CDRs in their appropriate orientation. The constant domains are not required for binding function, but may aid in stabilizing V_H - V_L interaction. Even a single variable domain (or half of an Fv comprising only three CDRs specific for an antigen) has the ability to recognize and bind antigen, although usually at a lower affinity than an entire binding site (Painter, Biochem. 11 (1972), 1327-1337). Hence, said domain of the binding site of the polypeptide of the invention can be a pair of V_H - V_L , V_H - V_H or V_L - V_L domains either of the same or of different immunoglobulins. The order of V_H and V_L domains within the polypeptide chain is not decisive for the present invention, the order of domains given hereinabove may be reversed usually without any loss of function. It is important, however, that the V_H and V_L domains are arranged so that the antigen binding site can properly fold. The preparation of multifunctional polypeptides is well known in the art, as, inter alia, disclosed in WO 99/54440 or WO 00/06605.

In a preferred embodiment of the polypeptides of the invention said domains are arranged in the order V_L WUE-1- V_H WUE-1- V_H CD3- V_L CD3, wherein " V_L " and " V_H " means the light and heavy chain of the variable domain of specific anti-WUE-1 and anti-CD3 antibodies.

As discussed above, said binding sites are preferably connected by a flexible linker, preferably by a polypeptide linker disposed between said domains, wherein said polypeptide linker comprises plural, hydrophilic, peptide-bonded amino acids of a length sufficient to span the distance between the C-terminal end of one of said domains comprising said binding sites and the N-terminal end of the other of said domains comprising said binding sites when the polypeptide of the invention assumes a conformation suitable for binding when disposed in aqueous solution.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

26

Preferably, said polypeptide linker comprises a plurality of glycine, alanine and/or serine residues. It is further preferred that said polypeptide linker comprises a plurality of consecutive copies of an amino acid sequence. Usually, the polypeptide linker comprises 1 to 15 amino acids although polypeptide linkers of more than 15 amino acids may work as well. In a preferred embodiment of the invention said polypeptide linker comprises 1 to 5 amino acid residues.

In a particularly preferred embodiment of the present invention said polypeptide linker in the polypeptide of the invention comprises 5 amino acids. As demonstrated in the appended examples, said polypeptide linker advantageously comprises the amino acid sequence Gly Gly Gly Gly Ser.

In a most preferred embodiment of the present invention, the multifunctional polypeptide as defined herein above is a single-chain antibody. It is particularly preferred that the multifunctional polypeptide is encoded by the nucleic acid molecule as depicted in the appended examples and in SEQ ID NO: 21, preferably comprising the amino acid sequence as shown in SEQ ID NO: 22.

The present invention further relates to a (multifunctional) polypeptide comprising at least one further domain, said domains being linked by covalent or non-covalent bonds. Said multifunctional polypeptide may, therefore, be in the format of an "heterominibody" as discussed in WO 00/06605.

The linkage can be based on genetic fusion according to the methods known in the art and described above or can be performed by, e.g., chemical cross-linking as described in, e.g., WO 94/04686. The additional domain present in the polypeptide of the invention may preferably be linked by a flexible linker, advantageously a polypeptide linker to one of the binding site domains wherein said polypeptide linker comprises plural, hydrophilic, peptide-bonded amino acids of a length sufficient to span the distance between the C-terminal end of one of said domains and the N-terminal end of the other of said domains when said polypeptide assumes a conformation suitable for binding when disposed in aqueous solution. Preferably, said polypeptide linker is a polypeptide linker as described in the embodiments hereinbefore. The polypeptide of the invention may further comprise a cleavable

linker or cleavage site for proteinases, such as enterokinase; see also the appended examples.

Furthermore, said additional domain may be of a predefined specificity or function. For example, the literature contains a host of references to the concept of targeting bioactive substances such as drugs, toxins, and enzymes to specific points in the body to destroy or locate malignant cells or to induce a localized drug or enzymatic effect. It has been proposed to achieve this effect by conjugating the bioactive substance to monoclonal antibodies (see, e.g., N.Y. Oxford University Press; and Ghose, J. *Natl. Cancer Inst.* 61 (1978), 657-676).

In this context, it is also understood that the polypeptides according to the invention may be further modified by conventional methods known in the art. This allows for the construction of chimeric proteins comprising the polypeptide of the invention and other functional amino acid sequences, e.g., nuclear localization signals, transactivating domains, DNA-binding domains, hormone-binding domains, protein tags (GST, GFP, h-myc peptide, FLAG, HA peptide) which may be derived from heterologous proteins.

In context of the present invention, the invention also relates to polynucleotides/nucleic acid molecules encoding the multifunctional polypeptides of the invention comprised in vectors and/or transfected into host cells as described herein above. In general, the term "polynucleotide", "nucleic acid molecules" and "nucleotide sequences" relate to DNA, RNA, PNA as well as recombinantly produced chimeric nucleic acid molecules comprising any of these polynucleotides either alone or in combination.

In a further embodiment the present invention relates to a composition comprising the antibodies or functional fragments or derivatives thereof, the multifunctional polypeptide, the nucleotide sequences/polynucleotides, vectors and/or cells of the invention. Preferably said composition is a pharmaceutical or a diagnostic composition.

The pharmaceutical composition of the present invention may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier. Examples of suitable pharmaceutical carriers are well known in the art and include phosphate buffered saline solutions, water, emulsions, such as oil/water emulsions, various types of wetting agents, sterile solutions, etc. Compositions comprising such carriers can be formulated by well known conventional methods. These pharmaceutical compositions can be administered to the subject at a suitable dose. Administration of the suitable compositions may be effected by different ways, e.g., by intravenous, intraperitoneal, subcutaneous, intramuscular, topical or intradermal administration. The dosage regimen will be determined by the attending physician and clinical factors. As is well known in the medical arts, dosages for any one patient depends upon many factors, including the patient's size, body surface area, age, the particular compound to be administered, sex, time and route of administration, general health, and other drugs being administered concurrently. Generally, the regimen as a regular administration of the pharmaceutical composition should be in the range of 1 µg to 10 mg units per day. If the regimen is a continuous infusion, it should also be in the range of 1 µg to 10 mg units per kilogram of body weight per minute, respectively. However, a more preferred dosage for continuous infusion might be in the range of 0.01 µg to 10 mg units per kilogram of body weight per hour. Particularly preferred dosages are recited herein below. Progress can be monitored by periodic assessment. Dosages will vary but a preferred dosage for intravenous administration of DNA is from approximately 10^8 to 10^{12} copies of the DNA molecule. The compositions of the invention may be administered locally or systemically. Administration will generally be parenterally, e.g., intravenously; DNA may also be administered directed to the target site, e.g., by biolistic delivery to an internal or external target site or by catheter to a site in an artery. Preparations for parenteral administration include sterile aqueous or non-aqueous solutions, suspensions, and emulsions. Examples of non-aqueous solvents are propylene glycol, polyethylene glycol, vegetable oils such as olive oil, and injectable organic esters such as ethyl oleate. Aqueous carriers include water, alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, including saline and buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride, lactated Ringer's, or fixed oils. Intravenous vehicles include

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

29

fluid and nutrient replenishes, electrolyte replenishers (such as those based on Ringer's dextrose), and the like. Preservatives and other additives may also be present such as, for example, antimicrobials, anti-oxidants, chelating agents, and inert gases and the like. In addition, the pharmaceutical composition of the present invention might comprise proteinaceous carriers, like, e.g., serum albumine or immunoglobuline, preferably of human origin. Furthermore, it is envisaged that the pharmaceutical composition of the invention might comprise further biologically active agents, depending on the intended use of the pharmaceutical composition. Such agents might be drugs acting on the gastro-intestinal system, drugs acting as cytostatica, or drugs employed in the treatment of autoimmune diseases, (multiple) lymphomas, multiple myelomas or plasma cytomas.

It is envisaged by the present invention that the various polynucleotides and vectors of the invention are administered either alone or in any combination using standard vectors and/or gene delivery systems, and optionally together with a pharmaceutically acceptable carrier or excipient. Subsequent to administration, said polynucleotides or vectors may be stably integrated into the genome of the subject.

On the other hand, viral vectors may be used which are specific for certain cells or tissues and persist in said cells. Suitable pharmaceutical carriers and excipients are well known in the art. The pharmaceutical compositions prepared according to the invention can be used for the prevention or treatment or delaying of different kinds of diseases, which are related to malignancies, in particular lymphomas, multiple myelomas, plasma-cytomas and autoimmune diseases.

Furthermore, it is possible to use a pharmaceutical composition of the invention which comprises polynucleotide or vector of the invention in gene therapy. Suitable gene delivery systems may include liposomes, receptor-mediated delivery systems, naked DNA, and viral vectors such as herpes viruses, retroviruses, adenoviruses, and adeno-associated viruses, among others. Delivery of nucleic acids to a specific site in the body for gene therapy may also be accomplished using a biolistic delivery system, such as that described by Williams (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 (1991), 2726-2729). Further methods for the delivery of nucleic acids comprise particle-

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

mediated gene transfer as, e.g., described in Verma, *Gene Ther.* 15 (1998), 692-699.

It is to be understood that the introduced polynucleotides and vectors express the gene product after introduction into said cell and preferably remain in this status during the lifetime of said cell. For example, cell lines which stably express the polynucleotide under the control of appropriate regulatory sequences may be engineered according to methods well known to those skilled in the art. Rather than using expression vectors which contain viral origins of replication, host cells can be transformed with the polynucleotide of the invention and a selectable marker, either on the same or separate plasmids. Following the introduction of foreign DNA, engineered cells may be allowed to grow for 1-2 days in an enriched media, and then are switched to a selective media. The selectable marker in the recombinant plasmid confers resistance to the selection and allows for the selection of cells having stably integrated the plasmid into their chromosomes and grow to form foci which in turn can be cloned and expanded into cell lines. Such engineered cell lines are also particularly useful in screening methods for the detection of compounds involved in, e.g., B-cell/T-cell interaction.

A number of selection systems may be used, including but not limited to, the herpes simplex virus thymidine kinase (*Wigler, Cell* 11 (1977), 223), hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase (*Szybalska, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 48 (1962), 2026), and adenine phosphoribosyltransferase (*Lowy, Cell* 22 (1980), 817) in *tk*, *hgprt* or *aprt* cells, respectively. Also, antimetabolite resistance can be used as the basis of selection for *dhfr*, which confers resistance to methotrexate (*Wigler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980), 3567; *O'Hare, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 1527), *gpt*, which confers resistance to mycophenolic acid (*Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78 (1981), 2072); *neo*, which confers resistance to the aminoglycoside G-418 (*Calberre-Garapin, J. Mol. Biol.* 150 (1981), 1); *hygro*, which confers resistance to hygromycin (*Santerre, Gene* 30 (1984), 147); or puromycin (*pat*, puromycin N-acetyl transferase). Additional selectable genes have been described, for example, *trpB*, which allows cells to utilize indole in place of tryptophan, *hisD*, which allows cells to utilize histinol in place of histidine (*Hartman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 8047); and ODC (ornithine decarboxylase) which confers resistance to the ornithine decarboxylase inhibitor, 2-(difluoromethyl)-

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

31

DL-ornithine, DFMO (McCologue, 1987, In: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed.).

The compounds of the present invention, in particular the antibodies may be particularly useful in filtering systems. For example, when therapeutically desired the antibodies or functional fragments or derivatives thereof of the invention may be employed in so-called "purging"-strategies, wherein the blood of or bone marrow of a patient, e.g. a plasmacytoma patient, is freed from its malignant plasma cells, e.g. its tumor cells during bone marrow transplantation.

The diagnostic composition of the invention comprising any one of the above described antibodies, (multifunctional) polypeptides, polynucleotides, vectors or (host) cells of the invention may optionally comprise suitable means for detection.

The antibodies as well as the (multifunctional) polypeptides of the invention are also suited for use in immunoassays in which they can be utilized in liquid phase or bound to a solid phase carrier. Examples of immunoassays which can utilize the polypeptide of the invention are competitive and non-competitive immunoassays in either a direct or indirect format. Examples of such immunoassays are the radioimmunoassay (RIA), the sandwich (immunometric assay) and the Western blot assay. The antibodies as well as polypeptides are also useful in immuno-isolation approaches as well as in immuno-precipitation.

The antibodies as well as polypeptides of the invention can be bound to many different carriers and used to isolate cells specifically bound to said antibodies as well as polypeptides. Examples of well-known carriers include glass, polystyrene, polyvinyl chloride, polypropylene, polyethylene, polycarbonate, dextran, nylon, amyloses, natural and modified celluloses, colloidal metals, polyacrylamides, agaroses, and magnetite. The nature of the carrier can be either soluble or insoluble for the purposes of the invention.

There are many different labels and methods of labeling known to those of ordinary skill in the art. Examples of the types of labels which can be used in the present invention include enzymes, radioisotopes, colloidal metals, fluorescent compounds,

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

32

chemiluminescent compounds, and bioluminescent compounds; see also the embodiments discussed hereinabove. The diagnostic composition of the present invention is particularly useful in detecting, labeling as well as isolating plasma cells, preferably human plasma cells. The diagnostic composition is also useful for the in vivo and in vitro study of B-cell lymphomas, the mechanism of B-cell differentiation, or the biology of plasma cells.

The present invention also relates to the use of the compounds of the invention described hereinabove for the preparation of a pharmaceutical composition for the treatment of plasma cell malignancies, in particular multiple myelomas, lymphomas, plasmacytomas (tumors) as well as autoimmune diseases.

The present invention also provides for a kit comprising the antibody or a functional fragment or a derivative thereof of the present invention, the antigen of the invention, the epitope of the invention, the (multifunctional) polypeptide of the invention, the nucleotide sequence of the invention and/or the vector and/or host of the invention.

Such a kit may comprise a carrier means being compartmentalized to receive in close confinement one or more container means such as vials, tubes and the like, each of the container means comprising one of the separate elements to be used in the method. For example, one of the container means may comprise an antigen or epitope of the invention bound to a carrier. A second container may comprise soluble, detectably-labeled second antibody, in lyophilized form or in solution. In addition, the carrier means may also contain a plurality of containers each of which comprises different, predetermined amounts of the antigen or epitopes of the invention.

In summary, regarding plasma cells, only specific antibodies directed against cytoplasmic components have so far been available according to the state of the art, and hence were incapable of recognizing the plasma cell surface. The antibodies of the invention are, for the first time, directed against antigens which are expressed on the cell surface of plasma cells and are specific for plasma cells. Hence, for the

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

first time, antibodies are available, which can be used in the diagnosis and therapy of, for instance, autoimmune diseases, lymphomas or plasmocytomas, and offer a substitute for chemotherapy with all its side effects, which was the only therapy so far known in the art.

The figures show:

Figure 1 Immunohistochemistry employing the antibody of the invention.

Figure 1a Secondary lymphatic tissue with a germinal center in the middle (star) and individual brown-stained plasma cells in the upper third of this germinal center.

Partial picture b of Fig. 1a shows immunostaining of the plasma cell line NCI-923, in which all cells are immunohistochemically strongly positively labeled with Wue-1.

Figure 1b In partial picture a of Fig. 1b, a B-cell tumor (a so-called little malignant MALT lymphoma) differentiating into plasma cells can be seen with a diffuse host of positively labeled plasma cells apart from the not yet differentiated tumor part of the lymphoma which produces a Wue-1 negative reaction. In partial picture b of Fig. 1b, a highly-malignant lymphoma is labeled with Wue-1 which corresponds to malignant plasma cells (so-called anaplastic plasmocytoma) and has a cytoplasm staining and membrane staining.

Figure 1c Picture insert: immunohistochemistry of mature plasma cells. FACS analysis.

Figure 1d Western blot, in which a plasma cell line (NCI-H929) served as an antigen source.

Figure 2 In all partial pictures a to h of Fig. 2, the specific binding pattern which is selective for plasma cells is described on the basis of human tonsils.

Figure 3 Cytotoxicity assay performed with MM cells enriched by CD138-based immunisolation. The fraction of living myeloma cells was positive for the PKH-26 dye (measured in FL-2) and negative for PI (measured in FL-3). Dead MM cells were positive for both, PKH-26 and PI. PBMCs were negative for PKH-26. A strong loss of PI-negative myeloma cells is detectable in the sample containing bscWue-1xCD3 compared to bsc17-1AxCD3 after an incubation time of 4 days and an E:T ratio of 10:1. Samples were analyzed as triplicates showing a mean specific lysis of 56% of target cells by autologous prestimulated PBMCs.

Figure 4 Dose dependent activity of bscWue-1xCD3. Assay incubation time was 6 days and the E:T ratio 10:1. Samples were analyzed as duplicates showing a maximum specific lysis of 65% of target cells by autologous prestimulated PBMCs.

In the following, an example of a method for preparing an antibody according to the invention and an example of an antibody according to the invention is given. Furthermore, the preparation of a single-chain multifunctional compound and its corresponding use in accordance with the invention is illustrated.

Example 1: The method for preparing an antibody ("Wue-1")

a) Immunization of a mouse

BALB/c - mice were immunized with cells of a cell line which was obtained from a lymphoma of the MALT type (cell line No. H3302/88, Dr. A. Greiner, Institut für Pathologie, Universität Würzburg). These cells are capable of differentiating into plasma cells *in vitro*.

b) Isolation of spleen cells of the immunized mouse

The sterilely removed spleen was placed into a petri dish containing 5 ml of RPMI without serum and pressed through a nylon gauze net (pore size 100 μm). Subsequently, the cell suspension was resuspended several times with a 5 ml pipette and transferred to a 50 ml vial. The thus obtained spleen cells were washed twice with 20 ml of HBSS. That is to say, the cells were centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes in each case, the supernatant was removed and the pellet was resuspended in 20 ml of HBSS in each case.

c) Preparation of the fusion partner (myeloma cells)

The myeloma cells (P3x63 Ag8.653, see Kearney J. F. et al. (1979) *Journal of Immunology*, vol. 123, page 1548 - 1550) were kept in azaguanin medium (1 mg/ml RPMI + 10% FKS) for some days prior to fusion. For the fusion of a mouse spleen about 4×10^7 myeloma cells were needed (this is the content of about one vial of a confluent grown cell culture of 175 cm^2). The myeloma cells were removed from the bottom of the vial by means of EDTA buffer, and subsequently washed with HBSS, like the spleen cells, and again centrifuged, and the supernatant above the pellet was sucked off.

d) Cell fusion

The suspension with spleen cells from step 2 was placed on the pellet from myeloma cells from step 3 and mixed with it.

Fusion was carried out at +37°C according to standard procedures (see for instance Greiner et al. (1994) "Monoclonal gammopathies III. Clinical significance and basic mechanism" (editors Radl et al.), pages 187 - 190, EURAGE, Leiden, the Netherlands). To this end, all required media were preheated to +37°C in a water bath.

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

36

Within one minute after mixing the spleen cells with the myeloma cells, 1 ml of 50% PEG was slowly dropped into the cell mixture while the mixture was stirred, in order to prevent lump formation. After waiting for 1.5 minutes, first 15 ml RPMI without serum and then 20 ml RPMI + 10% FKS were slowly dropped into the mixture, while the mixture was stirred. The cell mixture of myeloma fusion partner cells and mouse spleen cells was centrifuged at 1500 rpm for 5 minutes, the supernatant was removed and the pellet resuspended in 125 ml of RPMI + 10% FKS + 200 units per milliliter IL-6 + 0.5 ml per 100 ml of gentamycin. The cell suspension thus obtained was distributed in milliliters into five 24-well plates. After culturing for about 24 hours, 1 ml of RPMI + 10% FKS + 200 units per milliliter IL-6 + 0.5 ml per 100 ml of gentamycin + 2 x HAT was added per well.

e) Culturing of hybridoma cells

The fused hybridoma cells were supplied with new medium (RPMI + 10% FKS + 200 units per milliliter IL-6 + 0.5 ml per 100 ml gentamycin + 1 x HAT) every 4 days. For this purpose, the culture supernatant of the wells was completely sucked off (hybridoma cells grow adherently), and 2 ml of new medium were added per well. After 14 days, the 'HAT medium' was exchanged for 'HT-medium' (RPMI + 10% FKS + 200 units per milliliter IL-6 + 0.5 ml per 100 ml gentamycin + 1% HAT). If growing clones covered the field of view in the microscope, they were tested for immunoglobulin production. All positive clones were transferred into small culture vials (25 cm²).

f) Specificity test

All positive clones were immuno-histochemically tested for specificity by being cut in the frozen state and subjected to immunostaining (see below).

After repeated recloning, a stable cell line was obtained.

g) Isolation of the antibodies produced.

The supernatant of the cultures of the afore-mentioned cell line was removed and purified by precipitation with ammonium sulfate and subsequent protein A affinity chromatography and labeled with FITC or biotin using N-hydroxy-succinimide ester (company Sigma, Germany) in accordance with standard methods (Greiner et al (1994) Lab. Invest., vol. 70, pages 572-578). The antibody produced by this cell line is hereinafter referred to as "Wue-1". It was identified by isotype IgG2a.

h) The antibody Wue-1 was characterized in respect of its amino acid sequence. The variable region Fw(L) of its light chains (L-chains) has the following sequence

its partial sequence

DIVMTQTPLTSLVITIGQPASLSC corresponds to variable region FW-1

KSSQSLLDSDGKTYLN corresponds to the complementarity-determining region CDR-1

WLLQRPGQSPKRLIS corresponds to variable region FW-2

LVSKLDS corresponds to the complementarity-determining region CDR-2

GVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEADLGVYYC corresponds to variable region FW-3

WQGTSLPWT corresponds to the complementarity-determining region CDR-3

and

FGGSKLEIKR corresponds to variable region FW-4.

The variable region Fw(H) of its heavy chains (H-chains) shows the following sequence:

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

38

QVQLQQSGPELVKTGASVKISCKGSGYSFSGYYMHVWKQSHGKRLEWIG
 YISGYNGDTRYNQKFRGKATFIVDISRTAYMQFNLSLSEDSAVYYCARGG
 YGYVDYWGQGTTLTVSS

Its partial sequence

QVQLQQSGPELVKTGASVKISCKGSGYSFSGYSF corresponds to variable region
 FW-1,

GYMH corresponds to the complementarity-determining region CDR-1,

VWKQSHGKRLEWIG corresponds to variable region FW-2,

YISGYNGDTRYNQKFRG corresponds to the complementarity-determining
 region CDR-2

KATFIVDISRTAYMQFNLSLSEDSAVYYCAR corresponds to variable
 region FW-3,

GGYYGYVDY corresponds to the complementarity-determining region CDR-
 3

and

WGQGTTLTVSS correspond to variable region FW-4.

Moreover, the nucleotide sequence of gene sequences encoding antibody
 Wue-1 was analyzed. The gene coding for the light L-chains of the antibody
 Wue-1 contains the following nucleotide sequence:

gaagcacgag tagatacgt gatgacccaa aciccactca cttgtcggg taccattgga
 caaccagcct cctctctg caagcaagt cagagcctct tagatahtga tggaaagaca tatttgaatt
 ggtgttaca gaggccagge cagtctcaa agcgcctaat ctctctggg tctaaattgg actctggagt
 cctgacaga ttactggca gtggatcagg gacagattc acactgaaaa tcagcagagt
 ggaggctgag gattgggag tctattaitg ctggcaaggt acacatctc cgtggacatt
 cgttggaggc accaagctgg aatcaaacg ggctgatgct gcggcgcctg gatccatct c (SEQ
 ID NO: 15)

The gene coding for the heavy H-chains of antibody Wue-1 contains the
 following nucleotide sequence:

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

39

cgccatggcc gggggattcc ggccatggcg caggfgcagc tgcagcagtc tggacctgag
 ctagtgaaga ctggggcttc agtgaagata ictgttaagg gtictggta ctcaatcagt ggttacteca
 tgcactgggt caagcagagc catggaaga ggctgagtg gattggatat attaglggit
 alaattggtga taclaggat aatcagaagt tcaggggcaa ggccacattt attgtagaca
 tatctccag gacagcctac atgcagitca acagcctgac atctgaagac tctgctgtct
 attactgtc aagagggggt tactacggct acgtggacta ctggggcaa ggcaccacc
 tcacagtctc ctacgcaaaa acgacaccca agcttgtcta tccactggcc cctggtaatc
 actgtcggc cgccg (SEQ ID NO: 16)

- i) The above-mentioned materials used are defined as follows:

Nylon gauze of the company NORAS
 8-azaguanin of the company Sigma No. A1007
 HBSS (Hank's salts) of the company Linaris No. F1431 KG
 EDTA buffer of the company Linaris No. L1253 GG
 PEG (polyethylene glycol 1500) of the company Boehringer
 FKS (fetal calf serum) of the company Linaris No. S3181 KG
 RPMI of the company Linaris No. F2613 KG
 HAT supplement 50x of the company Linaris No. K1931 GG
 HT supplement 50x of the company Linaris No. K1932 GG
 Gentamycin of the company Linaris No. F1141 FG
 IL-6 (interleukin-6) of the company Pharmingen, Hamburg

For the specificity tests, the antibody was purified from the cell culture supernatant by ammonium sulfate precipitation and subsequent affinity chromatography. The specificity test was carried out with preparations of fresh tissue cuts, cell centrifugation products and cell suspension solutions by immuno histochemistry.

j) Results:

Wue-1-positive cells were unambiguously and reproducibly identified by immunohistochemistry within secondary germinal centers and in the marginal zone and below the crypts of the tonsils (Figs. 1A and 1B). The morphology and immunohistochemistry corresponds to mature plasma cells of either the Marschalko type or lymphoplasmacytoid type (Fig. 1C with picture insert).

In partial picture a of Fig. 1A a secondary lymphatic tissue with a germinal center in the middle (star) and individual brown-stained plasma cells in the upper third of this germinal center can be seen. This is the typical maturation zone for lymphocytes into plasma cells. Moreover, outside the follicles too, some positively labeled cells (arrows) can be seen near the surface epithelium at the upper margin of the picture. Partial picture b of Fig. 1A shows immunostaining of the plasma cell line NCI-923, in which all cells are immunohistochemically strongly positively labeled with Wue-1. The labeling pattern is in each case cytoplasmic and appears at the membrane, as has been shown by the non-permeabilizing FACS staining depicted in Fig. 1C.

Wue-1 did not react with macrophages or other lymphatic cells, such as T-lymphocytes or macrophages, and did not show any binding in the peripheral blood, liver tissue, kidneys, muscles, skin, urinary bladder, testis and ovary, and reacted weakly and inconsistently with secretory epithelium in the gastro intestinal duct (stomach, intestine).

Wue-1 did, however, react with all malignant tumors derived from plasma cells. By contrast, normal T- and B-lymphocytes and tumors from the early B-cell differentiation phase reacted negatively (Fig. 1B). In partial picture a of Fig. 1B, a B-cell tumor (a so-called little malignant MALT lymphoma) differentiating into plasma cells can be seen with a diffuse host of positively labeled plasma cells apart from the not yet differentiated tumor part of the lymphoma which produces a Wue-1 negative reaction. In partial picture b of Fig. 1B, a highly-malignant lymphoma is labeled with Wue-1 which

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

41

corresponds to malignant plasma cells (so-called anaplastic plasmocytoma) and has a cytoplasm staining and membrane staining.

Fig. 1C, left-hand half, shows a FACS graph of a normal tonsil lymphocyte cell suspension. The cell size is in each case plotted on the x-axis, the cell granularity on the y-axis. R1 and R2 denote two cell populations, and according to general experience, the lymphocytes at rest are in R1, while the activated lymphocytes are in R2. An idea of this is conveyed by the inserted inner picture of the centrifuged cell suspension preparation which was stained with Wue-1. In this picture, small positive cells which correspond to the lymphoplasmacytoid plasma cells (arrow) and occur in R1 as well as large plasma cells of the Marschalko type from R2 can be seen.

In the right-hand half of Fig. 1C, four histograms can be seen, where the staining intensity is plotted on the x-axis and the cell number on the y-axis. The upper two histograms show the Wue-1 positive cells from R1. On the left-hand side top/bottom, the cells were additionally stained against light chain kappa and lambda antigens, on the right hand side top/bottom against the surface antigen CD54. A staining against an irrelevant antigen was superimposed on the pictures as a so-called isotype control, in order to show the extent of unspecific background staining. It is striking that lymphoplasmacytic cells (upper row) differ from mature plasma cells (lower row) in respect of the expression of light chains and CD54, as mature plasma cells do not express either one compared to the isotype control.

Fig. 1D shows a Western blot, in which a plasma cell line (NCI-H929) served as an antigen source. A positive band resulted at about 94 kD (Fig. 1D), that is to say the antigen labeled by Wue-1 has an apparent molecular weight of 94 kD.

Legend of Fig. 2 (videoprint)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

In all partial pictures a to h of Fig. 2, the specific binding pattern which is selective for plasma cells is described on the basis of human tonsils. A Cy3-fluorochrome conjugated Wue-1 mAB (red staining) with an optional choice of other defined antigens (green staining) is used as assay technique with double immunofluorescence, wherein an overlapping staining signal then appears yellow (color sum of green and red). Immunostaining was carried out according to current and generally used methods (for details see the relevant literature such as Janeway, Immunologie, Spektrum-Verlag, 1995). In summary, staining is first carried out indirectly with the unconjugated antibody (here: the antigens shown in green) and this antibody is then represented with a second secondary antibody labeled with green fluorescence. In a next step, all free valences of the secondary antibody are blocked with mouse serum, in order that Wue-1 should not be able to bind thereto unspecifically. Finally, staining is carried out with the second specificity (here: red-labeled Wue-1). Several specificity and sensitivity controls are conducted in parallel to each batch and indicate the dyeing behavior of the tissue while omitting the corresponding individual steps.

Fig. 2a shows double staining of Wue-1 (red) with CD44 (green). The germinal center of a lymphatic follicle can be seen in the illustration only vaguely and is therefore identified by a star. CD 44 labels mature B-cells (near the germinal center) and plasma cells (remote from the germinal center), with only the overlapping spectrum of the population remote from the germinal center being striking in double staining. An arrow marks individual plasma cells which are located in the germinal center but are typically CD44-negative.

In Fig. 2b, this finding is again especially emphasized. Here, a germinal center was selectively depicted. The cells which are outside the G0 phase (represented by Ki-67-positivity) and therefore proliferate, which is characteristic of germinal centers in lymphatic tissue, are labeled in green. Wue-1 positive cells are differentiated and no longer proliferate. Consequently, no double staining can be seen.

In Fig. 2c, a delimitation from another important cell population in the lymphatic tissue was carried out by means of CD3 staining. Consequently, in the tonsil, Wue-1 cells border on the T-cell outer zone (typical localization for plasma cells) but are negative for the Pan-T-cell marker.

In Fig. 2d, double staining with a known plasma cell antibody VS-38 which, however, only recognizes cytoplasmic antigens was carried out. Hence, there is high overlap and almost complete yellow staining. Moreover, individual cells are recognized by VS-38 and could be described as T-cells, which is a fact showing that VS-38 has a lower specificity for Wue-1.

Fig. 2e shows a staining which marks the tonsil surface in green (epithelium marker cytokeratin 8). This also shows that Wue-1 does not possess any cross reactivity, not even in the case of cells which characteristically migrate into the epithelium.

In Fig. 2f, co-expression with a functionally important antigen CD95 (FAS) was examined. Data regarding plasma cell expression have not been published so far.

In Fig. 2g, a combination of Wue-1 and an antibody 4D12 which recognizes the marginal zone B-cells, that is to say those cells which represent the direct precursors of plasma cells, was chosen. Consequently, double-labeled cells, which characterize transition, can also be seen apart from the corresponding individual staining.

In Fig. 2h, by contrast, double staining with CD23 was carried out, which appears on germinal center cells and immature B cells (so-called peripheral zone cells). The germinal center structures and peripheral zone structures of a lymphatic follicle are marked in green and there is a strip of unlabeled cells (T cell zone see Fig. 2c and marginal zone see Fig. 2g) and a Wue-1 positive outer zone.

The fact that Wue-1 specifically recognizes plasma cells has been shown in numerous tests both morphologically and immunohistochemically by means of multiple stainings (Figs. 1A and 2 (videoprint)). In particular, the specificity and property of Wue-1 of binding to the membrane surface of normal and malignant plasma cells makes Wue-1 a valuable immunological tool, because Wue-1 can conversely also be coupled to carrier or messenger substances and can then bring diagnostic or therapeutic substances to the plasma cell both in vitro and in vivo, which is ensured by its ability to bind to the cell membrane of the plasma cells. Moreover, Wue-1 can be used therapeutically as a filter outside the body (so-called purging), in which the blood or bone marrow of a plasmacytoma patient is freed from its tumor cells during a bone marrow transplantation.

Example 2: Wue-1 is highly specific for healthy and malignant plasma cells

The first step towards an antibody-based treatment of plasma cell malignancies (plasmacytoma / multiple myeloma) was to establish a monoclonal antibody specifically directed to plasma cells. Such an antibody was described above, Wue-1. A further characterization of Wue-1 was performed to determine the binding characteristics of Wue-1 to lymphatic tissue. Human tonsil tissue was chosen for double-stainings with Wue-1 and a set of tissue markers. Wue-1 (DSM ACC2441) was used as described in the examples above.

Briefly, immunohistochemical stainings were performed on 4 micrometer cryostat sections of fresh frozen surgical specimen. Special attention was given to those organs known to be populated by plasma cells, i.e. bone marrow, lymph nodes, thymuses and tonsils. Furthermore, cytopsin preparations of normal peripheral blood lymphocytes, secondary lymphoid tissues and lymphoma cell suspensions, and myeloma/plasmacytoma cell lines were subjected to immunocyto-chemical testing. For double staining on cryostat sections bound biotin-labeled antibodies were detected using Cy3-streptavidin (Dianova, Germany) as described (Greiner (1994) Lab Invest 70:572-578). The immunoperoxidase method was applied using a three-step incubation procedure with diluted purified monoclonal antibody Wue-1

and the isotype control as described in detail elsewhere (Marx (1992) *Lancet* 339:707-708). Biopsy tissues were kept at -70°C as snap-frozen blocks until fresh sections were prepared at the time of experiments. Monoclonal antibodies used for indirect stainings were CD22, CD23, Ki67, CD10, bcl-2 (all DAKO), 4D12 (Smith (1990) *Clin Exp Immunol* 82:181-187), VS38 (1994) *J Clin Pathol* 47:418-422). Flow cytometric analysis was performed on a FACScan® (Becton Dickinson) with an Argon ion laser tuned at 488nm using LYSIS II for data acquisition and analysis using triple immunostaining with directly conjugated monoclonal antibodies (CD19 HD 37, Sigma; CD3 UCHT-1, Sigma; CD14; Leu-M3, Becton Dickinson; CD54, 84M10, Immunotech; APO-1, Behrmann (1994) *Eur J Immunol* 24:3057-3062); CD66L, DREG 56, Dianova; CD40, mAb89 Banchereau (1991) *Nature* 353:678-679; CD38, AT 13/5, Serotec). Wue-1 was used either directly conjugated with FITC or as biotinylated antibody detected with streptavidin-Phycoerythrin (PE, Sigma). Instrument set-up samples included an un-stained sample, and samples stained with CD19-FITC, CD19-PE and CD19-QR. The instrument set-up was standardized using CD19+ B lymphocytes from normal tonsils as reference by gating on the fluorescence intensity of CD19 lymphocytes followed by adjustment of the light scattering detectors to locate the B cells in a standard position in the correlative display of forward and sideward light scattering. The fluorescence detectors were adjusted using a tight light scattering gate as obtained from the light scattering of the CD19+ lymphocytes, followed by adjustment of the three fluorescence detectors of an unstained sample. Each measurement contained 20.000 cells. Dead cell discrimination was performed with 7-amino-actinomycin D (7-AAD, Calbiochem, Germany) in combination with dual color immunofluorescence as described elsewhere (Schmid (1992) *Cytometry* 13:204-206).

Analysis of the germinal centers showed that Wue-1 labeling showed strong colocalization with cytoplasmic Ig, surface Ig, Ig isotypes IgM>>IgG>IgA, CD38, VS38, HLA-DR, weak staining could be observed with B cell markers CD19, CD22, CD40; 4D12 (B cells of the marginal zone), CD136, CD95, no staining was with CD23, CD44, CD3 (T cell), CD14 (macrophage), Ki67, CD66L, CD54, CD10, bcl-2, bcl-6, cytokeratin 8, CD68 (macrophage). Differences in the paracortex staining versus the germinal center staining was the absence of surface Ig staining, no

CD19, CD22, CD40, CD95, HLA-DR; strong staining was observed with CD136, CD44, CD54, and weak staining with bcl2; all other markers remained unchanged between germinal centers and paracortex. These findings were verified with other lymphatic tissue and bone marrow (data not shown). Furthermore Wue-1 did not cross-react with peripheral blood, liver, heart, muscle, skin, bladder, ovary, testis and the central nervous system, but showed weak staining of secretory epithelia of the gastrointestinal tissues. These results underlined the selective labeling properties of Wue-1.

The ability of Wue-1 to differentiate specific lymphoma subtypes was determined by a number of patient samples analysed as described above. Wue-1 proved to be highly specific for plasma cell malignancies (plasmacytoma/myeloma) and cross-reacting only with immunocytoma. Lymphoma subtypes were classified according to the revised European-American (REAL) classification. Positive staining was observed on 11 of 11 plasmacytoma/myeloma samples; 13 of 13 MALT (mucosa-associated lymphoid tissue)-type lymphoma with plasma cell differentiation but non without plasma cell differentiation (0 of 19). 5 of 6 immunocytoma were Wue-1 positive and 1 of 13 diffuse large cell lymphoma, whereas no staining was observed on follicular center lymphoma (0 of 23), mantle cell lymphoma (0 of 10), Burkitt's lymphoma (0 of 5), B cell lymphocytic leukemia (0 of 5), peripheral T cell lymphoma (0 of 7), angio-immunoblastic lymphoma (0 of 9) and Hodgkin's disease (0 of 13). This highly selective recognition of plasmacytoma/myeloma was not observed with any previously described antibody.

Example 3: Wue-1 is suitable for a highly selective antibody-based elimination of plasma cells

Based on this selective recognition of plasma cells by Wue-1 it is obvious to the person skilled in the art, that such an antibody would be suitable to use in the targeted elimination of malignant plasma cells (plasmacytoma / myeloma). Typical mechanisms used for the antibody-mediated elimination of target cells are targeted delivery of radioactivity (radioimmunoconjugates, DeNardo (1999) Current Opinion in Immunology 11, 563-569), targeted delivery of toxins (immunotoxins, Kreitman

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

47

(1999) *Current Opinion in Immunology* 11, 570-578), or antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC). ADCC can be mediated by Fc-gamma receptor bearing cells (monocytes, macrophages, granulocytes), natural killer cells or T cells. Effector domains connected to the variable domains of an antibody can be the Fc domain, as in a normal monoclonal antibody, or domains that interact with other surface antigens on effector cells.

One promising variant of antibody-based strategies is the bispecific antibody approach by joining two antigen-binding sites of different specificity in one antibody molecule, in order to redirect effector cells to the pre-defined tumor target. Though bispecific antibodies are extremely efficient in recruiting cytotoxic effector cells against tumor cells *in vitro* and *in vivo* (Staerz and Bevan (1986). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83, 1453-1457; Lanzavecchia and Scheidegger (1987) *Eur. J. Immunol.* 17, 105-111.; Kroesen (1995) *Cancer Res.* 55, 4409-4415; Kroesen (1995) *J. Hematother.* 4, 409-414; Kroesen (1993) *Cancer Immunol. Immunother.* 37, 400-407), larger randomized clinical trials proving clinical efficacy are still lacking. The main reason why these promising antibody constructs are dramatically lagging behind intact antibodies in clinical testing, lies in the difficulties to produce sufficient amounts of clinical grade material. Until recently, the production and purification process has been extremely inefficient, with low yields regardless of whether the hybrid-hybridoma approach, chemical linkage or renaturation from bacterial inclusion bodies of recombinant Fab or Fv fragment, was followed. In addition, nearly all of these products are plagued by contamination with ill-defined by-products (Staerz and Bevan, 1986; Lanzavecchia and Scheidegger, 1987; Mallender (1994) *Biochemistry* 33, 10100-10108; Gruber (1994) *J. Immunol.* 152, 5368-5374). As previously shown with two different (17-1A \times CD3 and CD19 \times CD3) antibodies, these handicaps can be overcome by the development of a molecular format linking four variable as described in Mack (1995). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 7021-7025 and Loeffler (2000) *Blood* 15, 2098-2103. The resulting recombinant 80 kD molecule produced by mammalian cells is secreted at a high yield in a fully active form that requires no further renaturation.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

48

The variable regions of the Wue-1 monoclonal antibody were cloned using standard PCR-based procedures as described above and the single chain bispecific antibody was assembled from the Wue-1 variable light and heavy chain into a single-chain antibody and combined with the anti-CD3 single-chain Fv portion of the 17-1A_xCD3 antibody via a short peptide linker as described in Mack (1995). The bispecific molecule was designated Wue-1xCD3. Briefly, primers were selected from the 5' and 3'-end of the coding sequences of the Wue-1 variable regions and were designed to introduce a BsrG1 restriction site at the 5' end of Wue-1-VL, a BspE1 restriction site at the 3' end of Wue-1-VH, and a synthetic (Gly₄Ser₃) linker with an internal BspE1 restriction site. Primers were Wue-LC-F: 5'-CTACAGGTGTACACTCCGATATCGTGATGACCCAACTCC-3'; SEQ ID NO: 17, Wue-1-LC-R: 5'-TCCTCCTCCGGAGCCGCCGCCGAGCAGAACCCACCACCACCCCGTTTGATTCCAGCTTGGTGCC-3'; SEQ ID NO: 18, Wue-1-HC-F: 5'-GGCGGCTCCGGAGGAGGATCTC-AGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGG-3'; SEQ ID NO: 19, and Wue-1-HC-R: 5'-CCACCACCTCCGGAGGAGACTGTGAGGGTGGTGCC-3'; SEQ ID NO: 20. Wue-1xCD3 was designed such that the Flag epitope of the 17-1A_xCD3 was eliminated. The Wue-1xCD3 bispecific single chain construct into CHO-K1 cells and stable clones were selected using the selection marker dihydrofolate reductase (DHFR). DHFR was linked to the Wue-1xCD3 transcript via an internal ribosomal entry sequence and both expression units were driven by the same EF α -Promotor (Mack (1995)).

The resulting Wue-1xCD3 construct comprised the following nucleotide sequence (SEQ ID NO: 21)

```
GAATTCACCA TGGGATGGAG CTGTATCATC CTCTTCTTGG TAGCAACAGC
TACAGGTGTA CACTCCGATA TCGTGATGAC CCAAACCTCCA CTCACTTTGT
CGGTTACCAT TGGACAACCA GCCTCCCTCT CTTGCAAGTC AAGTCAGAGC
CTCTTAGATA GTGATGGAAA GACATATTTG AATTGGTTGT TACAGAGGCC
AGGCCAGTCT CCAAAGCGCC TAATCTCTCT GGTGTCTAAA TTGGACTCTG
GAGTCCCTGA CAGATTCACT GGCAGTGGAT CAGGGACAGA TTTCACACTG
AAAATCAGCA GAGTGGAGGC TGAGGATTTG GGAGTCTATT ATTGCTGGCA
AGGTACACAT CTCCGTGGA CATTGGGTGG AGGCACCAAG CTGAAATCA
AACGGGGTGG TGGTGGTTCT GCGGCGGCG GCTCCGGAGG
```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

49

AGGAGGATCT CAGGTGCAGC TGCAGCAGTC TGGACCTGAG CTAGTGAAGA
 CTGGGGCTTC AGTGAAGATA TCTTGTAAAG GTTCTGGTTA CTCATTCACT
 GGTTACTACA TGCAGTGGGT CAAGCAGAGC CATGGAAAGA GGCTTGAGTG
 GATTGGATAT ATTAGTGGTT ATAATGGTGA TACTAGGTAT AATCAGAAGT
 TCAGGGGCAA GGCCACATTT ATTGTAGACA TATCCTCCAG GACAGCCTAC
 ATGCAGTTCA ACAGCCTGAC ATCTGAAGAC TCTGCGGTCT ATTACTGTGC
 AAGAGGGGGT TACTACGGCT ACGTGGACTA CTGGGGCCAA GGCACCACCC
 TCACAGTCTC CTCCGGAGGT GGTGGATCCG ATATCAAAT GCAGCAGTCA
 GGGGCTGAAC TGGCAAGACC TGGGGCCTCA GTGAAGATGT CCTGCAAGAC
 TTCTGGTAC ACCTTTACTA GGTACACGAT GCACTGGGTA AAACAGAGGC
 CTGGACAGGG TCTGGAATGG ATTGGATACA TTAATCCTAG CCGTGGTTAT
 ACTAATTACA ATCAGAAGTT CAAGGACAAG GCCACATTGA CTACAGACAA
 ATCCTCCAGC ACAGCCTACA TGCAACTGAG CAGCCTGACA TCTGAGGACT
 CTGCAGTCTA TTAATGTGCA AGATATTATG ATGATCATTG CTGCCCTGAC
 TACTGGGGCC AAGGCACCAC TCTCACAGTC TCCTCAGTCG AAGGTGGAAG
 TGGAGGTTCT GGTGGAAGTG GAGGTTGAGG TGGAGTCGAC GACATTCAGC
 TGACCCAGTC TCCAGCAATC ATGTCTGCAT CTCCAGGGGA GAAGGTCACC
 ATGACCTGCA GAGCCAGTTC AAGTGTAAAG TACATGAACT GGTACCAGCA
 GAAGTCAGGC ACCTCCCCA AAAGATGGAT TTATGACACA TCCAAAGTGG
 CTTCTGGAGT CCCTTATCGC TTCAGTGGCA GTGGGTCTGG GACCTCATA
 TCTCTACAA TCAGCAGCAT GGAGGCTGAA GATGCTGCCA CTTATTACTG
 CCAACAGTGG AGTAGTAACC CGCTCACGTT CGGTGCTGGG ACCAAGCTGG
 AGCTGAAACA TCATCACCAT CATCATTAGT CGAC

and the following amino acid sequence (SEQ ID NO: 22)

DIVMTQTPLT LSVTIGQPAS LSCKSSQSLL DSDGKTYLNW LLQRPGQSPK
 RLISLVSKLD SGVPDRFTGS GSGTDFLKI SRVEAEDLGV YYCWQGTHLP
 WTFGGGKLE IKRGGGGSGG GSGGGGSQV QLQQSGPELV KTGASVKISC
 KSGYSFSGY YMHVVKQSHG KRLEWIGYIS GYNGDTRYNQ KFRGKATFIV
 DISSRTAYMQ FNSLTSEDSA VYVCARGGYY GYVDYWGQGT TLTVSSGGGG
 SDIKLQQSGA ELARPGASVK MSCKTSGYTF TRYTMHWVKQ RFGQGLEWIG
 YINPSRGTYN YNQKFKDKAT LTDDKSSSTA YMQLSSLTSE DSAVYYCARY

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

50

YDDHYCLDYW QGGTTLTVSS VEGGSGGSGG SGGSGGVDDI QLTQSPAIMS
ASPGKVTMT CRASSSVSYM NWYQQKSGTS PKRWIYDTSK VASGVPYRFS
GSGSGTSYSL TISSMEAEDA ATYYCQQWSS NPLTFGAGTK LELKHHHHHH

Transfected CHO cells were cultivated in serum-free medium and Wue-1xCD3 was harvested from the supernatant. Wue-1xCD3 was purified from the supernatant in a three step purification, starting with cation exchange chromatography, followed by immobilized metal affinity chromatography (IMAC) and gel filtration. The purity of the isolated protein was >95% as determined by SDS-PAGE (not shown). Under the conditions applied, the molecule appears in its monomeric form about 54 kD. The final yield of purified protein was ca. 2.5 mg / 1 cell culture supernatant. All chromatography steps were performed on a Äkta FPLC System (Pharmacia). All chemicals were of research grade and purchased from Sigma (Deisenhofen) or Merck (Darmstadt).

A bispecific Wue-1 antibody mediates efficient antibody-dependent mediated cellular cytotoxicity in patient samples

Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were generated by Ficoll (Seromed/Biochrom, Germany) density gradient centrifugation and stimulated with PHA (1µg/ml) and IL-2 (60U/ml). PBMC were cultured with RPMI, 20% FCS (Seromed/Biochrom, Germany), penicillin/streptomycin and pyruvate (both Life Technologies, Germany). Patient cells were taken from routine diagnostic specimen after informed consent of the patients and approval by the local ethics committee. Preparation of primary myeloma cells was according to standard procedures. Briefly, mononuclear cells from bone marrow aspirates of multiple myeloma patients were separated by Ficoll density gradient centrifugation and incubated for 15 min with anti-CD138 coated magnetic beads (Miltenyi Biotec, Germany) at 4°C. Separation of CD138+ cells was carried out in a MACS device (Miltenyi Biotec, Germany) according to the manufacturer's instructions. After purification 70-80% of the cells were CD138+ (data not shown). Patient cells were taken from routine diagnostic specimen after informed consent of the patients and approval by the local ethics committee. Antibody-mediated cellular cytotoxicity (ADCC) was determined by flow-cytometry. Enriched multiple myeloma cells were labelled with the PKH-26 dye

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

51

(Sigma) according to the manufacturers instructions and cultured with PBMCs, antibody and 2ng/ml IL-6 (PeproTech, Germany). Upon the according incubation time cells were washed with PBS and stained with Propidiumiodine (PI) (2.5µg/ml). Analysis was performed on a "FacsCalibur" flow cytometer using the "Cell-Quest" software (both Becton Dickinson, Germany). The fraction of living myeloma cells were positive for the PKH-26 dye (measured in FL-2) and negative for PI measured in FL-3). Dead multiple myeloma cells were positive for both, PKH-26 and PI. PBMCs were negative for PKH-26. Specific cytotoxicity was calculated as $100 \times (1 - (\text{viable multiple myeloma cells in test sample} / \text{number of viable multiple myeloma cells in 17-1AxCD3 control samples}))$. Assay was stopped after 6 days or if medium colour turned from red to yellowish.

As shown in Figures 3 and 4, multiple myeloma samples were incubated with PBMCs pre-stimulated with PHA/IL-2. In 6 experiments it was possible to obtain autologous peripheral blood samples from the bone marrow donors, and 5 experiments were performed using allogeneic PBMCs from healthy donors. No significant difference was found between samples containing autologous or allogeneic PBMCs. Specificity of the kill was controlled by incubation with a bispecific antibody 17-AxCD3 that binds to an epithelial surface antigen not present on plasma cells. Figure three shows a representative experiment displaying PKH-26 staining in the x-axis and propidium iodide in the y-axis. Wue-1xCD3 shows a significant shift of PKH-26 labeled multiple myeloma cells from PI negative to PI positive indicative for cell lysis. Fig 4 shows the specific lysis of multiple myeloma cells as a function of antibody concentration.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

52

Applicant's or agent's file reference E 2915 PCT	International Application No.
---	-------------------------------

INDICATIONS RELATING TO DEPOSITED MICROORGANISM
OR OTHER BIOLOGICAL MATERIAL

(PCT Rule 13b3)

A. The indications made below relate to the deposited microorganism or other biological material referred to in the description, on page <u>11</u> , line <u>2 to 7</u> .	
B. IDENTIFICATION OF DEPOSITOR Further deposits are identified on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
Name of depository institution DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH	
Address of depository institution (including postal code and country) Mascheroder Weg 1b D-38124 Braunschweig DE	
Date of deposit January 4, 2000	Accession Number DSMZ ACC 2441
C. ADDITIONAL INDICATIONS (leave blank if not applicable) This information is continued on an additional sheet <input type="checkbox"/>	
D. DESIGNATED STATES FOR WHICH INDICATIONS ARE MADE (if the indications are not for all designated States)	
EP Applicant makes use of Rule 28(4) EPC	
E. SEPARATE FURNISHING OF INDICATIONS (leave blank if not applicable)	
The indications listed below will be submitted to the International Bureau later (specify the general nature of the indications e.g., "Accession Number of Deposit")	
For receiving Office use only	For International Bureau use only
<input type="checkbox"/> This sheet was received with the international application	<input type="checkbox"/> This sheet was transmitted by the International Bureau on:
Authorized officer	Authorized officer

Form PCT/RO/134 (July 1998)

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

53

Claims

1. An antibody characterized in that the variable region (Fw(L)) of at least one of its light chains (L-chain) has at least one of the following amino acid sequences or a part thereof:

DIVMTQTPLTSLVTIGQPASLSC (FW-1; SEQ ID NO: 1)
 KSSQSLDSDGKTYLN (CDR-1; SEQ ID NO: 2)
 WLLQRPQGSPKRLIS (FW-2; SEQ ID NO: 3)
 LVSKLDS (CDR-2; SEQ ID NO: 4)
 GVPDRFTGSGSGDFTLKISRVEAEDLGVYYC (FW-3; SEQ ID NO: 5)
 WQGHLPWT (CDR-3; SEQ ID NO: 6) and/or
 FGGGTKLEIKR (FW-4; SEQ ID NO: 7)

and/or the variable region (Fw(H)) of at least one of its heavy chains (H-chain) possesses at least one of the following amino acid sequences or a part thereof:

QVQLQQSGPELVKGTGASVKISCKGSGYSFS (FW-1; SEQ ID NO: 8),
 GYYMH (CDR-1; SEQ ID NO: 9)
 WVKQSHGKRWLEWIG (FW-2; SEQ ID NO: 10)
 YISGYNGDTRYNQKFRG (CDR-2; SEQ ID NO: 11)
 KATFIVDISRTAYMQFNLSLSEDSAVYYCAR (FW-3; SEQ ID NO: 12)
 GGYGYVDY (CDR-3; SEQ ID NO: 13) and/or
 WQQGTTLVSS (FW-4; SEQ ID NO: 14).

2. An antibody, characterized in that it is encoded by a gene which contains the following nucleotide sequence or a part thereof for at least one of its light chains (L-chain):

gaagcaogcg tagatatgt gatgaccaa actccactca cttgtcggg taccattgga
 caaccagcct ccctcctg caagcaagt cagagcctct tagatahga tggaaagaca tattgaatt
 gggtgtaca gaggccaggc cagctocaa agcgccaat ctctcggg tctaaattgg actctggagt

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

54

ccctgacaga ttcactggca gtggatcagg gacagattc acactgaaaa tcagcagagt
 ggaggctgag gattgggag tctattatg ctggcaaggt acacatctc cgtggacatt cggggaggc
 accaagctgg aaatcaaacg ggctgagct gggccgctg gatccatct c

and/or which contains the following nucleotide sequences or a part thereof for
 at least one of its heavy chains (H-chain):

cgccatggcc ggggattcc ggccatggcg caggtgcagc tgcagcagtc tggacctgag
 ctagtgaaga ctgggcttc agtgaagata tcttgaagg gttctggta ctcctcagt ggttactaca
 tgcactgggt caagcagagc catggaaga ggctgagtg gattggatat attagtggt etaatggta
 tactaggtat aatcagaagt tcaggggcaa ggcacattt attgtagaca tctcctccag
 gacagcctac atgcagttca acagcctgac atctgaagac tctgcggtct attactgtgc
 aagaggggt tactacggct acgtggacta ctggggcnaa ggcaccatcc tcacagtcctc
 ctgagccaaa acgacaccca agctgtcta tccactggcc cctgtaatc actgtcggc cggcg

3. The antibody of claims 1 or 2, characterized in that it is an immunoglobulin G.
4. The antibody of any one of claims 1 to 3, characterized in that both light chains and/or both heavy chains have the same amino acid sequence.
5. The antibody of any one of claims 1 to 4 which is produced by the hybridoma cell line DSM ACC 2441.
6. The antibody of any one of claims 1 to 4, characterized in that the antibody is a multifunctional antibody.
7. The antibody of any one of claims 1 to 6, characterized in that it is an antibody conjugate with proteins, such as toxins or cytokines or antibody fragments or enzymes, or with hormones, fluorescent dyes, biotin and/or radioisotopes.
8. The antibody according to anyone of the preceding claims, characterized in that it is a fusion protein with toxins, enzymes, cytokines and/or hormones.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

55

9. A nucleotide sequence coding for an antibody, characterized in that it contains the following nucleotide sequence or a part thereof:

gaagcaogcg taga(alcgt galgacccaa actccactca cttgtcgggt taccaatgga
 caaccagcct ccctctcttg caagtcaagt cagagcctct tagatahlga tggaaagaca tatttgaatt
 ggltgtaca gaggccaggc cagtcctcaa agcgcctaat ctctcgggt tctaaattgg actctggagt
 cctgacaga ttcactggca gtggatcagg gacagattc acaactgaaa tcagcagagt
 ggaggtgag gatttggag tctatttg ctggcaaggt acacatctc cgtggacatt cggtggaggc
 accaagctgg aaatcaaacg ggctgatct ggcgcgctg gatccatct c

and/or the following nucleotide sequence or a part thereof

cgccatggcc ggggattcc ggccatggcg cagggtcagc tgcagcagtc tggacctgag
 ctatgaaga ctgggcttc agtgaagata tctgtaagg gtctggta ctcatcagt ggltactaca
 tgcactgggt caagcagagc catggaaaga ggcttgagtg gattggatat attagtgggt afaatggfga
 tactaggtat aatcagaagt icaggggcaa ggccacatt atgtagaca tatctccag
 gacagctac atgcagttca acagcctgac atctgaagac tctgcggtct attactgtgc
 aagaggggggt tactacggct acgtggacta ctggggccea ggcaaccaac icacagctctc
 ctacgcaaaa acgacacca agctgtcta tccactggcc cctgtaatc actgtcggc cgccg

10. A nucleotide sequence encoding at least a variable region of an antibody as defined in any one of claims 1 to 9.
11. A vector comprising the nucleotide sequence of claim 9 or 10, wherein said vector comprises, optionally, in combination with the nucleotide sequence of claim 10 the variable region of the other immunoglobulin chain of said antibody.
12. A host cell comprising a nucleotide sequence of claim 9 or 10 or comprising the vector of claim 11.
13. A continuous, stable antibody-producing cell line which is capable of producing an antibody as defined in any one of claims 1 to 10.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

56

14. The cell line of claim 13, wherein said cell line is a hybridoma cell line, preferably the hybridoma cell line having the deposit number DSM ACC 2441.
15. A method for preparing an antibody directed against plasma cells, characterized in that an animal is immunized with B-cells of the plasma cell differentiation line up to and including the lymphoplasmacytoid cell stage and the prepared antibody is isolated in a conventional manner from the blood of the animal.
16. A method for preparing an antibody capable of recognizing plasma cells or a functional fragment or derivative thereof comprising
 - (a) culturing the cell of claim 12, 13 or 14; and
 - (b) isolating said antibody, functional fragment or an immunoglobulin chain(s) thereof from the culture.
17. An antigen, characterized in that it binds to and/or is recognized by an antibody according to any one of claims 1 to 8.
18. The antigen of claim 17, characterized in that it is presented by human plasma cells on their surface and has a molecular weight of about 94 kD or of about 55 kD.
19. An epitope of the antigen of claim 18.
20. An antibody, characterized in that it binds and/or recognizes an antigen or an epitope according to any one of claims 17 to 19.
21. A nucleotide sequence encoding at least one variable region of the antibody of claim 20.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

57

22. An antibody, fragment or derivative thereof or an immunoglobulin chain encoded by the nucleotide sequence of claim 10, 11 or 21 or obtainable by the method of claim 15 or 16.
23. A method for preparing an antibody directed against plasma cells, characterized in that an animal is immunized with an antigen or an epitope of any one of claims 17 or 19 and the antibody formed is isolated from the blood of the animal in a conventional manner.
24. The method for preparing antibodies of claims 15 or 16, characterized in that the cells of the immunized animal are used to produce a cell line in a conventional manner which produces this antibody as a monoclonal antibody, in that this cell line is cultured and the antibody produced is isolated.
25. The use of an antibody of any one of claims 1 to 9, 20 or 22 for identifying the corresponding antigen.
26. The use of an antibody of any one of claims 1 to 9, 20 or 22 for specifically labeling plasma cells.
27. The use of an antibody of any one of claims 1 to 9, 20 or 22 for the subsequent preparation of additional antibodies which label plasma cells.
28. A single-chain multifunctional polypeptide comprising
 - (a) a first domain comprising a binding side of an antibody or an immunoglobulin as defined in any one of claims 1 to 9, 20 or 22; and
 - (b) a second domain comprising a binding side of an immunoglobulin chain or an antibody specifically recognizing the CD3 antigen.
29. The polypeptide of claim 28, wherein said domains are connected by a polypeptide linker.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

58

30. The polypeptide of claim 28 or 29, wherein said first and/or said second domain mimic or correspond to a V_H and a V_L region from a natural antibody.
31. The polypeptide of any one of claims 28 to 30, wherein said antibody is a monoclonal antibody, a synthetic antibody, a chimeric antibody or a humanized antibody.
32. The polypeptide of any one of claims 28 to 31, wherein said domain is a single-chain fragment of the variable region of the antibody.
33. The polypeptide of any one of claims 28 to 32 that is a bispecific single-chain antibody.
34. The polypeptide of any one of claims 28 to 33 encoded by the nucleic acid molecule as depicted in SEQ ID NO: 21.
35. The polypeptide of any one of claims 28 to 33 comprising the amino acid sequence as depicted in SEQ ID NO: 22.
36. A polynucleotide which upon expression encodes a polypeptide of any one of claims 28 to 35.
37. A vector comprising the polypeptide of claim 36.
38. A cell transfected with the polynucleotide of claim 36 or the vector of claim 37.
39. A composition comprising the antibody of any one of claims 1 to 9, 20 or 22 or a functional fragment or derivative thereof, the multifunctional polypeptide of any one of claims 28 to 35, the nucleotide sequence/polynucleotide of any one of claims 10, 11, 21 or 36, the vector of claim 37, the cell of claim 12 or 38.
40. The composition of claim 39 which is a pharmaceutical composition optionally further comprising a pharmaceutically acceptable carrier.

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

41. The composition of claim 39 which is a diagnostic composition optionally further comprising suitable means of detection.
42. The use of an antibody of any one of claims 1 to 9, 20 or 22, the multifunctional polypeptide of any one of claims 28 to 35, the nucleotide sequence/polynucleotide of any one of claims 10, 11, 21 or 36, the vector of claim 37, the cell of claim 12 or 38 for treating autoimmune diseases and/or tumors, for instance multiple myelomas, lymphomas and/or plasmocytomas.
43. The use of an antibody of any one of claims 1 to 9, 20 or 22, the multifunctional polypeptide of any one of claims 28 to 35, the nucleotide sequence/polynucleotide of any one of claims 10, 11, 21 or 36, the vector of claim 37, the cell of claim 12 or 38 for preparing a pharmaceutical for the treatment of autoimmune diseases, tumors, for instance multiple myelomas and/or lymphomas.
44. A kit comprising the antibody of any one of claims 1 to 9, 20 or 22, or a functional fragment or derivative thereof, the antigen of claim 17 or 18, the epitope of claim 19, the multifunctional polypeptide of any one of claims 28 to 35, the nucleotide sequence/polynucleotide of any one of claims 10, 11, 21 or 36, the vector of claim 37, the cell of claim 12 or 38.

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

1/6

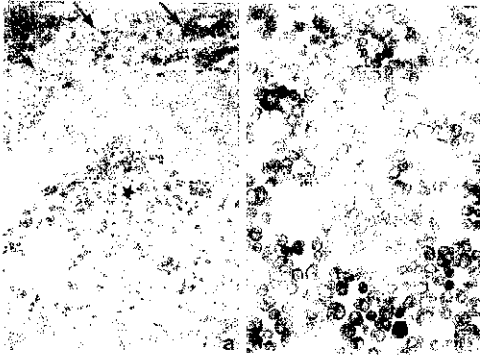


Fig. 1a

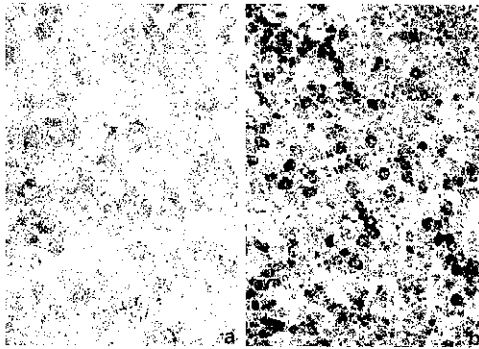
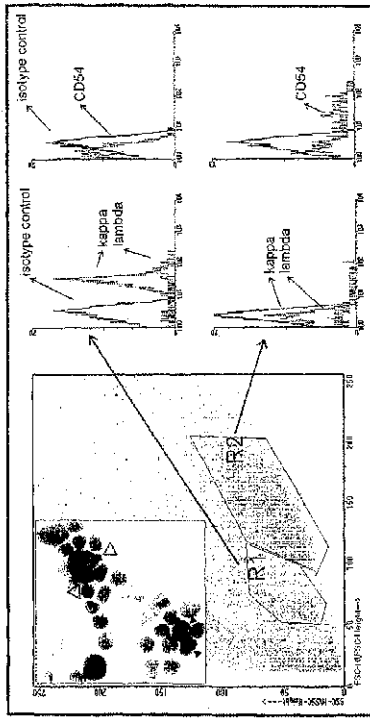


Fig. 1b

Fig. 1c

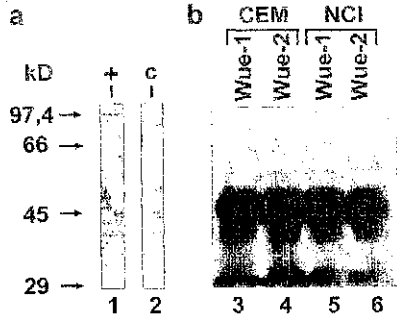


WO 01/47953

PCT/EP00/13238

3/6

Fig. 1d



WO 01/47953

PCT/EP00/13238

4/6

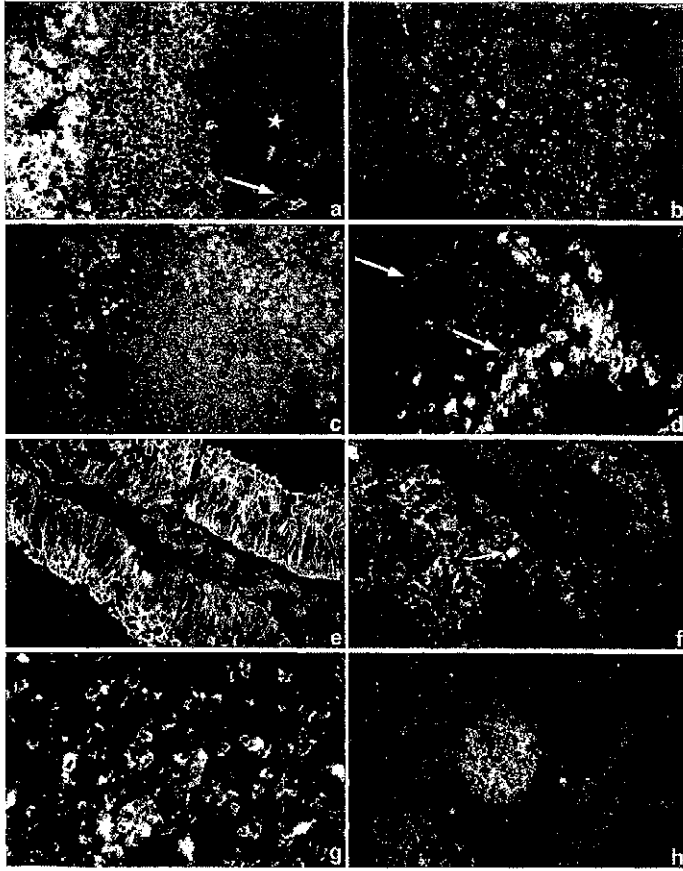
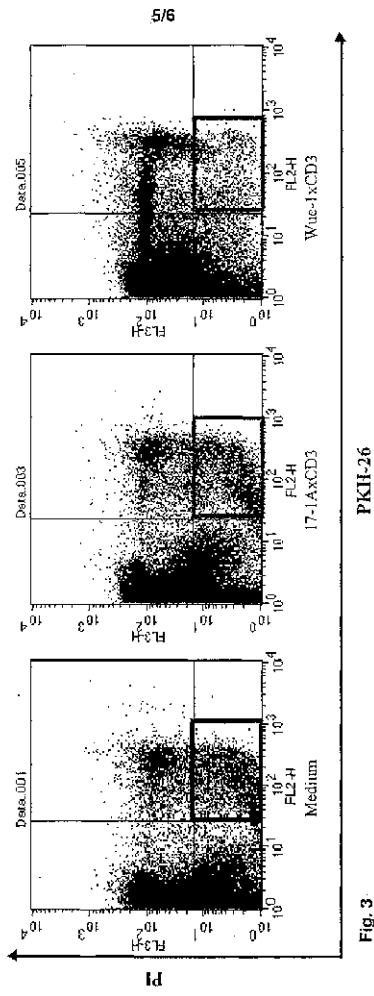


Fig. 2

WO 01/47953

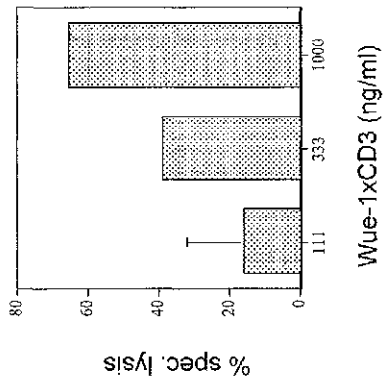
PCT/EP00/13238



WO 01/47953

PCT/EP00/13238

6/6
Fig. 4



WO 01/47953

PCT/EP00/13238

1/7
SEQUENCE LISTING

<110> Prof. Dr. Müller-Hermelink, Hans Konrad
Dr. Greiner, Axel

<120> Antibodies against plasma cells

<130> B 2915 DCT

<140> DE 199 62 583.2

<141> 1999-12-23

<160> 22

<170> PatentIn Var. 2.1

<210> 1
<211> 23
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 1
Asp Leu Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Leu Ser Cys
20

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 2
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 3
<211> 15
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 3
Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile Ser
1 5 10 15

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 4
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

2/7

<210> 5
<211> 32
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 5
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 6
Trp Gln Gly Thr His Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 7
<211> 11
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 7
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Met Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 8
<211> 30
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 8
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser
20 25 30

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

3/7

Gly Tyr Tyr Met His
1 5

<210> 10
<211> 14
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 10
Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile Gly
1 10

<210> 11
<211> 17
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 11
Tyr Ile Ser Gly Tyr Asn Gly Asp Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe Arg
1 15 15

Gly

<210> 12
<211> 32
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 12
Lys Ala Thr Phe Ile Val Asp Ile Ser Ser Arg Thr Ala Tyr Met Gln
1 10 15

Phe Asn Ser Ileu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> hybrid

<400> 13
Gly Gly Tyr Tyr Gly Tyr Val Asp Tyr
1 5

<210> 14
<211> 11
<212> PRT

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

4/7

<213> hybrid

<400> 14

Pro Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 15

<211> 381

<212> DNA

<213> hybrid

<400> 15

gaagcaagcg tagatattcgt gatgacccaa actccactca otttgtcggg taccattgga 60
caaccagcct cctcctcctg caagccaagt cagagcctct tagatahaga tggaaaagca 120
tatttgaatt ggttcttaca gaggccagcc cagctccaa agcgctaat ctctctggtg 180
tctaaattgg actctggagt cctgacaga ttcactgca ggggacagg cacagatttc 240
acactgaaa tcagcaggt ggagctgag gatttggag tctattattg ctggcaaggc 300
acacatttc cytgacatt cgtggagcc accaagctgg aatcaaacg cgtctgctct 360
ggggccctg gatscatctt c 381

<210> 16

<211> 445

<212> DNA

<213> hybrid

<400> 16

ggcattggc ygggattcc ggcactggc caggtgcagc tgcagcagtc tggactgag 60
cactgaaga ctgggcttc agtgaagata tcttgaagg gttctggta ctactcagt 120
ggtatgaca tgaactggc cagcagagc catggaaga gctctggatg gattggatct 180
attagctgtt acaatggta tactaggtat aatcagaagt tcaggggcaa ggcacattt 240
attgcaaac tctctccag gacggctac atgcaatca acagctgac actgaagac 300
ctggggctt attactgctc aaggggggt tactaaggct ccgctgacta ctgggcaa 360
ggcaccacc tcaagtctc ctccgcaan accaaccac agcttctata tccactggc 420
ctggtaato actgagcgc cggc 445

<210> 17

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin

<400> 17

ctacaggtgt acactcogat atcgtgatga cccaaactcc 40

<210> 18

<211> 63

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

5/7

<400> 18
 tccctccctccg gagccgcccgc cccnagaacc accaccacc ccg'ttggattt ccagcttgggt 60
 ggc 63

<210> 19
 <211> 46
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin

<400> 19
 ggcgctccg gaggaggaga tctnaggtgc aqctgaagca gtctgg 46

<210> 20
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin

<400> 20
 ccaccaccic cggaggagac tctgagggtg gtgcc 35

<210> 21
 <211> 1574
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence: synthetic, no natural origin

<400> 21
 gaattccacca tgggatggag cigtatcabc ctctctctgg tagcaaccgc taacgggtgt 60
 cactccgata tctgtatgac ccacactcca ctcacltltt cggbtaccat tggaccacca 120
 gcctccctct ctgcaagtc aagtcagagc ctcttagata gtgatgaaa gacatatttg 180
 aattggttgt tccagagccc agcccaclct ccaagcggcc taactctctt ggtgtctaaa 240
 ttggactctg gactccctga cagattcact ggcagtggat caggacaga ttcaacactg 300
 aaantcagca gactggagc tgaggatttg ggcgtctatt atgcccggca agytacaca 360
 ctcccgtaga ctttcygtgg agcacaag ctggaaatca aacgggtggc tgggtgtct 420
 ggcggcggcg gctccggagc agcagatct caggtccagc tgcagagtc tggactgag 480
 ctagtgaaga ctgggcttc agtgaagata tcttgaagg gttctgctta ctccctcagt 540
 gyltactaca tgcctgggt caagcagac catgcaaga ggcctgagt gattcgata 600
 attagtggtt ataatgtga tactaggtat aatcagaagt taaggggcaa gccacatt 660
 attgtagaca taccctccg gacagcctac atgcagtca acggcctgac atctgaaga 720
 totggtgt atctctgto aagaggggt tactacggct acgtggacta ctggggcca 780
 ggcaccacc tcacagctc ctccggaggt ggtggatcc alatacaact gaagcagta 840
 gggctgaac tggcagacc tggggcctca gtgagatgt cctgcaagac ctctggtac 900
 accttacta ggtacagat gcactgggla aaacagagc ctgcaaggt tctggaatg 960
 atggatata ttaactctag cctgtgat actaattca atcagaggt caaggacaag 1020
 gccacattg ctacagaca atctccagc acagcctca tgcacctgag cagcctgaca 1080
 tctgagact ctgagctca ttaactgtca agatattat atgactatta ctgooltgc 1140

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

6/7

```

taetggggcc aaggcaccac tctcacagtc tctcagtcg aaggtggaag tggaggttc: 1200
gglygaaagtg gaggttcagg tggagtcgac gacattcagc tgcaccagtc tccagcaatc 1260
atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc atgacctgca gagccagttc aagtgttaagt 1320
tacctgaact ggtaccagca gaagtcaggc aactccccc aaagatggat ttatgacaca 1380
tccaaagtgg ctctgggagt cctctatcgc ttcagtgcca gtgggtctgg gacctcatalc 1440
tctctacaa tcagcagcat ggaggtgaa gatgctgcca ottattaatg ccaacagttg 1500
agtagtaacc cgtcaccgtt cgggtctggg accaagctgg agctgaaaca tcatcaaaa: 1560
cactcattag cgac 1574

```

<210> 22
 <211> 500
 <212> PRT
 <213> Hybrid

```

<400> 22
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
  1           5           10           15
Gln Pro Ala Ser Leu Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
  20           25           30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
  35           40           45
Pro Lys Arg Leu Ile Ser Leu Val Ser Tyr Leu Asp Ser Gly Val Pro
  50           55           60
Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
  65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
  85           90           95
Thr His Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100           105           110
Arg Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser
 115           120           125
Gln Val Gln Ser Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Thr Gly Ala
 130           135           140
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Gly Tyr
 145           150           155           160
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Arg Leu Glu Trp Ile
 165           170           175
Gly Tyr Ile Ser Gly Tyr Asn Gly Asp Thr Arg Tyr Asn Gln Lys Phe
 180           185           190
Arg Gly Lys Ala Thr Phe Ile Val Asp Ile Ser Ser Arg Thr Ala Tyr
 195           200           205
Met Gln Phe Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 210           215           220
Ala Arg Gly Gly Tyr Tyr Gly Tyr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 225           230           235           240

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 01/47953

PCT/EP00/13238

7/7

Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Ser Asp Ile Lys Leu Gln
245 250 255

Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser
260 265 270

Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His Trp Val
275 280 285

Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro
290 295 300

Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr
305 310 315 320

Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser
325 330 335

Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp
340 345 350

Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
355 360 365

Ser Ser Val Glu Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Ser
370 375 380

Gly Gly Val Asp Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser
385 390 395 400

Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser
405 410 415

Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys
420 425 430

Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg
435 440 445

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser
450 455 460

Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser
465 470 475 480

Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys His His
485 490 495

His His His His
500

7

7/7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット(コレクトバージョン)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 July 2001 (05.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/047953 A3

(51) International Patent Classification: C07K 14/00 (74) Agent: VOSSHUS & PARTNER, Schwanstausse 4, 81675 München (DE)

(21) International Application Number: PCT/EP00/13238

(22) International Filing Date:
22 December 2000 (22.12.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
199 62 583.2 23 December 1999 (23.12.1999) DE

(71) Applicants and

(72) Inventors: BÜLLER-HERMELINK, Haas, Konrad
[DE/DE]; Heinrich-Zeuner-Straße 72, 97882 Würzburg
(DE); GHEINER, Axel [DE/DE]; Schloss Homburg,
97855 Trüfens (DE)

(73) Inventors and

(75) Inventors/Applicants (for US only): DÖHREN, Bernd
[DE/DE]; Lyskalle 47, 14055 Berlin (DE); BARGOIL,
Ralf [DE/DE]; Aufwiesenstrasse 38, 13353 Berlin
(DE); KÜFFER, Peter [DE/DE]; Am Kapellenacker 15,
85368 Müssburg (DE)(81) Designated States (internationally): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LY, MA, MD, MG, ME, MN, MW, MX, MY,
NZ, NG, NL, NO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, UZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW(84) Designated States (regionally): AR (PTO patent) (GM,
RD, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, HU,
IT, LI, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

Published:

with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
26 September 2002

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 01/047953 A3

(54) Title: ANTIBODIES AGAINST PLASMA CELLS

(57) Abstract: The present invention relates to a method for producing an antibody to an antibody specifically reacting with plasma cells, to genes which encode such antibodies, to antigens which are labeled by such an antibody, to additional antibodies directed against said antigens and to methods for producing said antibodies and to uses of such antibodies. In addition, the present invention relates to single-chain multifunctional polypeptides comprising (a) a first domain comprising a binding site of the antibodies defined herein and (b) a second domain comprising a binding site of an immunoglobulin chain or an antibody specifically recognizing the CD38 antigen. Furthermore, compositions and kits comprising the compounds of the invention are disclosed. Preferably said compositions are pharmaceutical or diagnostic compositions.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 00/13238
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C07K16/00 C12N15/00		
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) IPC 7 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 used, where practical, search terms used) WPI Data, BIOSIS, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TERSTAPPEN W M M ET AL: "IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PLASMA CELLS IN NORMAL HUMANBONE MARROW BY HIGH-RESOLUTION FLOW CYTOMETRY" BLOOD, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, US, vol. 76, no. 9, 1990, pages 1739-1747, XP001015210 ISSN: 0006-4971 the whole document --- -/--	15, 16, 22, 24
<input checked="" type="checkbox"/>	I further documents are listed in the continuation of box C.	
<input checked="" type="checkbox"/>	Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents:		
<p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*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)</p> <p>*O* document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to underscore the principle or theory underlying the invention</p> <p>*X* document of obvious relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*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</p> <p>*Z* document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search:	Date of making of the international search report	
16 May 2002	24/05/2002	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.O. Box 2010 Patentstr. 2 D-7200 Pflanzheim Tel. (+49-70) 940-2040, Tx. 31 061 epo nl, Fax (+49-70) 940-3010	Authorized officer Panzica, G	

Form PCT/ISA/210 (Second sheet) (1 July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/EP 00/13238

C/(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document with indication where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SILVA RODRIGUES A ET AL: "UTILIDAD DEL FENOTIPO INMUNOLOGICO EN EL DIAGNOSTICO DE LOS SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS CRONICOS CON ESPLENOMEGALIA COMO MANIFESTACION CLINICA DOMINANTE USEFULNESS OF THE IMMUNOLOGIC PHENOTYPE IN THE DIAGNOSIS OF CHRONICLYMPHOPROLIFERATIVE DISEASES WITH SPLENOMEGALY AS THE OUTSTANDING CLINICAL FEA" SANGRE, ASOCIACION ESPANOLA DE HEMATOLOGIA Y HEMATERAPIA,, ES, vol. 35, no. 5, 1990, pages 369-373, XP001015220 ISSN: 0036-4355 the whole document ---	15,16, 22,24
X	MORI T ET AL: "CROSS-REACTIVE ANTIBODIES AGAINST HUMAN CULTURED B CELLS AND BOVINEERYTHROCYTES IN HUMAN RENAL TRANSPLANTATION SERA" TRANSPLANTATION, WILLIAMS AND WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 28, no. 3, September 1979 (1979-09), pages 196-198, XP001015208 ISSN: 0041-1337 the whole document ---	15,16, 22,24
X	BREGNI M ET AL: "B-CELL RESTRICTED SAPORIN IMMUNOTOXINS: ACTIVITY AGAINST B-CELL LINES AND CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA CELLS" BLOOD, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, US, vol. 73, no. 3, 1989, pages 753-762, XP001015240 ISSN: 0006-4971 the whole document ---	15,16, 22,24
X	SIDORENKO S P ET AL: "MONOCLONAL ANTIBODIES OF IPO SERIES AGAINST B CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS IN LEUKEMIA AND LYMPHOMA IMMUNOPHENOTYPING" NEOPLASMA, VEDA, PUBLISHING HOUSE OF SLOVAK ACADEMY OF, CS, vol. 39, no. 1, 1992, pages 3-9, XP001015222 ISSN: 0028-2685 the whole document --- ---	15,16, 22,24

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No. PCT/EP 00/13238
C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indications, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ROBINSON D S F ET AL: "NORMAL COUNTERPARTS OF HAIRY CELLS AND B-PROLYMPHOCYTES IN THE PERIPHERAL BLOOD. AN ULTRASTRUCTURAL STUDY WITH MONOCLONAL ANTIBODIES AND THE IMMUNOGOLD METHOD" LEUKEMIA RESEARCH, NEW YORK, NY, US, vol. 9, no. 3, 1985, pages 335-348, XP001015276 ISSN: 0145-2126 the whole document	15, 16, 22, 24
X	ALEJANDRO R ET AL: "A GANGLIOSIDE ANTIGEN ON THE RAT PANCREATIC B CELL SURFACE IDENTIFIED BY MONOCLONAL ANTIBODY R2D6" JOURNAL OF CLINICAL INVESTIGATION, NEW YORK, NY, US, vol. 74, no. 1, 1984, pages 25-38, XP001015221 ISSN: 0021-9738 the whole document	15, 16, 22, 24
X	MEZGER J ET AL: "A PITFALL IN IMMUNOCYTOCHEMISTRY: NON-SPECIFIC STAINING OF PLASMACYTOID CELLS WITH IMMUNOGALKALINE PHOSPHATASE TECHNIQUES" JOURNAL OF TUMOR MARKER ONCOLOGY, LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 3, no. 1, 1988, pages 107-115, XP001015225 ISSN: 0886-3849 the whole document	14, 16, 22, 24
X	WO 99 51743 A (ADACHI HIDEKI ; SATO KOH (JP); YABUTA NAOHIRO (JP); CHUGAI PHARMACE) 14 October 1999 (1999-10-14) abstract claims 1,5 figure 18 page 275 page 283 -page 284	1-4, 6-14, 16, 22, 24-33, 39-44
A	EP 0 378 175 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 18 July 1990 (1990-07-18) abstract figures 1-10	1-4, 6-14, 16, 22, 24-33, 39-44
	-/--	

From PCT/ISA(210) (continued on second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No
 PCT/EP 00/13238

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Description of document, with indications where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X, P	WO 00 23593 A (FRAUNHOFER GES FORSCHUNG) 27 April 2000 (2000-04-27) abstract example 6 figure 23A ---	1-4, 6-14, 16, 22, 24-33, 39-44
X	WO 99 28349 A (KELER TIBOR ;MEDAREX INC (US); DEO YASHWANT M (US); GOLOSTEIN JOEL) 10 June 1999 (1999-06-10) abstract example 6 figures 10A-E ---	1-4, 6-14, 16, 22, 24-33, 39-44
A	WO 96 23071 A (GILLILAND LISA K ;HOLLENBAUGH DIANE (US); SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 1 August 1996 (1996-08-01) abstract figure 7B claim 95 ---	1-4, 6-14, 16, 22, 24-33, 39-44
A	WO 98 18825 A (DEBUSSCHE LAURENT ;BRACCO LAURENT (FR); RHONE POULENC RORER SA (FR) 7 May 1998 (1998-05-07) abstract page 31 claim 5 ---	1-4, 6-14, 16, 22, 24-33, 39-44
A	WO 99 54440 A (RIETHMUELLER GERT ;BARGOU RALF (DE); DOERKEN BERND (DE); KUFER PET) 28 October 1999 (1999-10-28) abstract examples 1,2 figure 8 ---	1-4, 6-14, 16, 22, 24-44
A	US 5 837 243 A (DEO YASHWANT M ET AL) 17 November 1998 (1998-11-17) abstract examples ---	1-4, 6-14, 16, 22, 24-44
A	WO 96 40789 A (MEDAREX INC) 19 December 1996 (1996-12-19) abstract figure 40 example 8 -----	1-4, 6-14, 16, 22, 24-44

Form PCT/IS2213 (Continuation of Second Sheet) (July 1992)

International Application No. PCT/EP 00 13238

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/AS/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 17-21, 23

Present claims 1-8, 10-14, 16, 22, 24-44 relate to an extremely large number of possible compounds and related methods and compositions. Support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of the compounds, methods and compositions claimed. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Consequently, the search has been carried out for those parts of the claims which appear to be supported and disclosed, namely those parts relating to the compounds, defined as antibodies characterized by a variable region of its light chain (Fw(L)) having an aminoacid sequence as the total of seqs. 1 to 7, and/or a variable region of its heavy chain (Fw(H)) having an aminoacid sequence as the total of seqs. 8-14 (see pages 37-38); nucleotide sequences encoding said variable light and heavy regions defined as seq.id.nos.15 and 16 respectively (see pages 38-39); multifunctional single-chain polypeptides encoded by nucleic acid sequences as set forth in seq.id.nos.21 and 22.

Further, claims 17-21 and 23 relate to a compound defined by reference to a desirable characteristic or property, namely the compound is defined as an antigen having the ability to be recognized by or it binds an antibody according to any one of claims 1-8, being presented by by human plasma cells on their surface, having a molecular weight of about 94 kD or of about 55 kD, an epitope of said antigen, and further antibodies able to bind said antigen.

Said claims cover all compounds having this characteristic or property, whereas the application provides support within the meaning of Article 6 PCT and/or disclosure within the meaning of Article 5 PCT for only a very limited number of such compounds. In the present case, the claims so lack support, and the application so lacks disclosure, that a meaningful search over the whole of the claimed scope is impossible. Independent of the above reasoning, the claims also lack clarity (Article 6 PCT). An attempt is made to define the compound by reference to a result to be achieved. Again, this lack of clarity in the present case is such as to render a meaningful search over the whole of the claimed scope of claims 17-21 and 23 impossible.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of 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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No.	
Information on patent family members				PCT/EP 00/13238	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family members	Publication date		
WO 9951743	A	14-10-1999	AU 3055699	A	25-10-1999
			BR 9909382	A	05-12-2000
			CA 2325346	A1	14-10-1999
			CN 1303431	T	11-07-2001
			EP 1069185	A1	17-01-2001
			HU 0101160	A2	28-08-2001
			WO 9951743	A1	14-10-1999
			NO 20004946	A	04-12-2000
			PL 343322	A1	13-08-2001
			SK 14812000	A3	06-08-2001
			TR 200002885	T2	21-12-2000
			EP 0378175	A	18-07-1990
AT 123340	T	15-06-1995			
AU 629886	B2	15-10-1992			
AU 4768490	A	19-07-1990			
CA 2007336	A1	10-07-1990			
DE 59009163	D1	06-07-1995			
DK 378175	T3	02-10-1995			
EP 0378175	A2	18-07-1990			
JP 2231567	A	13-09-1990			
JP 2787090	B2	13-08-1998			
US 5614367	A	25-03-1997			
ZA 9000136	A	31-10-1990			
WO 0023593	A	27-04-2000	BR 9915543	A	14-08-2001
			WO 0023593	A2	27-04-2000
			EP 1123398	A2	16-08-2001
WO 9928349	A	10-06-1999	AU 1619599	A	16-06-1999
			CA 2311574	A1	10-06-1999
			EP 1044263	A2	18-10-2000
			WO 9928349	A2	10-06-1999
WO 9623071	A	01-08-1996	US 5876950	A	02-03-1999
			AU 692074	B2	28-05-1998
			AU 4966996	A	14-08-1996
			CA 2210419	A1	01-08-1996
			CZ 9702339	A3	12-11-1997
			EP 0807175	A2	19-11-1997
			FI 973120	A	25-07-1997
			HU 9802401	A2	28-01-1999
			JP 10513348	T	22-12-1998
			NO 973447	A	26-09-1997
			NZ 303375	A	28-01-2000
			PL 323565	A1	14-04-1998
WO 9623071	A2	01-08-1996			
WO 9818825	A	07-05-1998	FR 2755144	A1	30-04-1998
			AU 4952097	A	22-05-1998
			BR 9712575	A	19-10-1999
			CZ 9901455	A3	11-08-1999
			EP 0941252	A1	15-09-1999
			WO 9818825	A1	07-05-1998
			HU 9904199	A2	28-04-2000
			JP 2001502553	T	27-02-2001
			NO 991729	A	13-04-1999
			SK 55899	A3	12-06-2000

Form PCT/IS/210 (patent family sheets) July 1997

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

information on patent family members

International Application No
PCT/EP 00/13238

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9818825	A	ZA 9709738 A	22-05-1998
WO 9954440	A	28-10-1999	
		AU 4135299 A	08-11-1999
		BG 104868 A	28-09-2001
		BR 9909860 A	19-12-2000
		CA 2326389 A1	28-10-1999
		CN 1299410 T	13-06-2001
		WO 9954440 A1	28-10-1999
		EP 1071752 A1	31-01-2001
		HR 20000714 A1	31-12-2001
		HU 0102535 A2	28-10-2001
		NO 20005296 A	13-12-2000
		PL 344016 A1	24-09-2001
		SK 15792000 A3	10-05-2001
		TR 200003087 T2	21-02-2001
US 5837243	A	17-11-1998	
		US 2002032312 A1	14-03-2002
		US 6270765 B1	07-08-2001
		US 6365161 B1	02-04-2002
		AU 6383596 A	30-12-1996
		CA 2220461 A1	19-12-1996
		CN 1203603 A	30-12-1998
		EP 0832135 A1	01-04-1998
		JP 11501522 T	09-02-1999
		JP 3262124 B2	04-03-2002
		NZ 312328 A	28-02-2000
		WO 9640789 A1	19-12-1996
WO 9640789	A	19-12-1996	
		US 2002032312 A1	14-03-2002
		AU 6383596 A	30-12-1996
		CA 2220461 A1	19-12-1996
		CN 1203603 A	30-12-1998
		EP 0832135 A1	01-04-1998
		JP 11501522 T	09-02-1999
		JP 3262124 B2	04-03-2002
		NZ 312328 A	28-02-2000
		WO 9640789 A1	19-12-1996
		US 6270765 B1	07-08-2001
		US 6365161 B1	02-04-2002
		US 5837243 A	17-11-1998

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 7
A 6 1 P 37/06	A 6 1 P 37/06	4 H 0 4 5
C 0 7 K 14/47	C 0 7 K 14/47	
C 0 7 K 14/52	C 0 7 K 14/52	
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/46	C 0 7 K 16/46	
C 0 7 K 19/00	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/02	G 0 1 N 33/53	Y
C 1 2 P 21/08	C 1 2 N 15/00	C
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 37/02	

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ミュラー - ヘルメリンク, ハンス, コンラート
ドイツ連邦共和国 ヴュルツブルク 9 7 0 8 2 ハイブリット - ツォイナーシュトラッセ 7 2

(72) 発明者 グライナー, アクセル
ドイツ連邦共和国 トリーフェンシュタイン 9 7 8 5 5 シュロス ホンブルク(番地なし)

(72) 発明者 デュルケン, ベルト
ドイツ連邦共和国 ベルリン 1 4 0 5 5 リッカレー 4 7

(72) 発明者 バルゴウ, ラルフ
ドイツ連邦共和国 ベルリン 1 3 3 5 3 アントヴェルペナー - シュトラッセ 3 8

(72) 発明者 クーファー, ペーター
ドイツ連邦共和国 モースブルク 8 5 3 6 8 アム カペレンナッカー 1 3

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA45 CA04 CA07 DA02 EA04 GA03 GA11 HA01
HA14 HA17
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 DA13
4B065 AA90X AA92X AA99Y AB01 AB05 AC14 BA02 BA08 CA24 CA25
CA44 CA46
4C084 AA02 AA03 AA13 BA01 BA02 BA17 BA18 BA19 BA32 BA38
BA41 BA44 DA39 NA14 ZB082 ZB262
4C085 AA14 AA33 BB36 CC22 CC23 DD62
4C087 AA01 AA02 BC83 CA12 NA14 ZB08 ZB26
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 CA41 DA75 DA76
EA28 EA51 FA74

专利名称(译)	针对浆细胞的抗体		
公开(公告)号	JP2004500070A	公开(公告)日	2004-01-08
申请号	JP2001549423	申请日	2000-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	穆勒头盔链接汉斯·康拉德 格雷纳加速器		
申请(专利权)人(译)	穆勒 - 头盔链接, 汉斯, 康拉德 格雷纳, 加速器		
[标]发明人	ミュラーヘルメリンクハンスコンラート グライナーアクセル デュルケンベルント バルゴウラルフ クーファーペーター		
发明人	ミュラー-ヘルメリンク,ハンス,コンラート グライナー,アクセル デュルケン,ベルント バルゴウ,ラルフ クーファー,ペーター		
IPC分类号	G01N33/53 A61K35/76 A61K38/00 A61K39/00 A61K39/395 A61K48/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/28 C07K16/46 C07K19/00 C12N5/10 C12N15/02 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	A61K39/39558 A61K2039/505 C07K16/28		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K35/76 A61K39/395.H A61K39/395.V A61K48/00 A61P35/00 A61P37/06 C07K14/47 C07K14/52 C07K16/18 C07K16/46 C07K19/00 C12P21/08 G01N33/53.Y C12N15/00.C C12N5/00.B A61K37/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA11 4B024/HA01 4B024/HA14 4B024/HA17 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA13 4B065/AA90X 4B065/AA92X 4B065/AA99Y 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/CA24 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA02 4C084/AA03 4C084/AA13 4C084/BA01 4C084/BA02 4C084/BA17 4C084/BA18 4C084/BA19 4C084/BA32 4C084/BA38 4C084/BA41 4C084/BA44 4C084/DA39 4C084/NA14 4C084/ZB082 4C084/ZB262 4C085/AA14 4C085/AA33 4C085/BB36 4C085/CC22 4C085/CC23 4C085/DD62 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/BC83 4C087/CA12 4C087/NA14 4C087/ZB08 4C087/ZB26 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/CA41 4H045/DA75 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/FA74		
优先权	19962583 1999-12-23 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明是抗体的制造方法, 抗体的血浆细胞特异性反应的基因, 编码这样的抗体, 抗原标记这样的抗体, 所述方法进行其他的抗体和抗体的抗原, 以及这样的抗体对它的用途。另外, 本发明是, (a) 包含CD3抗原特异性识别的免疫球蛋白链或本文的抗体的第一结构域, 其包括用于限定的抗体结合位点, 和 (b) 结合位点的第二域单链多功能多肽。此外, 公开了包含本发明化合物的组合物和试剂盒。优选地, 该组合物是药物和/或诊断组合物。

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 2 4
A 6 1 K 35/76	A 6 1 K 35/76	4 B O 6 4
A 6 1 K 39/00	A 6 1 K 39/395	H 4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395	V 4 C O 8 4
A 6 1 K 48/00	A 6 1 K 48/00	4 C O 8 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 121 頁) 最終頁1	

(21) 出願番号	特願2001-549423 (P2001-549423)	(71) 出願人	502227136
(86) (22) 出願日	平成12年12月22日 (2000.12.22)		ミュラー-ヘルメリンク、ハンス、コ
(85) 翻訳文提出日	平成14年6月24日 (2002.6.24)		ート
(86) 国際出願番号	PCT/EP2000/013238		ドイツ連邦共和国 ヴェルツブルク
(87) 国際公開番号	W02001/047953		0 8 2 ハイブリットツォイナシー
(87) 国際公開日	平成13年7月5日 (2001.7.5)		ラーセ 7 2
(31) 優先権主張番号	199 62 583.2	(71) 出願人	502227147
(32) 優先日	平成11年12月23日 (1999.12.23)		グライナー、アクセル
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)		ドイツ連邦共和国 トリーフェンシュ
			ン 9 7 8 5 5 シュロス ホンブル
			墓地なし)
		(74) 代理人	100095832
			弁理士 細田 芳徳