

(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2015-506687
(P2015-506687A)

(43) 公表日 平成27年3月5日(2015.3.5)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	4B024
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	4B065
C12N 1/15 (2006.01)	C07K 16/28 ZNA	4C085
C12N 1/19 (2006.01)	C12N 1/15	4H045
C12N 1/21 (2006.01)	C12N 1/19	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 73 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-553280 (P2014-553280)
 (86) (22) 出願日 平成24年1月19日 (2012.1.19)
 (85) 翻訳文提出日 平成26年9月4日 (2014.9.4)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/021888
 (87) 国際公開番号 WO2013/109279
 (87) 国際公開日 平成25年7月25日 (2013.7.25)

(71) 出願人 514057606
 セラピューティック プロテインズ インターナショナル, エルエルシー
 アメリカ合衆国 イリノイ 60616, シカゴ, エス. ディアボーン ストリート 3440, スイート 300
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

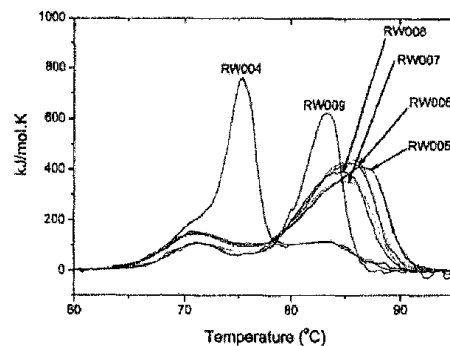
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗-CD20抗体リツキシマブの安定化

(57) 【要約】

本発明は、単離された安定化抗CD20抗体、ならびにその製造方法ならびにヒトリンパ腫、白血病および自己免疫を含む動物疾患の診断および処置におけるその使用方法を提供する。本発明はまた、本発明によって提供される上記安定化抗CD20抗体を含む、免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖またはその両方をコードする単離された核酸を提供する。本発明は、上記安定化抗CD20抗体を作製する方法を提供する。従って、本発明は、上記安定化抗CD20抗体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の一方または両方を発現するベクターを含む細胞を提供する。

Figure 5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された安定化抗CD20抗体であって、

a. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA79Pのうち1つもしくは複数を含む；

b. 単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M20LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y32S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M81L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F279LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を含む；ならびに

c. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a)に列挙した配列番号1におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む、または前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b)に列挙した配列番号2におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む、

単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 2】

前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 3】

前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Iアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 4】

前記重鎖アミノ酸配列が、以下のアミノ酸配列変化M20L、M20I、M81L、A92G、N109DまたはV263Lのうち1つを有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 5】

前記重鎖アミノ酸配列が、M20Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 6】

前記重鎖アミノ酸配列が、M20Iアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 7】

前記重鎖アミノ酸配列が、M81Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 8】

前記重鎖アミノ酸配列が、A92Gアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 9】

前記重鎖アミノ酸配列が、N109Dアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 10】

前記重鎖アミノ酸配列が、V263Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項 11】

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G、N109DおよびV2

10

20

30

40

50

63Lのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、
請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項12】

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G、N109DおよびV2
63Lのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、
請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項13】

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、
および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81L、A92GおよびN109Dのアミ
ノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、
請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項14】

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81L、A92GおよびN109Dのアミ
ノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、
請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項15】

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81LおよびA92Gのアミノ酸配列変化
を有する配列番号2を含む、
請求項1に記載の単離された抗CD20抗体。

【請求項16】

前記抗CD20抗体の重鎖または軽鎖のいずれかが、示差走査熱量測定(DSC)、円
二色性(CD)分光法、蛍光発光分光法、核磁気共鳴(NMR)分光法、サイズ排除クロ
マトグラフィーまたは熱的チャレンジアッセイによって測定した場合に、野生型抗CD2
0抗体の対応する重鎖または軽鎖よりも優れた熱安定性を有する場合に、該抗CD20抗
体が安定化しているとみなされる、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項17】

前記抗CD20抗体が、同じ量の野生型抗CD20抗体と比較した場合に、増強された
抗原結合活性、有効期間、血清半減期、AUCまたはC_{max}を有する、請求項1に記載
の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項18】

単離された安定化抗CD20抗体であって、

a. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列
の等価物が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L
、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA7
9Pのうち1つもしくは複数を含む；

b. 単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列
の等価物が、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M2
0LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y3
2S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M8
1L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F27
9LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を含む；

c. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列
の等価物が、(a)に列挙した配列番号1におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1
つを含み、または該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配
列の等価物が、(b)に列挙した配列番号2におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも
1つを含み；ならびに

10

20

30

40

50

d. 単離された該安定化抗CD20抗体が、インタクトな抗体、Fv断片、単鎖可変領域(ScFv)抗体、モノクローナル抗体、Fab抗体断片、Fab'抗体断片またはFab'2 Fab抗体断片の形態である、単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項19】

請求項18に記載の安定化抗CD20抗体の単一の軽鎖または重鎖をコードする、単離された核酸。

【請求項20】

RNAまたはDNAである、請求項19に記載の単離された核酸。

【請求項21】

請求項19に記載の核酸のうちいずれか1つの発現を導く、単離されたベクター。

【請求項22】

前記発現が誘導性である、請求項21に記載の単離されたベクター。

【請求項23】

請求項19に記載のベクターのうち1つまたは複数を含む、単離された細胞。

【請求項24】

原核生物細胞である、請求項23に記載の細胞。

【請求項25】

真核生物細胞である、請求項23に記載の細胞。

【請求項26】

チャニーズハムスター卵巢細胞である、請求項25に記載の真核生物細胞。

【請求項27】

前記ベクターのうち1つまたは複数によって一過性に形質転換される、請求項23に記載の細胞。

【請求項28】

前記ベクターのうち1つまたは複数によって安定に形質転換される、請求項22に記載の細胞。

【請求項29】

単離された前記抗CD20抗体の軽鎖または重鎖アミノ酸配列が、

a. 該抗CD20抗体がCD20分子に結合する能力、補体を固定する能力、CD-20発現細胞をオプソニン化する能力、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を活性化する能力、抗体依存性プログラム細胞死を活性化する能力、マクロファージ依存性抗CD20免疫応答を活性化する能力、化学療法に対して感受性のCD20保有細胞を活性化する能力を増強する；

b. 該抗CD20抗体が補体を固定する能力を低減させる；

さらなるアミノ酸配列変化、ならびに、

c. (a)および(b)のさらなるアミノ酸配列変化の組合せ、を有する、請求項1に記載の単離された抗CD20抗体。

【請求項30】

前記抗CD20抗体がエフェクターに結合している、請求項1のいずれか1項に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項31】

前記エフェクターが、放射性同位体、化学療法剤、毒素、生体応答改変因子または第2の抗体である、請求項30に記載の単離された抗CD20抗体。

【請求項32】

PEG、アルブミンまたはポリシアル酸に結合している、請求項1に記載の単離された抗CD20抗体。

【請求項33】

請求項1に記載の抗CD20抗体および薬学的に許容されるキャリアを含む、薬理的組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

患者において疾患を処置する方法であって、薬学的に許容されるキャリア中の治療有効量の安定化抗CD20抗体を該患者に投与するステップを含み、ここで、

a. 単離された前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA79Pのうち1つもしくは複数を含む；

b. 単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M20LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y32S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M81L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F279LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を含む；ならびに

c. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a)に列挙した配列番号1における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む、または該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b)に列挙した配列番号2における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む、

方法。

【請求項 3 5】

前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W46Iアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、以下のアミノ酸配列変化M20L、M20I、M81L、A92G、N109DまたはV263Lのうち1つを有する配列番号2を含む、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20Iアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M81Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、A92Gアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、N109Dアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 3】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、V263Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の方法。

【請求項 4 4】

a. 前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、および

b. 前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G

10

20

30

40

50

、N 1 0 9 D および V 2 6 3 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 5】

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 を含み、および
b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 I、M 8 1 L、A 9 2 G
、N 1 0 9 D および V 2 6 3 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 6】

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W 4 6 L アミノ酸配列変化を有
する配列番号 1 を含み、および
b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L、M 8 1 L、A 9 2 G
および N 1 0 9 D アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 3 4 に記載の方法。

10

【請求項 4 6】

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 を含み、および
b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L、M 8 1 L、A 9 2 G
、および N 1 0 9 D アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 4 8】

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 を含み、および
b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L、M 8 1 L および A 9
2 G アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 3 4 に記載の方法。

20

【請求項 4 9】

前記抗 C D 2 0 抗体の重鎖または軽鎖のいずれかが、示差走査熱量測定 (D S C)、円
二色性 (C D) 分光法、蛍光発光分光法、核磁気共鳴 (N M R) 分光法、サイズ排除クロ
マトグラフィーまたは熱的チャレンジアッセイによって測定した場合に、野生型抗 C D 2
0 抗体の対応する重鎖または軽鎖よりも優れた熱安定性を有する場合に、該抗 C D 2 0 抗
体が安定化しているとみなされる、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 5 0】

前記安定化抗 C D 2 0 抗体が、同じ量の野生型抗 C D 2 0 抗体と比較した場合に、増強
された抗原結合活性、有効期間、血清半減期、A U C または $C_{m a x}$ を有する、請求項 3
4 に記載の方法。

30

【請求項 5 1】

前記抗 C D 2 0 抗体の軽鎖または重鎖アミノ酸配列が、該抗体が C D 2 0 分子に結合す
る能力、補体を固定する能力、C D - 2 0 発現細胞をオプソニン化する能力、抗体依存
性細胞傷害 (A D C C) を活性化する能力、抗体依存性プログラム細胞死を活性化する能
力、マクロファージ依存性抗 C D 2 0 免疫応答を活性化する能力、化学療法に対して感受
性の C D 2 0 保有細胞を活性化する能力を増強する、または該抗 C D 2 0 抗体が補体を固
定する能力を低減させるさらなるアミノ酸変化、ならびにそれらの組合せを有する、請求
項 3 4 に記載の方法。

40

【請求項 5 2】

前記抗 C D 2 0 抗体がエフェクターに結合している、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 5 3】

前記エフェクターが、放射性同位体、化学療法剤、毒素、生体応答改変因子または第 2
の抗体である、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記抗 C D 2 0 抗体が、P E G、アルブミンまたはポリシアル酸に結合している、請求
項 3 4 に記載の方法。

【請求項 5 5】

50

前記疾患が、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、関節リウマチ、ウェゲナー肉芽腫症または顕微鏡的多発血管炎である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 5 6】

前記抗 CD 20 抗体が、インタクトな抗体、単鎖可変領域 (S c F v) 抗体、モノクローナル抗体、F a b 抗体断片、F a b ' 抗体断片または F a b ' 2 抗体断片の形態である、請求項 3 4 に記載の方法。

【請求項 5 7】

患者において CD 20 ポリペプチドを定量的に検出する方法であって、薬学的に許容されるキャリア中の診断有効量の安定化抗 CD 20 抗体を該患者に投与するステップを含み、

a . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化 : S 4 1 Q 、 S 4 2 P 、 W 4 6 L 、 W 4 6 I 、 S 5 5 P 、 V 5 9 A 、 V 5 9 D 、 S 6 9 D 、 S 6 9 N 、 Y 7 0 F および A 7 9 P のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み ;

b . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 2 または以下のアミノ酸配列変化 : V 3 7 L および M 2 0 L 、 M 2 0 L および A 9 2 G 、 Q 5 V 、 P 7 S 、 E 1 0 G 、 M 2 0 L 、 M 2 0 I 、 T 2 8 S 、 Y 3 2 S 、 A 6 8 F 、 A 6 8 V 、 T 6 9 I 、 L 7 0 I 、 A 7 2 V 、 K 7 4 N 、 K 7 4 T 、 M 8 1 L 、 S 8 4 N 、 A 9 2 G 、 N 1 0 9 D 、 A 1 1 3 Q 、 V 2 6 3 L 、 V 2 7 7 I 、 F 2 7 9 L ならびに V 3 1 2 I のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 2 を含み ;

c . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、(a) に列挙した配列番号 1 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み、または該安定化抗 CD 20 抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配列の等価物が、(b) に列挙した配列番号 2 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み ; ならびに

d . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体が、インタクトな抗体、F v 断片、単鎖可変領域 (S c F v) 抗体、モノクローナル抗体、F a b 抗体断片、F a b ' 抗体断片または F a b ' 2 F a b 抗体断片の形態である、方法。

【請求項 5 8】

生物学的検体中の CD 20 ポリペプチドを定量的に検出する方法であって、診断量の安定化抗 CD 20 抗体を該生物学的検体と接触させるステップを含み、

a . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化 : S 4 1 Q 、 S 4 2 P 、 W 4 6 L 、 W 4 6 I 、 S 5 5 P 、 V 5 9 A 、 V 5 9 D 、 S 6 9 D 、 S 6 9 N 、 Y 7 0 F および A 7 9 P のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み ;

b . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 2 または以下のアミノ酸配列変化 : V 3 7 L および M 2 0 L 、 M 2 0 L および A 9 2 G 、 Q 5 V 、 P 7 S 、 E 1 0 G 、 M 2 0 L 、 M 2 0 I 、 T 2 8 S 、 Y 3 2 S 、 A 6 8 F 、 A 6 8 V 、 T 6 9 I 、 L 7 0 I 、 A 7 2 V 、 K 7 4 N 、 K 7 4 T 、 M 8 1 L 、 S 8 4 N 、 A 9 2 G 、 N 1 0 9 D 、 A 1 1 3 Q 、 V 2 6 3 L 、 V 2 7 7 I 、 F 2 7 9 L ならびに V 3 1 2 I のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 2 を含み ;

c . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、(a) に列挙した配列番号 1 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み、または該安定化抗 CD 20 抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配列の等価物が、(b) に列挙した配列番号 2 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み ; ならびに

d . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体が、インタクトな抗体、F v 断片、単鎖可変領域 (S c F v) 抗体、モノクローナル抗体、F a b 抗体断片、F a b ' 抗体断片または F a b ' 2 F a b 抗体断片の形態である、

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 59】

前記抗CD20抗体が、ELISAアッセイ、ウエスタンブロット、スロットブロット、抗原捕捉アッセイまたはマイクロアレイアッセイにおいて使用される、請求項57に記載の方法。

【請求項 60】

単離された抗CD20抗体であって、

a. 該抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：Q1D、S5T、A9S、A9L、I10L、I10F、I10S、I10T、A13V、P15A、P15L、P15V、K18Q、K18R、K18E、M21I、M21L、S27Q、S27K、I32L、H33N、F35Y、P39S、S41A、S41T、S41Q、S42A、S42P、P45L、P45R、W46L、W46I、A49D、S55P、V59A、V59D、F61T、S69D、S69N、S69T、Y70F、S71T、A79P、A82L、A82V、A82F、Q88LおよびG99Qのうち1つもしくは複数を有する配列番号1を含み；

b. 該抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号2、または以下のアミノ酸配列変化：

i. V37L、M20L、ならびにQ5V、P7S、A9G、A9L、E10G、K13Q、T28S、T30S、K67R、K67R、A68F、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、Y80F、M81L、S84N、A92G、W106S、F108A、N109DおよびA113Qのうち1つもしくは複数；

ii. M20L、A92G、ならびにV18L、K19R、K19S、K19T、M20I、M20V、S25T、Y27F、Y32F、Y32S、P41H、G44E、L45Rのうち1つもしくは複数；および

iii. V244L、L246I、V263L、V267A、V267I、V267L、V270L、V270S、V270F、V270I、V277I、F279I、F279L、V306T、V312I、V312L、V327A、V327L、I340A、I340L、T254E、M256L、M256Y、T260E、T260FおよびT260K、

のうち1つもしくは複数を有する配列番号2を含み；ならびに

c. ここで、該抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a)に列挙した配列番号1におけるアミノ酸変化のうち少なくとも1つを含み、または該抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b)に列挙した配列番号2におけるアミノ酸変化のうち少なくとも1つを含む、

単離された抗CD20抗体。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

リツキシマブ (IDEC - C2B8、RITUXAN、MABTHERAとしても公知) は、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、関節リウマチおよびウエゲナー肉芽腫症 (顕微鏡的多発血管炎の1形態) を処置するために使用されるキメラ抗CD20モノクローナル抗体である。CD20は、膜貫通Ca²⁺コンダクタンスおよびヒトB細胞活性化の間の細胞周期進行の調節に関与するBリンパ球特異的細胞表面分子である。CD20は、主にIg重鎖再配列後に、骨髄においてヒトプレB細胞によって最初に発現され、その発現は形質細胞の分化まで持続する。CD20は、B細胞非ホジキンリンパ腫の90%の表面上で発現するが、造血幹細胞、プロB細胞、正常形質細胞または正常非造血組織上では見出されない。CD20は、細胞表面から抜け落ちることはなく、遊離CD20抗原は循環中に見出されない。in vitro研究に基づき、リツキシマブFcドメインが

10

20

30

40

50

免疫エフェクター機能を動員してB細胞溶解を媒介すると現在考えられている。

【0002】

抗体は、ウイルスおよび細菌などの外来病原体を同定し中和するために、免疫系によって産生されるタンパク質分子である。その精巧な結合感度および特異性に起因して、抗体は、広範な治療的用途および診断的用途を有する有用な試薬である。抗原は、*in vivo*で抗体の合成を刺激する分子である。抗原に結合すると、抗原は、補体の固定、抗原保有細胞の食作用および直接的細胞媒介性細胞傷害などを含む、新生物または自己免疫B細胞を攻撃するために使用され得る多数のプロセスを活性化し得る。

【0003】

しかし、ほとんどのタンパク質分子の場合と同様に、抗体は、化学的および生物学的安定性を保持するために、狭い範囲のpH、温度および溶媒条件内に維持される必要がある。さらに、各抗体に独自の特異性を付与するアミノ酸配列における差異に起因して、個々の抗体は安定性が大きく変動する。その抗原結合活性を維持しつつ抗体の安定性を増強できる方法および組成物が、最近記載されている（例えば、米国特許出願第13/002013号；公開第20110130324号を参照のこと）。治療抗体のかかる安定化は、血清半減期の改善、より低い投薬量の必要性、副作用の低減、有効期間の改善ならびに出荷および貯蔵コストの低減を生じ得る。

従って、リツキシマブを含む全ての治療抗体の、安定化バージョンの必要性が長年にわたり存在してきた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許出願公開第2011/0130324号

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0005】

発明の簡単な要旨

本発明は、単離された安定化抗CD20抗体を提供し、(a)単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列は、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA79Pのうち1つもしくは複数を有する配列番号1を含むバリエーションを含み；(b)単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列は、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M20LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y32S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M81L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F279LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を有する配列番号2を含むバリエーションを含み；(c)単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列は、(a)に列挙した配列番号1におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む、または該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列は、(b)に列挙した配列番号2におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む。単離された該安定化抗CD20抗体ならびにそれらの個々の免疫グロブリン軽鎖および重鎖は、「野生型抗CD20抗体」およびその対応する個々の免疫グロブリン軽鎖および重鎖との比較において安定化しており、この「野生型抗CD20抗体」とは、軽鎖（配列番号1）および重鎖（配列番号2）配列（これらは、米国特許第5,843,439号において最初に報告されたリツキシマブ配列に基づくが、そこに含まれる重鎖配列の2つの補正を有する）を有する抗体を指す。

【0006】

本発明はまた、本発明によって提供される上記安定化抗CD20抗体を含む、免疫グロブリン重鎖もしくは軽鎖またはその両方をコードする単離された核酸を提供する。本発明は、上記安定化抗CD20抗体を作製する方法を提供する。従って、本発明は、上記安定

10

20

30

40

50

化抗CD20抗体の免疫グロブリン重鎖および軽鎖の一方または両方を発現するベクターを含む細胞を提供する。

【0007】

本発明は、インタクトな抗体、Fv断片、単鎖可変領域(ScFv)抗体、モノクローナル抗体、Fab抗体断片、Fab'抗体断片またはFab'2 Fab抗体断片の形態の抗体が挙げられるがこれらに限定されない、本発明に従う単離された安定化抗CD20抗体を提供する。

【0008】

本発明はさらに、患者において疾患を処置する方法を提供し、この方法は、治療有効量の任意の1種または複数の上記安定化抗CD20抗体を患者に投与するステップを含む。好ましい実施形態では、本発明は、上記安定化抗CD20抗体を用いて、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、関節リウマチ、ウェゲナー肉芽腫症および顕微鏡的多発血管炎を処置する方法を提供する。

10

【0009】

さらに、本発明は、患者または生物学的検体中のCD20ポリペプチドを定量的に検出する方法を提供し、この方法は、診断有効量の本発明によって提供される安定化抗CD20抗体を該患者に投与するステップまたは該検体をこの診断有効量の本発明によって提供される安定化抗CD20抗体と接触させるステップを含む。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】図1は、そのシグナル配列なしの野生型抗CD20抗体軽鎖アミノ酸配列である配列番号1を示す図である。

20

【0011】

【図2】図2は、そのシグナル配列なしの野生型抗CD20抗体重鎖アミノ酸配列である配列番号2を示す図である。配列は、米国特許第5,843,439号に開示されている抗CD20配列に基づき、一重および二重の下線によって示される2つの配列補正を有する。

【0012】

【図3】図3は、そのシグナル配列ありの野生型抗CD20抗体軽鎖アミノ酸配列である配列番号3を示す図である。

30

【0013】

【図4】図4は、そのシグナル配列ありの野生型抗CD20抗体重鎖アミノ酸配列である配列番号4を示す図である。

【0014】

【図5】図5は、野生型およびパリアント抗CD20抗体のキャピラリー示差走査熱量測定分析の結果を示す図である。野生型抗CD20は、試料RW004として同定される。試料RW005~009は、安定化パリアントからなる。配列変化およびT_m値は表8に示す。

【0015】

【図6】図6は、プロテインA結合熱的チャレンジアッセイ(thermal challenge assay)の結果を示す図である。

40

【発明を実施するための形態】

【0016】

発明の詳細な説明

本発明は、増強された安定性を有する特定のCD20結合性抗体、該抗体の産生および該抗体の使用に関する。

【0017】

定義

【0018】

「単離された」および「精製された」は、本明細書で相互交換可能に使用され、タンバ

50

ク質、核酸、脂質および多糖などの他の生体分子から実質的に分離されている状態の分子を指す。これは、膨大な数の他の分子の存在下で存在するかかる分子の通常の *in vivo* 状態とは対照的である。

【0019】

本明細書で使用する場合、用語「安定化」、「安定化タンパク質」および「安定化ポリペプチド」は、本明細書で相互交換可能に使用され、かつ、野生型タンパク質（即ち、上記アミノ酸変化のないタンパク質）と比較してそのタンパク質の正常な機能を減少させる傾向のある条件、例えば、熱、低温、震動、浸透圧などに対してこのタンパク質をより抵抗性にするアミノ酸変化がなされたタンパク質を指す。例えば、タンパク質の安定性は、温度依存的である、アンホールディングのギブズ自由エネルギー G_u に関連する。ほとんどのタンパク質の安定性は、温度と共に減少する；温度が上昇すると、 G_u は減少し、折り畳まれたタンパク質の濃度と高次構造がほぐされた (*unfolded*) タンパク質の濃度とが等しくなる平衡においてゼロになる。この点において、この温度は「融点」 (T_m) とみなされる。蛍光色素の存在下でのタンパク質の熱的アンホールディングは、タンパク質の T_m を評価するために使用され得る。平衡法ではないものの、この技術は、相対的 T_m に従ってタンパク質をランク付けするために使用され得る（例えば、Niesen F. H.、Berglund H. および Vedadi M. : The use of differential scanning calorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* 2007年、2号：2212～21頁もまた参照のこと）。本発明に従う安定化タンパク質は、例えば、野生型 T_m より少なくとも0.3 高い T_m 、好ましくは野生型 T_m より少なくとも0.3 高い T_m 、より好ましくは野生型 T_m より少なくとも0.5 高い T_m 、なおさらには野生型 T_m より少なくとも1.0 高い T_m 、および、なおより好ましくは野生型 T_m より少なくとも5.0 高い T_m を有し、 T_m は、当業者に公知の任意の適切な方法によって決定される。

10

20

【0020】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」は、本明細書で相互交換可能に使用され、かつ、ペプチド結合によって連結したアミノ酸残基の鎖から構成される化合物を指す。ポリペプチドの「活性部分」とは、全長ポリペプチド未満であるが、測定可能な生物学的活性を保持し、生物学的検出を保持するペプチドを意味する。

30

【0021】

本明細書で使用する場合、用語「腫瘍」とは、良性であれ悪性（がん性）であれ、原発部位病変であれ転移であれ、任意の新生物の成長、増殖または細胞塊を指す。

【0022】

本明細書で使用する場合、用語「がん」とは、正常な成長制御に対する感受性を喪失した細胞の増殖によって引き起こされるまたはかかる細胞の増殖を特徴とする増殖性障害を指す。同じ組織型のがんは、同じ組織に通常起源し、その生物学的特徴に基づいて異なるサブタイプに分けられ得る。がんの4つの一般的な分類は、癌腫（上皮細胞由来）、肉腫（結合組織または中胚葉由来）、白血病（血液形成組織由来）およびリンパ腫（リンパ組織由来）である。がんは、全ての器官に影響し得、身体組織が罹患し得る。がんの定義を限定しないがんの具体的な例には、黒色腫、白血病、星状細胞腫、神経膠芽腫、網膜芽細胞腫、リンパ腫、神経膠腫、ホジキンリンパ腫および慢性リンパ性白血病を挙げることができる。種々のがん罹患し得る器官および組織の例には、膵臓、乳房、甲状腺、卵巣、子宮、精巣、前立腺、脳下垂体、副腎、腎臓、胃、食道、直腸、小腸、結腸、肝臓、胆嚢、頭頸部、舌、口腔、眼および眼窩、骨、関節、脳、神経系、皮膚、血液、鼻咽頭組織、肺、喉頭、尿路、子宮頸部、腔、外分泌腺ならびに内分泌腺が挙げられる。あるいは、がんは、多中心性または原発部位不明のがん（CUPS）であり得る。

40

【0023】

本明細書で使用する場合、「腫瘍を標的とする抗体」とは、疾患を標的とする抗体を指

50

し、この疾患は、リンパ腫、白血病、腫瘍、がん、新生物などである。

【0024】

本明細書で使用する場合、「治療有効量」とは、哺乳動物における疾患または状態の1つまたは複数の症状を（通常の熟練した臨床家によって判断されるように、ある程度まで）軽減する組成物の量を指す。さらに、組成物の「治療有効量」とは、疾患もしくは状態と関連するまたは疾患もしくは状態の原因である生理学的または生化学的パラメータを、部分的または完全に正常に戻す量を意味する。当技術に熟練した臨床家は、静脈内、皮下、腹腔内、経口、または吸入を介してなどで投与される場合、特定の疾患状態または障害を処置もしくは予防するために、組成物の治療有効量を決定できる。治療的に有効であるために必要とされる組成物の正確な量は、多くの患者の具体的考慮事項に加えて、例えば、活性薬剤の比活性、使用される送達デバイス、該薬剤の物理的特徴、投与の目的などの多数の因子に依存する。しかし、本明細書に示される開示を理解すれば、治療有効量の決定は、通常の熟練した臨床家の技術の範囲内である。

10

【0025】

用語「処置する」、「処置」、「療法」および「治療的処置」は全て、本明細書で使用する場合、治癒的療法、予防療法（prophylactic therapy）または予防的療法（preventative therapy）を指す。「予防的療法」の例は、標的とした疾患（例えば、がんまたは他の増殖性疾患）またはそれに関連する状態の危険性を、少なくとも5%、好ましくは少なくとも10%、より好ましくは少なくとも15%、なおより好ましくは少なくとも20%、低下させることである。処置を必要とする者には、その疾患または状態を既に有している者、および予防すべき疾患または状態を有しやすい者が含まれる。用語「処置する」、「処置」、「療法」および「治療的処置」は、本明細書で使用する場合、疾患または関連する状態と闘うことを目的とした哺乳動物の管理およびケアもまた記述し、症状、副作用、または該疾患、状態の他の合併症を緩和するための組成物の投与を含む。がんの治療的処置には、手術、化学療法、放射線療法、遺伝子療法および免疫療法が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0026】

本明細書で使用する場合、用語「エフェクター」、「薬剤」または「薬物」または「治療剤」とは、治療的特性または医薬的特性を有すると疑われる、化学剤、化合物の混合物、生物学的高分子、または細菌、植物、真菌または動物（特に哺乳動物）の細胞もしくは組織などの生物学的材料から作製した抽出物を指す。上記薬剤または薬物は、精製され得る、実質的に精製され得る、または部分的に精製され得る。本発明に従う「薬剤」には、放射線療法剤または「化学療法剤」（例えば、小分子薬物）もまた挙げられる。

30

【0027】

本明細書で使用する場合、用語「診断剤」とは、例えば、免疫組織学的検査またはフローサイトメトリーなどの任意の適切な方法による、血漿/循環CD20などのCD20の検出および/または定量を可能にする剤を指す。

【0028】

本明細書で使用する場合、用語「化学療法剤」とは、がん、新生物および/または増殖性疾患に対する活性を有する化学剤（例えば、小分子薬物）を指す。

40

【0029】

本明細書で使用する場合、用語「放射線療法レジメン」または「放射線療法」とは、がん性細胞を死滅させるための放射線の投与を指す。放射線は、上記細胞内の種々の分子と相互作用するが、細胞死を生じる一次標的はデオキシリボ核酸（DNA）である。しかし、放射線療法はまた、細胞膜および核膜ならびに他のオルガネラに対する損傷を生じることも多い。DNA損傷は通常、糖-リン酸骨格における一本鎖または二本鎖の切断を含む。さらに、細胞機能を破壊し得るDNAおよびタンパク質の架橋が存在し得る。放射線の種類に依存して、DNA損傷の機構は、その生物学的效果比が様々であるように、様々であり得る。例えば、重粒子（即ち、陽子、中性子）は、DNAを直接損傷し、より大きい生物学的效果比を有する。一方、電磁放射線は、細胞水のイオン化によって主に産生され

50

る短命のヒドロキシルフリーラジカルを介して作用する間接的なイオン化を生じる。放射線の臨床的適用は、外部ビーム放射線（外部供給源から）および近接照射療法（患者に移植または挿入した放射線の供給源を使用する）からなる。外部ビーム放射線は、X線および/またはガンマ線からなるが、近接照射療法は、自然崩壊してアルファ粒子を放出する、またはガンマ線と共にベータ粒子を放出する放射性核を使用する。

【0030】

本明細書で使用する場合、用語「生物製剤 (biologics)」、「生物学的製剤 (biologicals)」、「生物学的薬剤 (biological agents)」、「代替的治療レジメン」または「代替的療法」は、例えば、受容体チロシンキナーゼインヒビター（例えば、Iressa（商標）（ゲフィチニブ）、Tarceva（商標）（エルロチニブ）、Erbix（商標）（セツキシマブ）、イマチニブメシル酸塩 (Gleevec（商標）)）；プロテオソーム (proteasome) インヒビター（例えば、ボルテゾミブ (Velcade（商標）)）；VEGFR2 インヒビター、例えばPTK787 (ZK222584)、オーロラキナーゼインヒビター（例えば、ZM447439）；ラパマイシンの哺乳動物標的 (mTOR) インヒビター、シクロオキシゲナーゼ-2 (COX-2) インヒビター、ラパマイシンインヒビター（例えば、シロリムス (Rapamune（商標）)）；ファルネシルトランスフェラーゼインヒビター（例えば、ティピファーニブ (Zarnestra（商標）)）；マトリックスメタロプロテイナーゼインヒビター（例えば、BAY 12-9566；硫酸化多糖テコガラン (tecogalan)）；新脈管形成インヒビター（例えば、Avastin（商標）（ベパシズマブ）；フマギリンのアナログ、例えばTNP-4；カルボキシアミノトリアゾール；BB-94およびBB-2516；サリドマイド；インターロイキン-12；リノミド (linomide)；ペプチド断片；ならびに血管増殖因子および血管増殖因子受容体に対する抗体；血小板由来増殖因子受容体インヒビター、タンパク質キナーゼCインヒビター、マイトジェン活性化キナーゼインヒビター、マイトジェン活性化タンパク質キナーゼキナーゼインヒビター、ラウス肉腫ウイルス形質転換がん遺伝子 (SRC) インヒビター、ヒストンデアセチラーゼインヒビター、小分子低酸素誘導因子インヒビター、ヘッジホッグインヒビター、TGF-シグナル伝達インヒビターなどを含む、手術、化学療法（小分子薬物）または放射線療法以外の療法である。

【0031】

上記と一致して、免疫療法剤もまた、代替的治療レジメンとして考慮される。例えば、予め形成された抗体を含む血清またはガンマグロブリン；非特異的免疫賦活性アジュバント；特異的能動免疫療法；および養子免疫療法。さらに、代替的療法は、例えばアンチセンス分子を含むポリヌクレオチド、ポリペプチド、抗体、遺伝子療法ベクターなどの他の生物学をベースとした化学的実体を含み得る。かかる代替的療法は、単独で、または本明細書に記載される他の治療レジメンと併用して投与され得る。投薬レジメンおよび投与レジメンを含む併用療法における化学療法剤および代替的治療レジメンで使用される他の薬剤の使用方法もまた、当業者に公知である。

【0032】

本明細書で使用する場合、用語「腫瘍局在化」または「疾患局在化」とは、本明細書で使用する場合、腫瘍保有動物への注射により、CD20発現腫瘍中またはCD20発現腫瘍の部位において抗CD20抗体が集合または濃縮する程度を指す。腫瘍局在化は、抗体を蛍光色素で標識すること、腫瘍を有する動物に現在蛍光性の抗体を注射すること、および腫瘍の蛍光対任意の腫瘍全体から離れた皮膚または他の組織からの蛍光の比率を決定することが挙げられるがこれらに限定されない任意の適切な方法によって測定され得、この局在化は、上記比率が > 20 、好ましくは > 10 、より好ましくは > 5 の場合に存在する。

【0033】

本明細書で使用する場合、用語「ベクター」とは、抗CD20抗体の軽鎖もしくは重鎖またはそれらの一部をコードする配列から構成され得る（即ち、「コード配列」が、ベク

10

20

30

40

50

ターへとクローニングされる)任意のポリヌクレオチドを意味し、細胞の形質転換に使用され得る(例えば、そのポリヌクレオチドがその細胞中で複製できるように、および例えば、上記ポリヌクレオチドの存在が抗生物質によって選択できるように、DNAトランスフェクションによって)。従って、ベクターは、そのベクターが、クローニングされた遺伝子の転写を指示し得る制御配列(例えば、リプレッサーを欠く一方、プロモーター、エンハンサー)を含む場合に、そのベクターへとクローニングされた遺伝子「を発現させることが可能」とあると言うことができる。本明細書で使用する場合、「発現が誘導性である」と言う場合、抗CD20抗体またはその一部をコードするベクター配列の転写が制御され得、その結果、上記転写がオンにされ得るまたはオフにされ得ることを意味する。細胞は、ベクター配列が限定的な期間(例えば、数日間)にわたり該細胞中で維持される場合にこのベクターで「一過性に形質転換される」と言うことができ、または該ベクター配列が無期限に(特に、選択される場合)該細胞中で維持される場合に「安定に形質転換される」と言うことができる。

10

【0034】

本明細書で使用する場合、用語「配列変化」は、アミノ酸配列または核酸配列における変更(即ち、「変異」)を意味する。

【0035】

抗CD20抗体

【0036】

一般に、抗体は、2つの軽鎖分子および2つの重鎖分子から構成される；これらの鎖は、一般的「Y字」形状を形成し、軽鎖および重鎖の両方がY字のアームを形成し、重鎖がY字の基部を形成する。軽鎖および重鎖は、構造的および機能的相同性のドメインへと分けられる。軽鎖および重鎖の両方の可変ドメイン(「V_L」および「V_H」)は、認識および特異性を決定する。軽鎖および重鎖の定常領域ドメイン(「C_L」および「C_H」)は、重要な生物学的特性、例えば、抗体鎖会合、分泌、経胎盤移動性、Fc受容体結合、補体固定、オプソニン化、抗体依存性細胞傷害(「ADCC」)の活性化などを付与する。抗体産生細胞において免疫グロブリン遺伝子発現を導く一連の事象は複雑である。可変ドメイン領域の遺伝子配列は、「V_H」、「D_H」および「J_H」、または「V_L」および「J_L」と称される別々の生殖系列遺伝子セグメントに位置する。これらの遺伝子セグメントは、DNA再配列によって連結して、それぞれ重鎖および軽鎖において発現する完全V領域を形成する。次いで、再配列し連結したVセグメント(V_L-J_LおよびV_H-D_H-J_H)は、それぞれ軽鎖および重鎖の完全な可変領域または抗原結合性ドメインをコードする(本明細書で使用する場合、用語「免疫グロブリン重鎖および軽鎖」、「抗体重鎖および軽鎖」ならびに「重鎖および軽鎖」は、相互交換可能である)。

20

30

【0037】

本明細書で使用する場合、用語「抗CD20抗体」は、一般に「CD20」と称されるヒトBリンパ球制限分化抗原Bp35として典型的に指定された35,000ダルトンの細胞表面非グリコシル化リンタンパク質を特異的に認識する抗体である。本明細書で使用する場合、用語「野生型抗CD20抗体」とは、Fv断片、単鎖可変領域(SCFv)抗体、Fab抗体断片、Fab'抗体断片またはFab'2 Fab抗体断片の形態の、配列番号1の免疫グロブリン軽鎖アミノ酸配列および配列番号2の免疫グロブリン重鎖アミノ酸配列またはそれらの等価物を有するCD20結合性抗体を意味する。

40

【0038】

本明細書で使用する場合、用語「キメラ」とは、2つ以上の異なる種(例えば、マウスおよびヒト)由来の一部を含む抗体を指す。特に、抗CD20抗体に関して使用する場合、この用語は、組換えデオキシリボ核酸技術を使用して最も好ましくは誘導され、ヒト(免疫学的に「関連する」種、例えばチンパンジーが含まれる)構成成分および非ヒト構成成分の両方を含む抗体を包含する：該キメラ抗体の定常領域は、天然ヒト抗体の定常領域と実質的に同一であり；該キメラ抗体の可変領域は、非ヒト供給源に由来し、CD20細胞表面抗原に対する所望の抗原特異性を有する。

50

【 0 0 3 9 】

本明細書で使用する場合、語句「免疫学的に活性な」は、キメラ抗CD20抗体に関して使用される場合、ヒトC1qを結合し、補体を固定し、表面CD20保有細胞をオプソニン化し、ヒトBリンパ系細胞系の補体依存的溶解（「CDC」）を媒介し、抗体依存性細胞傷害（「ADCC」）を介してヒト標的細胞を溶解させる抗体を意味する。

【 0 0 4 0 】

リツキシマブは、145kDのおよその分子量およびおよそ8.0nMのCD20結合親和性を有する完全抗体分子である。上記抗体結合親和性は、当業者に公知の任意の適切な方法によって決定できる。例えば、その抗原に対する抗体結合の強度は、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ELISA、またはカラム支持形式での結合によって評価できる。解離は、変性条件を増加させることによって、または関連抗原もしくは非放射能の抗原との競合によって、実施される。解離定数Kdは、スキャッチャードプロットによって決定され得る（例えば、米国特許第5,843,439号および米国特許第8,057,793号を参照のこと）。

10

【 0 0 4 1 】

タンパク質安定性の体系的改善のための最近記載された方法は、米国特許出願第13/002,013号（特許出願公開第20110130324号）に開示されており、単鎖Fv（scFv）の安定化を用いて抗体分子に適用されている。特に、このアプローチを使用して、抗原結合性に有意に影響を与えることなしに安定化を生じるアミノ酸配列変化が、抗体軽鎖および重鎖においてなされ得る。この方法は、その結合特性の修飾を回避するために抗体のフレームワーク領域に焦点を当てているので、これが可能である。本発明は、全長の治療モノクローナル抗体へのこの安定化アプローチの適用を初めて実証している。このポリペプチド安定化技術は、その結合機能に影響を与えることなしに抗体の安定性を改善する可能性があるアミノ酸変化を同定するために所有権のある方法を利用する。一般的な用語では、このタンパク質安定化方法は、（1）熱的安定性および熱力学的安定性が特徴付けられた抗体ドメインバリエーションの所有権のあるデータベースを使用する標的配列の評価、ならびに（2）機能的相同タンパク質において生じる配列バリエーションの同定、に基づく。

20

【 0 0 4 2 】

従って、本発明は、単離された安定化抗CD20抗体ならびにその製造および使用の方法を提供し、（a）単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列またはこの軽鎖アミノ酸配列の等価物は、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA79Pのうち1つもしくは複数を有する配列番号1を含み；（b）単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列またはこの重鎖アミノ酸配列の等価物は、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M20LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y32S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M81L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F279LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を有する配列番号2を含み；（c）単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列またはこの軽鎖アミノ酸配列の等価物は、（a）に列挙した配列番号1におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含み、またはこの安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列もしくはこの重鎖アミノ酸配列の等価物は、（b）に列挙した配列番号2におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含み；ならびに（d）単離された該安定化抗CD20抗体は、インタクトな抗体、Fv断片、単鎖可変領域（scFv）抗体、モノクローナル抗体、Fab抗体断片、Fab'抗体断片またはFab'2 Fab抗体断片の形態である。「Fv断片」とは、両方の鎖にカップリングしたジスルフィド結合、アミノ酸リンカー配列または非ペプチド分子などが含まれる、任意の適切な手段によって一緒にされた、短縮化重鎖および軽鎖の任意の組合せを意味する。

30

40

50

【0043】

それぞれ配列番号1および2によって示される軽鎖または重鎖アミノ酸配列の「等価物」とは、局所配列アラインメントに基づきかつそのKabatまたはEU残基番号(表1~3を参照のこと)に鑑みて、本明細書に開示される配列番号1または2に基づくアミノ酸変化に対応する、問題のFv断片、単鎖可変領域(SCFv)抗体、Fab抗体断片、Fab'抗体断片またはFab'2 Fab抗体断片の配列におけるアミノ酸残基を意味する。

【0044】

本発明は、単離された安定化抗CD20抗体であって、その軽鎖アミノ酸配列がW46Lアミノ酸変化を有する配列番号1を含み、その重鎖アミノ酸配列が以下の配列変化M20L、M20I、M81L、A92G、N109DまたはV263Lのうち1つを有する配列番号2を含む、CD20抗体、ならびにそれらの製造および使用の方法を提供する。

10

【0045】

本発明はまた、単離された安定化抗CD20抗体ならびにそれらの製造および使用の方法を提供し、ここで、その軽鎖アミノ酸配列は、W46LまたはW46Iアミノ酸変化を有するまたは有さない配列番号1を含み、その重鎖アミノ酸配列は、M20L、M20I、M81L、A92G、N109DまたはV263Lアミノ酸変化を有する配列番号2を含み；その重鎖アミノ酸配列は、M20L、M20I、M81L、A92GおよびN109Dアミノ酸変化を有する配列番号2を含み；その重鎖アミノ酸配列は、M20L、M20I、M81LおよびA92Gアミノ酸変化を有する配列番号2を含む。

20

【0046】

本発明はさらに、単離された安定化抗CD20抗体ならびにそれらの製造および使用の方法を提供し、ここで、該抗体は、その重鎖または軽鎖のいずれかが、例えば示差走査熱量測定(DSC)、円二色性(CD)分光法、蛍光発光分光法、核磁気共鳴(NMR)分光法、サイズ排除クロマトグラフィー(chromatography)または熱的チャレンジアッセイが挙げられる当業者に公知の任意の適切な方法によって測定した場合に、対応する野生型抗CD20抗体の重鎖または軽鎖よりも優れた熱安定性を有する場合に、安定化しているとみなされる。

【0047】

他の実施形態では、本発明は、アミノ酸配列変化の結果として、同じ量の野生型抗CD20抗体と比較した場合に、抗原結合活性、有効期間、血清半減期、AUCまたは $C_{m a x}$ の増強を有する抗CD20抗体を生じる、安定化抗CD20抗体ならびにそれらの製造および使用の方法を提供する。

30

【0048】

本発明は、例えば核酸がRNAまたはDNAである場合を含む、本明細書に記載される安定化抗CD20抗体の軽鎖または重鎖をコードする単離された核酸を提供する。本発明はまた、例えば上記発現が誘導性である場合を含む、上記核酸のうちいずれか1つまたは複数の発現を指示する単離されたベクター(即ち、モノシストロン性、ビストロン性またはポリシストロン性のベクター)を提供する。従って、本発明は、例えば細胞がチャイニーズハムスター卵巣細胞である場合を含む、これらのベクターのうち1つまたは複数を含む原核生物細胞および真核生物細胞を提供する。上記細胞は、上記ベクターで安定にまたは一過性に形質転換され得、上記抗CD20の軽鎖および重鎖の発現は、構成的または誘導性であり得る。

40

【0049】

本発明は、単離された抗CD20抗体ならびにそれらの製造および使用の方法を提供し、ここで、この抗CD20抗体の軽鎖または重鎖アミノ酸配列は、該抗体がCD20分子に結合する能力、補体を固定する能力、CD-20発現細胞をオプソニン化する能力、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を活性化する能力、抗体依存性プログラム細胞死を活性化する能力、マクロファージ依存性抗CD20免疫応答を活性化する能力、化学療法に対して感受性のCD20保有細胞を活性化する能力を増強するか、または該抗CD20抗体が

50

補体を固定する能力を低減させるさらなるアミノ酸配列変化、ならびにそれらの組合せを有する（例えば、米国特許第 8,084,582 号を参照のこと）。

【0050】

本発明は、単離された安定化抗 CD20 抗体ならびにそれらの製造および使用の方法を提供し、ここで、この抗 CD20 抗体は、例えば、エフェクターが、放射性同位体、化学療法剤、毒素、生体応答改変因子（biologic response modifier）または第 2 の抗体である場合を含むエフェクターに結合している。本発明の単離された抗 CD20 抗体はまた、PEG、アルブミンまたはポリシアル酸に結合している抗 CD20 抗体ならびにその製造および使用の方法を含む。従って、本発明は、本明細書に記載される安定化抗 CD20 抗体のうちいずれか 1 つおよび薬学的に許容されるキャリアを含む薬理的組成物を提供する。

10

【0051】

免疫原性および免疫応答を回避するために、ヒト化 CD20 結合性抗体または Fab'、Fab もしくは Fab2 などの適切な断片を使用することがしばしば好ましい。ヒト化抗体またはその断片は、例えば以下を含む任意の適切な方法によって産生され得る：1) ヒト化抗体は、ヒト IgG 骨格を使用し、その可変 CDR 領域を、CD20 に対する抗体の可変 CDR 領域で置き換えることによって構築され得、この重鎖および軽鎖は、別々のプロモーターの下で独立して発現するか、または IRES 配列を有する 1 つのプロモーターの下で共発現する；2) ヒト化モノクローナル抗体は、ヒト免疫系を有するように操作されたマウスを使用して CD20 に対して出現させることができる；3) CD20 に対するヒト化抗体は、ファージミド（M13、ラムダ大腸菌ファージまたは表面提示が可能な任意のファージ系）を使用して出現させることができる。完全抗体の発現は、例えば、CHO 細胞または 293 細胞などの哺乳動物細胞における重鎖および軽鎖の共発現によって達成され得る。同様に、Fab'、Fab または Fab2 断片および単鎖抗体は、当業者に公知の任意の適切な方法を使用して調製し得る。

20

【0052】

モノクローナル抗体をヒト化するための 4 つの一般的なステップが存在する。これらは以下である：(1) 出発抗体軽鎖および重鎖可変ドメインのヌクレオチド配列および予測アミノ酸配列を決定するステップ、(2) ヒト化抗体を設計するステップ、即ち、上記ヒト化プロセスの間に使用する抗体フレームワーク領域を決定するステップ、(3) 実際のヒト化方法論/技術、ならびに(4) 該ヒト化抗体のトランスフェクションおよび発現。例えば、米国特許第 4,816,567 号；米国特許第 5,807,715 号；米国特許第 5,866,692 号；米国特許第 6,331,415 号；米国特許第 5,530,101 号；米国特許第 5,693,761 号；米国特許第 5,693,762 号；米国特許第 5,585,089 号；米国特許第 6,180,370 号；および米国特許第 6,548,640 号（これらは参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと。例えば、定常領域は、上記抗体がヒトにおける臨床試験および処置において使用される場合に免疫応答を回避するために、ヒト定常領域に対してより似るように操作され得る。例えば、米国特許第 5,997,867 号および米国特許第 5,866,692 号（これらは参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

30

40

【0053】

あるいは、抗体は、ファージディスプレイ技術によってスクリーニングおよび組換え作製され得る。例えば、米国特許第 5,565,332 号；米国特許第 5,580,717 号；米国特許第 5,733,743 号および米国特許第 6,265,150 号（これらは参照によって本明細書に組み込まれる）を参照のこと。あるいは、上記ファージディスプレイ技術（McCaffertyら、Nature 348 巻：552～553 頁（1990 年））は、ヒト抗体および抗体断片を *in vitro* で産生するために使用され得る。

【0054】

安定化抗 CD20 抗体の生成

50

【0055】

本発明によって提供される安定化抗CD20抗体は、「部位特異的変異誘発」によって生成させた。部位特異的変異誘発は、所定の新たな配列を生成するように、特定の部位でDNA配列を変化させる確立された組換えDNA技術である。任意の適切な部位特異的変異誘発技術が、本発明に従って使用され得る。部位特異的変異誘発のための1つの例示的な適切な技術は、オリゴヌクレオチドミスマッチ変異誘発である。この技術は、クローニングされた遺伝子への所定の単一のヌクレオチド変化を導入するために、*in vitro* DNA合成を使用する。一般的アプローチは、単鎖組換えDNAの回収を可能にするM13またはファージミドベクターへと遺伝子またはcDNAをクローニングするステップを含む。次いで、その配列が、変異される領域における遺伝子配列に対して相補的であるが、意図した変異部位において単一ヌクレオチドの差異を有する、変異原性オリゴヌクレオチドが設計される。この変異原性オリゴヌクレオチドは、所望の変異を含む相補的全長配列を生じる新たなDNA合成を開始させるように作用する。変異体および野生型配列は、アニーリングして、ヘテロ二重鎖を形成する。これらのヘテロ二重鎖は、細胞を形質転換するために使用され、所望の変異体遺伝子は、この変異についてスクリーニングすることによって同定され得る。

10

【0056】

PCRによる部位特異的変異誘発は、当業者に周知であり、塩基の置換、欠失および挿入を可能にする多数の適切な戦略が存在する。部位特異的変異誘発のための1つのかかる適切なPCR技術は、所望の配列変化を含む改変されたPCRプライマーを使用する。このPCRプライマー配列は、元の配列を単に置き換える（その変化が、意図した標的に該プライマーがアニーリングするのを可能にするのに最小限に十分である限りにおいて）（例えば、Kadowaki Hら：「Use of polymerase chain reaction catalysed by Taq DNA Polymerase for site-specific mutagenesis」、Gene (1989年) 76巻(1号)：161～166頁を参照のこと）。

20

【0057】

「オーバーラップ伸長PCR」は、部位特異的変異誘発のための別の適切で例示的な技術であり、標的領域を変異させるためにネステッドPCRプライマーを使用する。オーバーラップ末端を有する2つのDNA断片を生成するために、相補的PCRプライマーおよびポリメラーゼ連鎖反応が使用される。これらの断片は、上記オーバーラップ末端がアニーリングし、各鎖の3'オーバーラップが相補鎖の3'伸長のためのプライマーとして作用するのを可能にする、その後の「融合」反応において結び付けられる。得られた融合産物は、PCRによってさらに増幅される。ヌクレオチド配列における特異的変更は、オーバーラップするプライマーへとヌクレオチド変化を組み込むことによって導入され得る（例えば、Ho SNら：「Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction」、Gene (1989年) 77巻(1号)：51～59頁を参照のこと）。

30

【0058】

部位特異的変異誘発のためのなお別の適切で例示的な技術は、「インバースPCR」を使用する。この技術は、プラスミドを変異させるために使用される。この技術は、プラスミド全体を増幅するために2つの背中合わせのプライマーを使用し、その線状産物は、次いでライゲーションして環状形態に戻される。プライマー結合領域は、プライマー配列を所望の変異を含むように変更することによって変化させることができる（例えば、Hemley Aら：「A simple method for site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction」、Nucleic Acids Res. (1989年) 17巻(16号)：6545～6551頁を参照のこと）。

40

【0059】

50

配列番号 1 もしくは 2 または配列番号 1 もしくは 2 の一部のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を有する任意の適切なポリヌクレオチドが、本発明に従う部位特異的変異誘発のための出発材料として使用され得る。米国特許第 5, 843, 439 号（これは、その全体が本明細書中に記載されているかのように、参照によって本明細書に組み込まれる）中に開示されている配列番号 1 もしくは 2 または配列番号 1 もしくは 2 の一部のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードする核酸配列を有するポリヌクレオチドは、本発明に従う部位特異的変異誘発のための出発材料として十分適している。

【0060】

熱安定性を評価する

【0061】

熱安定性は、任意の適切な技術を使用して本発明の組成物の融点（ T_m ）を測定することによって評価され得る。上記融点は、組成物の分子の 50% が折り畳まれた状態にある熱転移曲線の midpoint の温度である。

【0062】

熱安定性は、熱量測定によって評価され得る。例示的な熱量測定方法は、示差走査熱量測定（DSC）である。DSC は、ほとんどのタンパク質またはタンパク質ドメインのアンホールディングに付随する熱吸収度に対して感受性である熱量計を使用する（例えば、参照によって本明細書に組み込まれる Sanchez - Ruiz ら、*Biochemistry*、27 巻：1648 ~ 52 頁、1988 年を参照のこと）。タンパク質の熱安定性を決定するために、該タンパク質の試料が熱量計に挿入され、抗体、軽鎖または重鎖の高次構造がほぐされるまで、温度を上昇させる。上記タンパク質の高次構造がほぐされる温度は、全体的なタンパク質安定性を示す。

【0063】

熱安定性は、分析的分光法によって評価され得る。例示的な分析的分光法は、円二色性（CD）分光法である。CD 分光法は、漸増する温度の関数として、組成物の光学活性を測定する。円二色性（CD）分光法は、構造的非対称性に起因して生じる、左回り偏光対右回り偏光の吸収における差異を測定する。不規則構造または高次構造がほぐされた構造は、規則構造または折り畳まれた構造のものとは非常に異なる CD スペクトルを生じる。この CD スペクトルは、漸増する温度の変性効果に対するタンパク質の感受性を反映し、従って、タンパク質の熱安定性を示す（例えば、van Mierlo および Steemsmas、*J. Biotechnol.*、79 巻（3 号）：281 ~ 98 頁、2000 年を参照のこと）。

【0064】

熱安定性を測定するための別の例示的な分析的分光法は、蛍光発光分光法である。熱安定性を評価するための蛍光ベースの方法は、熱的アンホールディングの際の内因性のフルオロフォア（例えば、トリプトファンおよびチロシンアミノ酸）または外因性のフルオロフォア（例えば、ANS または SYPRO Orange）の蛍光における変化をモニタリングする（例えば、Niesen F. H.、Berglund H. および Vedadi M.：The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. *Nature Protocols* 2007 年、2 巻：2212 ~ 21 頁を参照のこと）。抗体、軽鎖または重鎖の熱安定性を測定するためのなお別の例示的な分析的分光法は、核磁気共鳴（NMR）分光法である（例えば、van Mierlo および Steemsmas、*J. Biotechnol.*、79 巻（3 号）：281 ~ 98 頁、2000 年を参照のこと）。

【0065】

組成物の熱安定性（the thermal stability of a composition of the）は、生化学的にも測定され得る。熱安定性を評価するための例示的な生化学的方法は、熱的チャレンジアッセイである。「熱的チャレンジアッ

10

20

30

40

50

セイ」では、本発明の組成物は、一定期間にわたって一連の上昇した温度に供される。例えば、試験抗体、軽鎖もしくは重鎖分子、s c F v分子、またはs c F v分子を含む分子が、例えば0.1～1.5時間にわたって、一連の漸増する温度に供され得る。上記タンパク質の活性が次いで、適切な生化学的アッセイによってアッセイされる。例えば、このタンパク質が結合性タンパク質（例えば、プロテインAに結合する）である場合、この結合性タンパク質の結合活性は、機能的アッセイまたは定量E L I S Aによって決定され得る。

【0066】

さらに、かかるアッセイは、ハイスループット形式で行われ得る。例えば、かかる実施形態では、s c F vバリエーションのライブラリーが、当該技術分野で公知の方法を使用して創製され得る。s c F v発現が誘導され得、s c F vが熱的チャレンジに供され得る。そのチャレンジされた試験試料は、結合についてアッセイされ得、安定であるs c F vは、スケールアップされ得る、およびさらに特徴付けされ得る。

10

【0067】

関連の技術では、熱安定性は、分析的熱量測定技術（例えば、D S C）を使用して、本発明の組成物の比熱または熱容量（C p）を測定することによって評価される。組成物の比熱は、1 m o lの水の温度を1 上昇させるために必要とされるエネルギー（例えば、k c a l / m o lで表される）である。大きいC pは、変性したまたは不活性なタンパク質組成物の品質証明である。組成物の熱容量（C p）における変化は、その熱転移の前および後に組成物の比熱を決定することによって測定される。他の実施形態では、熱安定性は、アンホールディングのギブズ自由エネルギー（G）、アンホールディングのエンタルピー（H）またはアンホールディングのエントロピー（S）を含む熱力学的安定性の他のパラメータを測定または決定することによって評価され得る。

20

【0068】

安定化抗C D 2 0抗体の製造

【0069】

本発明によって提供される安定化抗C D 2 0抗体は、当業者に周知の技術を使用して、合成、検出、定量化および精製され得る。例えば、安定化抗C D 2 0抗体の軽鎖および重鎖を構成するポリペプチドを発現する細胞は、当業者に周知の方法によって、安定化抗C D 2 0抗体の軽鎖および重鎖を構成するポリペプチドの発現を駆動するために、適切な原核生物細胞または真核生物細胞へとトランスフェクトまたは形質転換させたベクターにおける強いプロモーター/翻訳開始シグナルの制御下にc D N Aを配置することによって、生成され得る。

30

【0070】

あるいは、安定化抗C D 2 0抗体の軽鎖および重鎖を構成するポリペプチドは、当業者に周知の方法によって化学的に作製され得る。安定化抗C D 2 0抗体の軽鎖および重鎖を構成するポリペプチドは、標準的な固相合成によって調製し得る。当業者に一般に公知のように、必要な長さのペプチドは、干渉基（i n t e r f e r i n g g r o u p）をブロックするため、反応させるアミノ酸を保護するため、カップリングするため、脱保護のため、および未反応の残基のキャッピングのために、製造者の指示に従って市販の機器および試薬を使用して調製し得る。例えば、軽鎖および重鎖ペプチドは、t - ブトキシカルボニル - アルファ - アミノ酸を使用する適切な側鎖保護を用いて、標準的な自動化固相合成プロトコールを使用して合成され得る。完成したペプチドは、標準的なフッ化水素方法を使用する同時側鎖脱保護を用いて、固相支持体から取り出される。粗製ペプチドは、0.1%トリフルオロ酢酸（T F A）中のアセトニトリル勾配を使用して、半分取逆相H P L C（V y d a c C 1 8）によってさらに精製する。これらのペプチドは、アセトニトリルを除去するために真空乾燥され、水中0.1%のT F A溶液から凍結乾燥される。純度は、分析的R P - H P L Cによって検証され得る。これらのペプチドは、凍結乾燥され得、次いで、重量で1～2 m g / m Lの濃度で、水または0.01 M酢酸のいずれかに可溶化し得る。適切な機器は、例えばA p p l i e d B i o S y s t e m s、F o s

40

50

ter City、CAまたはBiosearch Corporation、San Raphael、CAから得ることができる。

【0071】

本発明は、安定化抗CD20抗体の軽鎖および重鎖を構成するポリペプチドの一方または両方をコードするポリヌクレオチド配列の発現を制御するエレメントを含む組換えベクターもまた提供する。さらに、本発明は、かかるポリペプチドをコードする核酸を含む細胞を提供し、この細胞は、原核生物細胞または真核生物細胞である。微生物および組織培養の方法は、当業者に周知である（例えば、SambrookおよびRussell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York（2001年）、16.1～16.54頁を参照のこと）。本発明は従って、安定化抗CD20抗体の軽鎖および重鎖を構成するポリペプチドを作製する方法を提供し、この方法は以下を含む：（a）安定化抗CD20抗体の軽鎖および/または重鎖ポリペプチドをコードする核酸で細胞を形質転換するステップ；（b）その形質転換した細胞によるこれらのポリペプチドの発現を誘導するステップ；（c）該ポリペプチドを精製するステップ；ならびに（d）機能的抗体をアSEMBLするステップ。

10

【0072】

ポリペプチド発現は、DNAシグナルによって次に調節されるRNA転写のレベルに依存する。同様に、mRNAの翻訳は、そのコード配列の5'末端の10～100ヌクレオチド以内に通常は位置するAUG開始コドンをもっと必要とする。AUG開始コドンに隣接する配列は、その認識に影響を与えることが示されている。例えば、真核生物リボソームによる認識のために、完全な「Kozakコンセンサス」配列に準拠して配列に埋め込まれたAUG開始コドンが、最適な翻訳を生じる（例えば、Kozak、J. Mol. Biol. 196巻：947～950頁（1987年）を参照のこと）。また、細胞における外因性核酸の首尾良い発現は、得られるタンパク質の翻訳後修飾を必要とし得る。

20

【0073】

本明細書に記載される核酸分子は、好ましくは、真核生物細胞において機能的なプロモーターなどの適切なプロモーターに作用的に連結したコード領域を含む。例えばRSVプロモーターおよびアデノウイルス主要後期プロモーターであるがこれらに限定されないウイルスプロモーターが、本発明において使用され得る。適切な非ウイルスプロモーターには、ホスホグリセロキナーゼ（PGK）プロモーターおよび伸長因子1プロモーターが挙げられるがこれらに限定されない。非ウイルスプロモーターは、望ましくは、宿主細胞の種から誘導される。その多くが当該技術分野で公知のさらなる適切な遺伝的エレメントもまた、さらなる機能、発現のレベルまたは発現のパターンを提供するために、本発明の核酸および構築物に結合し得るまたは本発明の核酸および構築物に挿入し得る。

30

【0074】

さらに、本明細書に記載される核酸分子は、転写を促進するために、エンハンサーに作用的に連結し得る。エンハンサーは、隣接遺伝子の転写を刺激するDNAのシス作用性エレメントである。多くの種由来の多数の異なる細胞型において、連結した遺伝子に対し高レベルの転写を付与するエンハンサーの例には、SV40およびRSV-LTR由来のエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。かかるエンハンサーは、細胞型特異的な効果を有する他のエンハンサーと組み合わせられ得るか、または任意のエンハンサーが単独で使用され得る。

40

【0075】

真核生物細胞におけるタンパク質産生を最適化するために、本発明の核酸分子は、この核酸分子のコード領域の後ろにポリアデニル化部位をさらに含み得る。所望の場合、上記外因性核酸もまた、インフレイムの全長転写物を維持しながらmRNA産生を促進するために、スプライス部位（即ち、スプライスアクセプター部位およびスプライスドナー部位）を組み込み得る。さらに、本発明の核酸分子は、プロセッシング、分泌、細胞内局在化な

50

どに適した配列をさらに含み得る。

【0076】

これらの核酸分子は、任意の適切なベクターへと挿入し得る。適切なベクターには、ウイルスベクターが挙げられるがこれに限定されない。適切なウイルスベクターには、レトロウイルスベクター、アルファウイルスベクター、ワクシニアベクター、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクターおよび鶏痘ウイルスベクターが挙げられるがこれらに限定されない。これらのベクターは、好ましくは、CHO-K1細胞などの真核生物細胞を形質転換する、天然または操作された能力を有する。さらに、本発明に関して有用なベクターは、プラスミドもしくはエピソームなどの「裸の(naked)」核酸ベクターであり得、またはこれらのベクターは、他の分子と複合体化され得る。本発明の核酸と適切に組み合わせられ得る他の分子には、ウイルスコート、カチオン性脂質、リボソーム、ポリアミン、金粒子、および細胞性分子を標的とするリガンド、受容体もしくは抗体などのターゲティング部分が挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0077】

本明細書に記載される核酸分子は、任意の適切な細胞、典型的には真核生物細胞、例えば、CHO、HEK293もしくはBHKなどへと形質転換され得、望ましくは、本明細書に記載される配列番号1もしくは2またはそれらのパリアントもしくはホモログから構成されるポリペプチドなどの軽鎖または重鎖ポリペプチドの発現を生じる。この細胞は、核酸分子の発現を提供するために培養され得る。

20

【0078】

従って、本発明は、本明細書に記載される本発明の核酸分子で形質転換またはトランスフェクトした細胞を提供する。細胞を外因性DNA分子で形質転換またはトランスフェクトする手段は、当該技術分野で周知である。例えば、限定ではなく、DNA分子は、リン酸カルシウムまたはDEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、プロトプラスト(protoblast)融合、エレクトロポレーション、リボソーム、カチオン性脂質および直接的マイクロインジェクションなどの当該技術分野で周知の標準的な形質転換またはトランスフェクション技術を使用して、細胞へと導入される(例えば、SambrookおよびRussell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York(2001年)、1.1~1.162頁、15.1~15.53頁、16.1~16.54頁を参照のこと)。

30

【0079】

形質転換方法の別の例は、プロトプラスト融合方法であり、高コピー数の対象のプラスミドを保有する細菌由来のプロトプラストは、培養された哺乳動物細胞と直接混合される。細胞膜の融合(通常、ポリエチレングリコールを用いる)の後、細菌の内容物は、哺乳動物細胞の細胞質へと送達され、プラスミドDNAは、核に移行される。

【0080】

種々の哺乳動物細胞および植物細胞への短時間の高電圧電気パルスの適用であるエレクトロポレーションは、形質膜におけるナノメートルサイズの孔の形成を導く。DNAは、これらの孔を介してまたは孔の閉鎖に伴う膜構成成分の再分布の結果として、細胞の細胞質へと直接取り込まれる。エレクトロポレーションは、極めて効率的であり得、クローン遺伝子の一過性の発現のため、および対象の遺伝子の統合されたコピーを保有する細胞系の樹立のための両方に使用され得る。

40

【0081】

かかる技術は、真核生物細胞の安定な形質転換および一過性の形質転換の両方のために使用され得る。安定に形質転換した細胞の単離は、対象の遺伝子を用いた形質転換と併せて、選択マーカーの導入を必要とする。かかる選択マーカーには、ネオマイシンならびにHPRT陰性細胞におけるHPRT遺伝子に対する抵抗性を付与する遺伝子が挙げられる。あるいは、安定な形質転換体は、DHFR含有ベクターを使用して、DHFR陰性であ

50

るCHO-DG44などの細胞において作製され得る。選択は、少なくとも約2~7日間、好ましくは少なくとも約1~5週間にわたる、選択培地中での長期培養を必要とし得る(例えば、SambrookおよびRussell、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、New York(2001年)、16.1~16.54頁を参照のこと)。高い抗体産生力を有する真核生物細胞系は、抗体遺伝子を増幅可能な遺伝子(例えば、DHFR)に連結する転写的に活性な領域または系への抗体構築物の挿入に依存する発現系を使用して取得され得る。

【0082】

安定化抗CD20抗体ポリペプチドの軽鎖または重鎖は、組換え宿主細胞から発現および精製され得る。組換え宿主細胞は、E. coliなどの細菌、酵母などの真菌細胞、drosophilaおよびカイコ由来の細胞系が挙げられるがこれらに限定されない昆虫細胞、ならびに哺乳動物の細胞および細胞系が挙げられるがこれらに限定されない、原核生物細胞または真核生物細胞であり得る。

10

【0083】

原核生物における最適なポリペプチド発現のために考慮すべき問題には、使用される発現系、宿主株の選択、mRNA安定性、コドンバイアス、インクルージョンボディの形成および防止、融合タンパク質および部位特異的タンパク質分解、区画指向性の分泌が挙げられる(例えば、参照によって本明細書に組み込まれる、Sorensenら、Journal of Biotechnology 115巻(2005年)113~128頁を参照のこと)。

20

【0084】

発現は通常、遺伝的背景に適合する系を内に有するプラスミドから誘導される。発現プラスミドの遺伝的エレメントには、複製起点(ori)、抗生物質抵抗性マーカー、転写プロモーター、翻訳開始領域(TIR)ならびに転写および翻訳ターミネーターが挙げられる。

【0085】

任意の適切な発現系が使用され得、例えば、E. coliは、その相対的な単純さ、高密度培養、周知の遺伝学、ならびにポリペプチド発現のために利用可能な種々の利用可能なプラスミド、組換え融合パートナーおよび変異株を含む多数の適合するツールにより、タンパク質発現を促進する。組換え発現のためのE. coli株または遺伝的背景は非常に重要である。発現株は、最も有害な天然プロテアーゼが欠損し、発現プラスミドを安定に維持し、発現系にとって適切な遺伝的エレメントを付与するべきである(例えば、DE3)。

30

【0086】

プラスミドコピー数は、好ましくは緩慢な様式で複製する複製起点によって制御される。現代の発現プラスミドに存在するColE1レプリコンは、pBR322(コピー数15~20)またはpUC(コピー数500~700)ファミリーのプラスミドから誘導されるが、p15Aレプリコンは、pACYC184(コピー数10~12)から誘導される。組換え発現プラスミドにおける最も一般的な薬物抵抗性マーカーは、アンピシリン、カナマイシン、クロラムフェニコールまたはテトラサイクリンに対する抵抗性を付与する。

40

【0087】

適切なE. coli発現系には、一般的なpUCベクター、T7ベースのpET発現系(EMD Chemicals Inc.、Gibbstown、NJ; Agilent Technologies, Inc.、Wilmington、DE)、ラムダPLPプロモーター/cIリプレッサー(例えば、pLEX(Life Technologies、Grand Island、NY))、Trcプロモーター(例えば、pTrc(GE Healthcare Biosciences、Piscataway、NJ))、Tacプロモーター(例えば、pGEX(GE Healthcare Biosci

50

ences、Piscataway、NJ))およびハイブリッドlac/T5(例えば、pQE(Qiagen、Valencia、CA))およびBADプロモーター(例えば、pBAD(Life Technologies、Grand Island、NY))が挙げられるが、これらに限定されない。

【0088】

転写されたメッセージRNAの翻訳開始領域(TIR)からの翻訳開始は、シャイン-ダルガーノ(SD)配列および翻訳開始コドンを含むリボソーム結合部位(RBS)を必要とする。上記シャイン-ダルガーノ配列は、効率的な組換え発現系における標準的な(canonical)AUGである開始コドンの7±2ヌクレオチド上流に位置する。最適な翻訳開始は、SD配列UAGGAGGを有するmRNAから取得される。

10

【0089】

E.coliにおけるコドン使用頻度は、その細胞質において利用可能な同種のアミノ-アシル化tRNAのレベルによって反映される。メジャーコドンは、高度に発現する遺伝子に存在するが、マイナーまたは稀なコドンは、低レベルで発現する遺伝子に存在する傾向がある。E.coliにおいて稀なコドンは、真核生物、古細菌および異なるコドン頻度の優先傾向を有する他の遠縁の生物などの供給源由来の異種遺伝子に、豊富であることが多い。稀なコドンを含む遺伝子の発現は、マイナーコドンtRNAにカップリングしたアミノ酸の組込みを必要とする位置での、リボソーム停止の結果として、翻訳エラーを導き得る。コドンバイアス問題は、ダブレットおよびトリプレットなどのクラスターにおける稀なコドンを含む転写物が大量に蓄積する場合、組換え発現系において高度に優勢となる。in vitroであれin vivoであれ、非ヒト細胞において安定化抗CD20抗体ポリペプチドの軽鎖または重鎖を発現させる場合、該ペプチドをコードするかかるポリヌクレオチドについて選択されるコドンは、所与の細胞型(即ち、種)について最適化され得る。コドン最適化のための多数の技術は、当該技術分野で公知である(例えば、Jayarajら、Nucleic Acids Res. 33巻(9号):3011~6頁(2005年);Fuglsangら、Protein Expr. Purif. 31巻(2号):247~9頁(2003年)を参照のこと)。

20

【0090】

タンパク質の活性は、正確な3次元構造への折り畳みを要求する。ヒートショックなどのストレス状況は、in vivoで折り畳みを損ない、折り畳み中間体は、インクルージョンボディと称される無定形なタンパク質顆粒へと会合する傾向がある。

30

【0091】

インクルージョンボディは、組換えタンパク質が高い率で発現する場合に、ストレス応答として生じることがしばしば理解される、一群の構造的に複雑な凝集体である。E.coliの細胞質中200~300mg/mlの濃度でのタンパク質の巨大分子密集は、特に組換え体の高レベル発現の間の、高度に望ましくないタンパク質折り畳み環境を示唆する。高次構造がほぐされた鎖上の露出したパッチ間の疎水性相互作用によってまたは特異的クラスタリング機構によって生じる受動的現象を介してインクルージョンボディが形成するかどうかは、未知である。精製された凝集体は、尿素および塩酸グアニジン(guanidinium hydrochloride)などの洗剤を使用して、可溶化し得る。機能的タンパク質は、希釈、透析またはオンカラム再折り畳み方法のいずれかによって、可溶化したインクルージョンボディから、in vitroの再折り畳みによって調製し得る。再折り畳み戦略は、分子シャペロンの含有(inclusion)によって改善され得る。しかし、所与のタンパク質に対する再折り畳み手順の最適化は、時間のかかる努力を必要とし、高い産物収量にいつも貢献するわけではない。インクルージョンボディ形成の防止のための可能な戦略は、分子シャペロンの共過剰発現である。

40

【0092】

広範なタンパク質融合パートナーが、組換えタンパク質の精製および発現を単純化するために開発されてきた。融合タンパク質またはキメラタンパク質は通常、特異的プロテアーゼの認識部位によってパッセージまたは標的タンパク質に連結したパートナーまた

50

は「タグ」を含む。ほとんどの融合パートナーが、特異的親和性精製戦略のために利用される。融合パートナーは、細胞内タンパク質分解からパッセンジャーを保護し得、溶解性を増強し得、または特異的発現レポーターとして使用され得る場合にもまた、*in vivo*で有利である。高い発現レベルは、ほとんどおそらくはmRNA安定化の結果として、N末端融合パートナーから貧弱に発現するパッセンジャーへとしばしば移され得る。一般的な親和性タグは、固定化した金属アフィニティークロマトグラフィー (IMAC) と適合するポリヒスチジンタグ (Hisタグ) およびグルタチオンベースの樹脂での精製のためのグルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST) タグである。いくつかの他の親和性タグが存在し、広範に調べられている。

【0093】

組換え発現したタンパク質は原則として、3つの異なる位置、即ち、細胞質、ペリプラズムまたは培養培地へと向けられ得る。種々の利点および欠点は、特定の細胞区画への組換えタンパク質の指向 (direction) に関連する。産生収量が高いので、細胞質における発現が通常好ましい。ジスルフィド結合の形成は、*E. coli*において隔離されており、Dsb系によってペリプラズム中で活発に触媒される。あるいは、trxB株およびgor株が使用され得る。その細胞質におけるシステインの還元は、チオレドキシンおよびグルタレドキシンによって達成される。チオレドキシンは、チオレドキシンレダクターゼによって還元されたままに維持され、グルタレドキシンは、グルタチオンによって還元されたままに維持される。低分子量グルタチオン分子は、グルタチオンレダクターゼによって還元される。2つのレダクターゼをコードするtrxB遺伝子およびgor遺伝子の破壊は、*E. coli*の細胞質におけるジスルフィド結合の形成を可能にする。

【0094】

*in vitro*での遺伝子発現およびタンパク質合成のための無細胞系が、多数の異なる原核生物および真核生物の系について記載されている (例えば、EndoおよびSawasaki Current Opinion in Biotechnology 2006年、17巻: 373~380頁を参照のこと)。ウサギ網状赤血球ライセートおよびコムギ胚芽抽出物などの真核生物無細胞系は、*in vitro*転写されたRNA鋳型の翻訳に必要とされる全ての構成成分を含む粗製抽出物から調製する。真核生物無細胞系は、翻訳反応のための鋳型として*in vivo*または*in vitro*で合成された単離されたRNAを使用する (例えば、ウサギ網状赤血球ライセート系またはコムギ胚芽抽出物系)。カップリングした真核生物無細胞系は、原核生物ファージRNAポリメラーゼを真核生物抽出物と組み合わせ、*in vitro*タンパク質合成のためにファージプロモーターと共に外因性DNAまたはPCR生成した鋳型を利用する (例えば、TNT (登録商標) Coupled Reticulocyte Lysate

【0095】

安定化抗CD20抗体ポリペプチドの精製された軽鎖または重鎖の溶解性は、当該技術分野で公知の方法によって改善され得る。例えば、発現したタンパク質 (例えば*E. coli*中で) の溶解性を増加させるために、GeorgiouおよびValax、Current Opinion Biotechnol. 7巻: 190~197頁 (1996年) に記載されるように、増殖温度を低下させ、より弱いプロモーターを使用し、より低いコピー数のプラスミドを使用し、誘導因子濃度を低下させ、増殖培地を変えることによって、タンパク質合成の速度を低減させることができる。これは、タンパク質合成の速度を減少させ、通常はより可溶性のタンパク質が取得される。適切な折り畳みもしくはタンパク質安定性に重要な補欠分子族 (prosthetic group) もしくは補因子を添加すること、または増殖の間の培地のpHのゆらぎを制御するためのバッファを添加すること、または最もリッチな培地 (例えば、LB、2xYT) 中に存在するラクトースによるlacプロモーターの誘導を抑制するために、1%グルコースを添加することもできる。ポリオール (例えば、ソルビトール) およびスクロースは、これらの添加によって引き起こされる浸透圧の増加が、ネイティブのタンパク質構造を安定化する浸透圧保護剤の、細胞における蓄積を導くので、これらもまた培地に添加され得る。エタノール、低分

10

20

30

40

50

子量チオールおよびジスルフィドならびにNaClが添加され得る。さらに、シャペロンおよび/またはフォルダーゼ(foldase)は、所望のポリペプチドと共に共発現され得る。分子シャペロンは、折り畳み中間体と一過性に相互作用することによって、適切な異性化および細胞ターゲティングを促進する。E.coliシャペロン系には、以下が挙げられるがこれらに限定されない: GroES-GroEL、DnaK-DnaJ-GrpE、CipB、FkpA、Skp。ペリプラズムペプチジル-プロリルシス, トランス-イソメラーゼFkpAが特に適切である。

【0096】

フォルダーゼは、折り畳み経路に沿った律速ステップを加速させる。3つの型のフォルダーゼが重要な役割を果たす: ペプチジルプロリルシス/トランスイソメラーゼ(PPi)(FkpA)、ジスルフィドオキシドレダクターゼ(DsbA)およびジスルフィドイソメラーゼ(DsbC)、タンパク質システイン酸化およびジスルフィド結合異性化の両方を触媒する真核生物タンパク質であるタンパク質ジスルフィドイソメラーゼ(PDI)。これらのタンパク質のうち1つまたは複数と標的タンパク質との共発現は、より高いレベルの可溶性標的タンパク質を導き得る。

10

【0097】

安定化抗CD20抗体ポリペプチドの軽鎖または重鎖は、その溶解性および産生を改善するために、融合タンパク質として産生され得る。この融合タンパク質は、安定化抗CD20抗体ポリペプチドの軽鎖または重鎖と、インフレイムと一緒に融合した第2のポリペプチドとを含む。この第2のポリペプチドは、融合するポリペプチドの溶解性を改善するための、当該技術分野で公知の融合パートナー、例えば、NusA、バクテリオフェリチン(BFR)、GrpE、チオレドキシン(TRX)、マルトース結合性タンパク質(MBP)およびグルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)であり得る。Novagen Inc. (Madison, WI)は、NusA-標的融合物の形成を可能にするpET43.1ベクターシリーズを提供する。DsbAおよびDsbCもまた、融合パートナーとして使用される場合、発現レベルに対する正の効果を示しており、従って、より高い溶解性を達成するためにペプチドリガンドメインと融合するために使用され得る。

20

【0098】

かかる融合タンパク質の一態様では、安定化抗CD20抗体ポリペプチドの発現した軽鎖または重鎖は、プロテアーゼによって加水分解可能なペプチド結合を含むプロテアーゼ切断部位を含むリンカーポリペプチドを含む。結果として、ポリペプチドにおけるペプチドリガンドメインは、タンパク質分解によって発現後に該ポリペプチドの残部から分離され得る。このリンカーは、上記プロテアーゼの触媒部位もまた結合する上記結合のいずれかの側に1つまたは複数の追加のアミノ酸を含み得る(例えば、SchecterおよびBerger, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27巻、157~62頁(1967年)を参照のこと)。あるいは、上記リンカーの切断部位は、上記プロテアーゼの認識部位とは別々であり得、その2つの切断部位および認識部位が、1つまたは複数(例えば2つ~4つ)のアミノ酸によって分離され得る。一態様では、このリンカーは、少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、約10、約20、約30、約40、約50またはそれより多くのアミノ酸を含む。より好ましくは、このリンカーは、約5~約25アミノ酸長であり、最も好ましくは、このリンカーは、約8~約15アミノ酸長である。

30

40

【0099】

例えば、細菌で産生した融合タンパク質と共に一般に使用される適切なプロテアーゼには、タバコエッチウイルス(TEV)プロテアーゼ、第Xa因子プロテアーゼ、トロンピンおよびエンテロキナーゼが挙げられる。本発明で有用ないくつかのプロテアーゼは、以下の参考文献において議論されている: Hooperら、Biochem. J. 321巻: 265~279頁(1997年); Werb、Cell 91巻: 439~442頁(1997年); Wolfsbergら、J. Cell Biol. 131巻: 2

50

75～278頁(1995年); MurakamiおよびEtlinger、Biochem. Biophys. Res. Comm. 146巻: 1249～1259頁(1987年)。細胞表面プロテアーゼもまた、本発明に従って切断可能なリンカーと共に使用され得、これには以下が挙げられるがこれらに限定されない: アミノペプチダーゼN; ピューロマイシン感受性アミノペプチダーゼ; アンジオテンシン変換酵素; ピログルタミルペプチダーゼII; ジペプチジルペプチダーゼIV; N-アルギニン二塩基性転換酵素; エンドペプチダーゼ24.15; エンドペプチダーゼ24.16; アミロイド前駆体タンパク質セクレターゼアルファ、ベータおよびガンマ; アンジオテンシン変換酵素セクレターゼ; TGFアルファセクレターゼ; TNFアルファセクレターゼ; FASリガンドセクレターゼ; TNF受容体-Iおよび-IIセクレターゼ; CD30セクレターゼ; KLL1およびKLL2セクレターゼ; IL6受容体セクレターゼ; CD43、CD44セクレターゼ; CD16-IおよびCD16-IIセクレターゼ; L-セレクチンセクレターゼ; 葉酸受容体セクレターゼ; MMP1、2、3、7、8、9、10、11、12、13、14および15; ウロキナーゼプラスミノゲン活性化因子; 組織プラスミノゲン活性化因子; プラスミン; トロンピン; BMP-1(プロコラーゲンC-ペプチダーゼ); ADAM1、2、3、4、5、6、7、8、9、10および11; ならびにグランザイムA、B、C、D、E、F、GおよびH。

10

【0100】

細胞会合型プロテアーゼに依存することの代替法は、自己切断型リンカーを使用することである。例えば、口蹄疫ウイルス(FMDV)2Aプロテアーゼがリンカーとして使用され得る。これは、2A/2B接合部においてFMDVのポリタンパク質を切断する、17アミノ酸の短いポリペプチドである。FMDV 2Aプロペプチドの配列は、NFDDLKLAGDVESNP GPである。切断は、最後のグリシン-プロリンアミノ酸対においてそのペプチドのC末端において生じ、他のFMDV配列の存在とは独立しており、異種配列の存在下でさえ切断する。

20

【0101】

アフィニティークロマトグラフィーは、安定化抗CD20抗体の軽鎖および重鎖を構成するポリペプチドの精製において、単独で、またはイオン交換、分子サイジングもしくはHPLCクロマトグラフィー技術と併せて使用され得る。かかるクロマトグラフィーによるアプローチは、カラムまたはパッチ形式を使用して実施され得る。かかるクロマトグラフィーによる精製方法は、当該技術分野で周知である。

30

【0102】

抗CD20抗体の大規模産生

【0103】

生物学的産物の2つの主要な型の組換え発現が存在し、一方は、チャイニーズハムスター卵巣細胞の使用において最も頻繁に見られる、該細胞によって栄養培地へと分泌される生物学的産物の可溶性形態であり、もう一方は、発現のためにE.coliを使用する場合に最も頻繁に見られる、インクルージョンボディを形成する細胞の内側での生物学的産物の保持である。遺伝子操作における最近の進歩は、インクルージョンボディとしてその内側で保持される代わりに、可溶性タンパク質を分泌する細菌の遺伝子をコードすることが可能になっている。これは、細胞溶解およびインクルージョンボディ可溶化の厄介なプロセスを回避するためである。

40

【0104】

任意の適切な方法が、抗CD20抗体を大規模で産生するために使用され得る。例えば、種々の容器(vessel)および方法が、商業的規模で微生物、特に細菌および酵母の発酵を実施するために、数年にわたって開発されてきた。数十万リットルのステンレス鋼の発酵容器は一般的であり、その発酵方法には、回分、流加、連続または半連続灌流が挙げられる。これらの容器内の細胞は望ましくは、典型的には、該容器中への空気、酸素または二酸化炭素の注入によってガス交換を促進し、容器内に位置する攪拌ブレードを回転させることによって、懸濁物で維持される。

50

【0105】

さらに、使い捨て発酵槽もまた当業者に公知である。かかる使い捨て発酵槽の例は、波振とう (wave agitation) に基づく系である (例えば、米国特許第 6,544,788 号; PCT 公開 WO 00/66706 を参照のこと)。この型の発酵槽は、単一の使い捨て容器 (container) 中で、比較的感受性の細胞、例えば、CHO 細胞 (例えば、Pierce、Bioprocessing J. 3 巻: 51~56 頁 (2004 年))、ハイブリドーマ細胞 (例えば、Lingら、Biotech. Prog.、19 巻: 158~162 頁 (2003 年))、昆虫細胞 (例えば、Weberら、Cytotech. 38 巻: 77~85 頁 (2002 年)) および足場依存性細胞 (例えば、Singh、Cytotech. 30 巻: 149~158 頁 (1999 年)) を培養するために使用され得る。かかる使い捨てユニットは、比較的安価であり、その単回の使用に起因して感染のリスクを減少させ、これらの容器が使用の間に存在するロックアッププラットフォームは、内部液体においてガス交換を促進する波様の形態を誘導するので、内部攪拌部品を必要としない。

10

【0106】

一態様では、別の適切な方法は、種々の生物学的産物を調製するために使用するためのバイオリクターを提供する (例えば、米国特許出願公開第 20110117538 号を参照のこと)。このバイオリクターは、栄養培地および生物学的培養物を含む所定の体積の液体を収容するために適切であり、以下: (a) 少なくとも 1 つの内壁を有する容器; (b) 少なくとも 1 つの入口; (c) 少なくとも 1 つの出口; (d) 少なくとも 1 つのガス入口; (e) 少なくとも 1 つのガス出口; および (f) 少なくとも 1 つのガス入口に取り付けられた少なくとも 1 つの円筒形スパージングフィルター、を含み、このスパージングフィルターは、ガスが該スパージングフィルターから液体へと放射状に放出されるようにする、その軸に沿って複数の孔を含み、この複数の孔の直径は、約 50 μm を超えず、該容器内の少なくとも 1 つのスパージングフィルターの配向は、該液体内の複数の孔の浸漬を提供し、該液体を通じた放出ガスの実質的に均質な分散を提供する。

20

【0107】

米国特許出願公開第 20110117538 号に開示されているかかるバイオリクター系の関連の態様は、栄養培地および生物学的培養物を含む所定の体積の液体から生物学的産物を産生する方法を提供し、この方法は、(a) バイオリクターを提供するステップ; (b) 栄養培地および生物学的培養物をその容器へと導入するステップ; (c) スパージングフィルターを介して液体へとガスを通させるステップ; (d) 所定の時間間隔で該液体中の細胞の密度を検出するステップ; ならびに (e) 該容器内の液体中の細胞の密度が所定の値に達した場合に、該液体およびそれにより産生された任意の生物学的産物を該容器から取り出すステップ、を含む。

30

【0108】

別の適切な方法は、米国特許出願公開第 20110198286 号に開示されているものなどのバイオリクターを提供する。この系は、生物学的産物を大量に結合することが可能な多くの樹脂の最近の利用可能性から利益を得る。ほとんどの現代の樹脂は、樹脂 1 mL 当たり 20~125 mg の間の生物学的産物を結合する。これらの樹脂の多くは、生物学的産物に対して高度に特異的であり、それらの多くは、組み合わせることにより、培養培地をバイオリクターから取り出す一方で、樹脂に結合した生物学的産物を保持するのに十分に強い物理化学的結合の単純なプロセスによって、溶液から任意の型および量の生物学的産物を取り出すことができる。生物学的産物精製の分野はここで、樹脂と該生物学的産物との間の結合を破壊する溶出緩衝液の pH、イオン強度または他の特徴を調整することによって、これらの結合した生物学的産物を該樹脂から溶出させる能力を有する。これは、さらなる精製の準備ができた、そして、ある場合には使用のための最終産物でさえあり得る、高度に濃縮された溶液としてのバイオリクターからの生物学的産物の取り出しを可能にする。

40

【0109】

50

カップリングした抗CD20抗体組成物

【0110】

本発明は、本明細書に開示される本発明の抗CD20抗体を含む組成物を提供する。好ましい実施形態では、この組成物は、抗CD20抗体および薬学的に許容されるキャリアを含む薬学的に許容される組成物である。

【0111】

抗体は、いくつかのエフェクター機構を介してがん性細胞を除去するように作用し得る。完全ヒトまたはキメラである抗体について、この分子のFc部分は、ヒト免疫系を効率的に活性化し得、ヒト免疫系と相互作用し得る。この方法によって、細胞は、免疫系の可溶性構成成分（補体）によってまたはADC媒介性の細胞死滅化を介して、破壊され得る。さらに、標的抗原への上記抗体の結合は、アポトーシスを導き得る生物学的応答を開始させ得る。さらに、抗体分子は、薬物、放射性同位体、毒素または酵素などの治療的部分を輸送するための送達ビヒクルとして使用され得る。

10

【0112】

本発明の組成物は、活性薬剤をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、この活性薬剤は、その薬理学的効果を直接発揮することができる薬学的に活性な治療剤または「エフェクター」である。他の実施形態では、この活性薬剤は診断剤である。いくつかの活性薬剤は、診断剤および治療剤の両方として有用であり、従って、かかる用語は相互に排他的ではないことが理解される。好ましい実施形態では、この活性薬剤は、抗CD20抗体にコンジュゲートまたはカップリングした診断的または治療的活性薬剤である。

20

【0113】

抗体またはその断片への適切な治療薬、化学療法薬、放射性核種などのカップリングまたはコンジュゲーションのための方法は、当該技術分野で十分に記載されている。例えば、限定ではなく、リシンのイプシロン-アミノ基などの、タンパク質中の遊離アミノ基は、カルボジイミド(carodimide)またはヘテロ二官能性剤(heterobiofunctional agent)などの試薬とコンジュゲートされ得る。あるいは、例えば、スルフヒドリル基が、コンジュゲーションに使用され得る。さらに、抗体を含む糖タンパク質に結合した糖部分は、当該技術分野で公知の多数のカップリング手順において有用なアルデヒド基を形成するために酸化され得る。本発明に従って形成されるコンジュゲートは、in vivoで安定であり得る、または酵素的に分解可能なテトラペプチド結合または酸不安定性シス-アコニチルもしくはヒドラゾン結合などのように不安定であり得る。さらに、本発明は、抗CD20抗体融合タンパク質を提供し、これには、例えば、重鎖もしくは軽鎖コード配列（またはそれらのコード断片、例えば、Fab、Fv、Fab'およびFab'2断片）が、診断的に有用なタンパク質ドメイン（例えば、ハプテン、GFP）、免疫学的に活性なタンパク質ドメイン（例えば、TFまたはTNF）または毒素ドメインの上流または下流と融合したものが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0114】

本発明の組成物は、上記活性薬剤単独の送達と比較して、疾患部位への該活性薬剤の送達を増強するために使用され得る。好ましい実施形態では、上記抗CD20抗体へのカップリングは、カップリングしていない活性薬剤によって上記疾患部位において達成されるレベルと比較して、少なくとも10%、少なくとも(at least)20%、少なくとも25%、少なくとも50%、少なくとも100%、少なくとも3倍、少なくとも5倍、少なくとも10倍、少なくとも20倍、少なくとも50倍、少なくとも100倍、その疾患部位において該活性薬剤のレベルを増加させる。

40

【0115】

本明細書で使用する場合、語句「間接的標識化」および「間接的標識化アプローチ」は共に、キレート剤が抗体に共有結合的に結合し、少なくとも1つの放射性核種が該キレート剤へと挿入されることを意味する。適切なキレート剤および放射性核種は、参照によって本明細書に組み込まれるSrivastava, S. C. およびMease, R

50

. C., 「Progress in Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies」、Nucl. Med. Bio. 18巻/6号: 589~603頁(1991年)に記載されている。特に好ましいキレート剤は、1-イソチオシクマトベンジル-3-メチルジオテレントリアミン五酢酸(1-isothiocycmatobenzyl-3-methyldiothelene triaminepent acetic acid) (「MX-DTPA」)である; 間接的標識化に特に好ましい放射性核種には、インジウム-111およびイットリウム-90が挙げられる。本明細書で使用する場合、語句「直接的標識化」および「直接的標識化アプローチ」は共に、放射性核種が(典型的にはアミノ酸残基を介して)抗体に直接共有結合的に結合していることを意味する。適切な放射性核種は、Srivagtava; または引用において提供され、直接的標識化に特に好ましい放射性核種は、チロシン残基を介して共有結合的に結合するヨウ素-131である。この間接的標識化アプローチが特に好ましい。

10

20

30

40

50

【0116】

上記抗CD20抗体へのカップリングのために使用される薬剤は、化学療法剤または抗がん剤などの、任意の適切な治療剤(または「エフェクター」)または診断剤であり得る。適切な診断剤には、蛍光色素、放射性薬剤、MRI造影剤、X線造影剤、超音波造影剤およびPET造影剤が挙げられる。本発明に従って使用するための適切な化学療法剤または他の抗がん剤には、チロシンキナーゼインヒビター(ゲニステイン)、生物学的に活性な薬剤(TNF、tTF)、放射性核種(^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{111}In 、 ^{211}At 、 ^{32}P および他の公知の治療的放射性核種)、アドリアマイシン、アンサマイシン抗生物質、アスパラギナーゼ、プレオマイシン、プスルファン、シスプラチン、カルボプラチン、カルムスチン、カペシタビン、クロラムブシル、シタラビン、シクロホスファミド、カンプトテシン、ダカルバジン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デクスラゾキサン、ドセタキセル、ドキシソルピシン、エトポシド、エボチロン、フロクスウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシウレア、イダルビシン、イホスファミド、イリノテカン、ロムスチン、メクロレタミン、メルカプトプリン、メルファラン(mephalan)、メトトレキサート、ラパマイシン(シロリムス)および誘導体、マイトマイシン、ミトタン、ミトキサントロン、ニトロソウレア(nitrosurea)、パクリタキセル、パミドロネート、ペントスタチン、プリカマイシン、プロカルバジン、リツキシマブ、ストレプトゾシン、テニポシド、チオグアニン、チオテパ、タキサン、ピンブラスチン、ピンクリスチン、ピノレルビン、タキソール、コンプレタスタチン、ディスコデルモリドならびにトランスプラチナが挙げられるがこれらに限定されない。

【0117】

本発明に従って使用するための他の適切な化学療法剤には、代謝拮抗剤(例えば、アスパラギナーゼ)、有糸分裂阻害剤(例えば、ピンカルカロイド)、DNA損傷剤(例えば、シスプラチン)、アポトーシス促進剤(proapoptotics)(プログラム細胞死またはアポトーシスを誘導する薬剤)(例えば、エピポドフィロトキシン(epipodophylotoxin))、分化誘導剤(例えば、レチノイド)、抗生物質(例えば、プレオマイシン)およびホルモン(例えば、タモキシフェン、ジエチルスチルベストロール(diethylstilbestrol))が挙げられるがこれらに限定されない。さらに、本発明に従って使用するために適した化学療法剤には、例えば、IFN-アルファ、フマギリン、アンジオスタチン、エンドスタチン、サリドマイドなどの抗新脈管形成剤(新脈管形成インヒビター)、などが挙げられる。

【0118】

さらに、薬学的に活性な薬剤は、siRNAであり得る。好ましい実施形態では、このsiRNA分子は、例えば、c-Sisおよび他の増殖因子、EGFR、PDGFR、VEGFR、HER2、他の受容体チロシンキナーゼ、Src-ファミリー遺伝子、Syk-ZAP-70ファミリー遺伝子、BTKファミリー遺伝子、他の細胞質チロシンキナー

ゼ、R a fキナーゼ、サイクリン依存的キナーゼ、他の細胞質セリン/スレオニンキナーゼ、R a sタンパク質および他の調節性G T P a s eなどの、腫瘍に関連する遺伝子の発現を阻害する。

【0119】

抗C D 2 0抗体は、ポリエチレングリコール(P E G)にもコンジュゲートされ得る。P E Gコンジュゲーションは、タンパク質の循環半減期を増加させ得、該タンパク質の免疫原性および抗原性を低減させ得、その生体活性を改善し得る。例えば、メトキシ-P E Gを、C D 2 0結合性抗体の利用可能なアミノ基または例えばヒスチジンもしくはシステインなどの他の反応性部位と反応させることが挙げられるがこれらに限定されない、コンジュゲーションの任意の適切な方法が使用され得る。さらに、組換えD N Aアプローチが、P E G反応性基を有するアミノ酸を本発明のC D 2 0結合性抗体に付加するために使用され得る。P E Gは、C D 2 0結合性抗体と反応させる前に処理され得、例えば、リンカー基が該P E Gに付加され得る。さらに、例えばC D 2 0結合性抗体のP E G化などの、放出可能なハイブリッドP E G化戦略が、本発明に従って使用され得、その結果、該C D 2 0結合性抗体における特定の部位に付加されたP E G分子がi n v i v oで放出される。かかるP E Gコンジュゲーション方法は、当該技術分野で公知である(例えば、G r e e n w a l dら、A d v . D r u g D e l i v e r y R e v . 5 5巻: 2 1 7 ~ 2 5 0頁(2 0 0 3年)を参照のこと)。

10

【0120】

抗C D 2 0抗体製剤

20

【0121】

本発明の組成物は一般に、薬学的に許容されるキャリアなどのキャリアを有する製剤で提供される。典型的には、このキャリアは液体であるが、固体、または液体構成成分と固体構成成分との組合せでもあり得る。このキャリアは望ましくは、生理学的に許容される(例えば、薬学的または薬理的に許容される)キャリア(例えば、賦形剤または希釈剤)である。適切な薬学的賦形剤には、安定剤、抗酸化剤、浸透圧調整剤、緩衝剤およびp H調整剤が挙げられる。適切な添加剤には、生理学的に生体適合性の緩衝剤、キレート剤もしくはカルシウムキレート錯体の添加、または必要に応じて、カルシウム塩もしくはナトリウム塩の添加が挙げられる。医薬組成物は、液体形態での使用のために包装され得、または凍結乾燥され得る。好ましい生理学的に許容されるキャリア媒体は、水、緩衝化水、ノーマルセーライン(n o r m a l s a l i n e)、0 . 4 %食塩水、0 . 3 %グリシン、ヒアルロン酸などである。生理学的に許容されるキャリアは周知であり、容易に入手可能である。キャリアの選択は、標的組織および/または細胞の位置、ならびに上記組成物を投与するために使用される特定の方法によって、少なくとも一部決定される。

30

【0122】

上記組成物は、静脈内、動脈内、筋肉内、腹腔内、髄腔内、硬膜外、皮下の、経粘膜(例えば、肺を含む)を含む経路による投与のために製剤化され得る。この組成物は、例えば希釈剤、アジュバント、賦形剤、保存剤およびp H調整剤などの追加の構成成分もまた含み得る。

40

【0123】

注射可能な投与に適した製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤およびこの製剤を意図したレシipientの血液と等張にする溶質を含み得る水性および非水性の等張無菌注射液剤、ならびに懸濁化剤、可溶化剤、増粘剤、安定剤、凍結乾燥保護剤(l y o p r o t e c t a n t)および保存剤を含み得る水性および非水性の無菌懸濁剤が挙げられる。これらの製剤は、アンプルおよびバイアルなどの、単位用量または複数回用量の密封容器で提示され得、使用の直前に注射のために水などの無菌液体キャリアの添加のみを必要とするフリーズドライ(凍結乾燥)状態で保存され得る。即時注射液剤および懸濁剤は、無菌の粉末、顆粒または錠剤から調製し得る。

【0124】

無菌注射液剤は、必要とされるとおり、上に列挙した成分のうち1つまたはそれらの

50

組合せと共に、適切な溶媒中に必要な量で活性化化合物を取り込み、その後濾過滅菌することによって調製し得る。好ましくは、注射のための溶液は、内毒素を含まない。一般に、分散物は、基礎分散媒および上に列挙した成分のうち必要な他の成分を含む無菌ビヒクルに活性化化合物を取り込むことによって調製し得る。無菌注射用液剤の調製のための無菌粉末の場合、好ましい調製方法は、以前に無菌濾過されたその溶液から、活性成分 + 任意の追加の所望の成分の粉末を生じる、真空乾燥およびフリーズドライである。全ての場合において、この製剤は無菌でなければならず、容易な注射可能性 (syringability) が存在する程度まで流動性でなければならない。この製剤は、製造および貯蔵の条件下で安定でなければならず、細菌および真菌などの微生物の汚染作用に対して保護されなければならない。遊離塩基または薬理的に許容される塩としての活性化化合物の溶液は、ヒドロキシセルロースなどの界面活性剤と適切に混合された水中で調製し得る。分散物は、グリセロール、液体ポリエチレングリコールおよびそれらの混合物中で、ならびに油中でもまた調製し得る。貯蔵および使用の通常の条件下で、これらの調製物は、微生物の増殖を防止するために保存剤を含む。

10

【0125】

好ましい実施形態では、これらの活性成分は、例えば、コアセルベーション技術または界面重合によって調製したマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチン - マイクロカプセルおよびポリ - (メチルメタクリレート) マイクロカプセル中に、コロイド性薬物送達系 (例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル) 中に、またはマクロエマルジョン中に、封入され得る。適切な技術は、Rezlerら、J. Am. Chem. Soc. 129巻(16号): 4961~72頁(2007年); Samadら、Curr. Drug Deliv. 4巻(4号): 297~305頁(2007年); ならびに米国特許第4,485,045号および米国特許第4,544,545号に開示されている。増強された循環時間を有するリポソームは、米国特許第5,013,556号に開示されている。

20

【0126】

特に有用なリポソームは、例えば、ホスファチジルコリン、コレステロールおよびPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成され得る。

30

【0127】

上記医薬組成物は、薬物送達系を使用して送達し得る。かかる送達系には、ヒアルロン酸溶液またはコラーゲン断片の懸濁物が挙げられる。これらの薬物は、制御放出に適したポリマー性材料、例えばポリ乳酸、エチルヒドロキシセルロース、ポリカプロラクトン、ポリカプロラクトンジオール、ポリリシン、ポリグリコール酸、ポリマレイン酸、ポリ[N-(2-ヒドロキシプロピル)メチルアクリルアミド]などを用いて設計されたマイクロカプセル中に製剤化され得る。薬物送達系を使用する特定の製剤は、液体懸濁物、軟膏、包帯への複合体(complex to a bandage)、コラーゲンシールドなどの形態であり得る。

40

【0128】

上記組成物は、特に組成物および/またはその最終用途の安定性を増強するために、任意の他の適切な構成成分をさらに含み得る。従って、本発明の組成物の種々様々な適切な製剤が存在する。

【0129】

本発明によって提供される組成物は、約10mg/mL~約100mg/mL、好ましくは約1mg/mL~約10mg/mL、より好ましくは約0.1mg/mL~約1mg/mLの活性薬剤の濃度で、例えば、CD20結合性抗体にカップリングした該活性薬剤を含む水性液体または有機液体を約0.5mL~約4mL含み得る。

【0130】

抗CD20抗体を用いる処置および診断の方法

50

【0131】

本発明は、抗CD20抗体を含む診断有効量または治療有効量の組成物を投与することによって、動物において疾患を診断または処置するための方法を提供する。特に、本発明は、患者において疾患を処置する方法であって、治療有効量の抗CD20抗体を動物に投与するステップを含む、方法を提供する。

【0132】

免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の好ましい有効投薬量（即ち、治療有効量）は、約0.001～約30mg/kg体重、より好ましくは約0.01～約25mg/kg体重、なおより好ましくは約0.4～約20.0mg/kg体重の範囲である。あるいは、上記好ましい有効投薬量は、約250mg/m²～約500mg/m²、より好ましくは約375mg/m²と記載され得る。

10

【0133】

しかし、他の投薬量が実行可能である；投薬量に影響を与える因子には、疾患の重症度；以前の処置アプローチ；患者の全体的健康；他の疾患の存在などが挙げられるがこれらに限定されない。当業者は、特定の患者を評価し、上記範囲内に入るまたは必要な場合該範囲の外側の適切な投薬量を決定することが容易に可能である。

【0134】

従って、抗CD20抗体の任意の適切な投薬量レベルが本発明に従って使用され得、例えば、投与1回当たり約1μg/kg～100mg/kg体重のオーダーの投薬量レベルが、疾患の処置において有用である。適切な投薬量に関して、抗体は、体重1kg当たり約75mg未満、または体重1kg当たり約70、60、50、40、30、20、10、5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001もしくは0.0005mg未満、および体重1kg当たり200nmol未満の抗体、または体重1kg当たり1500、750、300、150、75、15、7.5、1.5、0.75、0.15、0.075、0.015、0.0075、0.0015、0.00075、0.00015nmol未満の抗体、の単位用量で投与され得る。単位用量は、例えば、注射（例えば、静脈内もしくは筋肉内、髄腔内で、または器官内に直接）、吸入、または局所適用によって、投与され得る。

20

【0135】

同様に、本発明は、1種または複数の抗がん剤および抗CD20抗体を用いて動物において腫瘍を処置する方法をさらに提供し、この方法は以下のステップを含む：該動物から生物学的試料（検体）を単離するステップ、該生物学的試料中のCD20タンパク質もしくはRNAの発現を検出するステップ、または該生物学的試料中のCD20タンパク質もしくはRNAの量を定量化するステップ、ならびに該生物学的試料中のCD20タンパク質もしくはRNAが閾値レベルを上回って存在する場合には、治療有効量の該抗がん剤および治療有効量の該抗CD20抗体を投与するステップ。

30

【0136】

試料に存在するCD20タンパク質のレベルは、典型的には、プロットまたはELISAアッセイにおいて抗CD20抗体を使用して検出される。しかし、いくつかの実施形態では、CD20タンパク質の発現は、抗体の一部のみを使用して、抗体ではないCD20結合性分子を使用して、または抗体もCD20結合性分子も必要としないCD20発現を検出するいくつかの他の方法、例えば、質量分析法を使用して、決定され得る。CD20のRNAレベルは、例えば、ノザンプロット、スロットプロット、マイクロアレイ分析、定量的PCR、定量的TMAおよび定量的インベーターを含む任意の適切な方法によって取得され得る。

40

【0137】

本発明はまた、適切な中和抗CD20抗体を使用するCD20活性の阻害のための方法を提供する。かかる中和抗体は、例えば、抗CD20と可溶性もしくは細胞表面リガンドとの相互作用を遮断する能力、またはシグナル伝達に必要なCD20のコンフォメーション変化（confirmational change）を防止する能力を有し得る

50

。

【0138】

他の実施形態では、本発明の方法は、リボソーム結合した化学療法剤またはアルブミン結合した化学療法剤を含む治療有効量の医薬組成物を哺乳動物に投与するステップを含み、ここで、このリボソームまたはアルブミンは、適切な疾患を標的とする抗CD20抗体にカップリングされる。上記化学療法剤は、任意の適切な方法を使用して抗CD20抗体にカップリングされ得る。好ましくは、この化学療法剤は、例えば、ジスルフィド結合を含む共有結合を介して、この化合物に化学的にカップリングされる。

【0139】

上記したものなどの、1種または複数の化学療法剤の1つまたは複数の用量もまた、本発明の方法に従って投与され得る。本発明の方法において使用される化学療法剤の型および数は、特定の腫瘍型に対する標準的な化学療法レジメンに依存する。言い換えれば、特定のがんは、単一の化学療法剤を用いて慣用的に処置され得るが、別のがんは、化学療法剤の組合せを用いて慣用的に処置され得る。以下の実施例は、本発明をさらに説明するが、当然、本発明の範囲を限定すると決して解釈すべきではない。

【0140】

本発明に従う方法には、例えば併用療法が含まれ、ここで上記動物は、手術、化学療法、放射線療法、温熱療法、免疫療法、ホルモン療法およびレーザー療法からなる群より選択される1種または複数のがん療法もまた受けている。用語「共投与」および「併用療法」とは、2種以上の治療的に活性な薬剤を被験体に投与することを指す。これらの薬剤は、単一の医薬組成物に含まれ得、同時に投与され得るか、またはこれらの薬剤は、別々の製剤に含まれ得、被験体に逐次的に投与され得る。2種の薬剤が上記被験体において同時に検出され得る限り、これら2種の薬剤は共投与されたと言われる。

【0141】

本発明において意図される併用療法には、併用の (concomitant) 抗体投与、ワクチン投与、細胞傷害剤の投与、天然アミノ酸ポリペプチド、核酸、ヌクレオチドアナログおよび生体応答改変因子が挙げられるがこれらに限定されない。2種以上の併用された化合物は、一緒にまたは続いて使用され得る。化学療法剤の例には、アルキル化剤、代謝拮抗剤、天然産物、ホルモンおよびアンタゴニスト、ならびに種々の薬剤が挙げられる。アルキル化剤の例には、ナイトロジェンマスタード、例えばメクロレタミン、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン (L-サルコリシン) およびクロラムブシル; エチレンイミンおよびメチルメラミン、例えばヘキサメチルメラミンおよびチオテパ; スルホン酸アルキル、例えばブスルファン; ニトロソウレア、例えばカルムスチン (BCNU)、セムスチン (メチル-CCNU)、ロムスチン (CCNU) およびストレプトゾシン (ストレプトゾトシン); DNA合成アンタゴニスト、例えばリン酸エストラムスチン; ならびにトリアジン、例えばダカルバジン (DTIC、ジメチル-トリアゼノイミダゾールカルボキサミド) およびテモゾロミドが挙げられる。代謝拮抗剤の例には、葉酸アナログ、例えばメトトレキサート (アメトプテリン); ピリミジンアナログ、例えばフルオロウラシル (fluorouracil) (5-フルオロウラシル、5-FU、5FU)、フロクスウリジン (フルオロデオキシウリジン、FUdR)、シタラビン (シトシンアラビノシド) およびゲムシタビン; プリンアナログ、例えばメルカプトプリン (6-メルカプトプリン (6-mercaptopurine)、6-MP)、チオグアニン (6-チオグアニン、TG) およびペントスタチン (2'-デオキシコホルマイシン、デオキシコホルマイシン)、クラドリビンおよびフルダラビン; ならびにトポイソメラーゼインヒビター、例えばアムサクリンが挙げられる。天然産物の例には、ビンカルカロイド、例えばビンブラスチン (VLB) およびピンクリスチン; タキサン、例えばパクリタキセル (Abraxane (登録商標)) およびドセタキセル (Taxotere (登録商標)); エピポドフィロトキシン、例えばエトポシドおよびテニポシド; カンプトテシン、例えばトポテカンおよびイリノテカン; 抗生物質、例えばダクチノマイシン (アクチノマイシンD)、ダウノルピシン (ダウノマイシン、ルビドマイシン (rubidomycin))

cin))、ドキシルピシン、プレオマイシン、マイトマイシン(マイトマイシンC)、イダルピシン、エピルピシン; 酵素、例えばL-アスパラギナーゼ; ならびに生物学的応答改変因子、例えばインターフェロンアルファおよびインターロイキン(interleukin) 2が挙げられる。ホルモンおよびアンタゴニストの例には、黄体形成ホルモン放出ホルモンアゴニスト(luteinising releasing hormone agonist)、例えばブセレリン; 副腎皮質ステロイド、例えばプレドニゾンおよび関連調製物; プロゲスチン、例えばカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロンおよび酢酸メゲストロール; エストロゲン、例えばジエチルスチルベストロールおよびエチニルエストラジオールならびに関連調製物; エストロゲンアンタゴニスト、例えばタモキシフェンおよびアナストロゾール; アンドロゲン、例えばプロピオン酸テストステロンおよびフルオキシメステロンならびに関連調製物; アンドロゲンアンタゴニスト、例えばフルタミドおよびピカルタミド; ならびにゴナドトロピン放出ホルモンアナログ、例えばリュープロリドが挙げられる。種々の薬剤の例には、サリドマイド; プラチナ配位錯体、例えばシスプラチン(cis-DDP)、オキサリプラチンおよびカルボプラチン; アントラセンジオン、例えばミトキサントロン; 置換尿素、例えばヒドロキシウレア; メチルヒドラジン誘導体、例えばプロカルバジン(N-メチルヒドラジン、MIH); 副腎皮質抑制剤、例えばミトタン(o,p'-DDD)およびアミノグルテチミド; R X Rアゴニスト、例えばベキサロテン; ならびにチロシンキナーゼインヒビター、例えばイマチニブが挙げられる。

10

20

【0142】

本発明の方法において取り上げられる組成物は、単回用量または複数回用量で投与され得る。上記抗体の投与が注入による場合、この注入は、単回の持続的用量であり得、または複数回の注入によって送達し得る。上記薬剤の注射は、異常な標的遺伝子発現の部位またはその近傍で組織へと直接であり得る。上記薬剤の複数回注射は、上記部位またはその近傍の組織中へとなされ得る。

【0143】

当業者はまた、所与の被験体に本発明の抗体を投与するための適切な投薬量レジメンを容易に決定できる。例えば、上記抗CD20抗体組成物は、CD20発現の部位またはその近傍で、単回注射または沈殿物(deposition)として、被験体に1回投与され得る。本発明の組成物は、毎日、週に2回、週に1回、隔週で、月に2回、月に1回、隔月でまたは臨床医の裁量で投与され得る。いくつかの実施形態では、これらの組成物は、約3~約28日間、より好ましくは約7~約10日間の期間にわたり、被験体に毎日1回または2回投与される。さらなる実施形態では、上記単位用量は、1日1回未満の頻度で、例えば、2、4、8または30日毎に1回未満で、投与される。他の実施形態では、この単位用量は、ある頻度で投与されない(例えば、一定の頻度ではない)。

30

40

【0144】

投薬量レジメンが複数回の投与を含む場合、上記被験体に投与される抗CD20抗体組成物の有効性は、投薬量レジメン全体にわたって投与される抗体の総量を含み得ることが理解される。当業者は、正確な個々の投薬量が、投与されている特定の抗CD20抗体組成物、投与の時間、投与の経路、製剤の性質、排泄の速度、処置されている特定の障害、該障害の重症度、オリゴヌクレオチド剤の薬力学、ならびに患者の年齢、性別、体重および全般的健康を含む種々の因子に幾分依存して調整され得ることを理解する。必要な投薬レベルにおける広いバリエーションは、投与の種々の経路の異なる効率に鑑みて予測される。

【0145】

有効用量は、特定の状況下で望ましい場合または適切とみなされる場合、単位用量または2回以上の用量で投与され得る。反復注入または頻繁な注入を促進することが望ましい場合、送達デバイス、例えば、ポンプ、半永久的ステント(例えば、静脈内、腹腔内、槽内または包内)、またはレザパの移植が賢明であり得る。首尾良い処置の後、疾患状態の再発を予防するために、患者に維持療法を受けさせることが望ましい場合がある。上記抗

50

体組成物の濃度は、障害を処置もしくは予防するのに有効であるのに十分な量、またはヒトにおいて生理学的状態を調節するのに十分な量である。投与する抗体の濃度または量は、上記薬剤および投与方法について決定されたパラメータに依存する。

【0146】

疾患または障害の重症度、以前の処置、被験体の全般的健康および/または年齢、ならびに存在する他の疾患が挙げられるがこれらに限定されない特定の因子が、被験体を有効に処置するために必要とされる投薬量に影響を与え得る。処置に使用される上記抗体の有効な投薬量は、特定の処置の過程にわたって増加または減少し得ることもまた理解される。投薬量の変化が生じ得、これは、診断アッセイの結果から明らかになり得る。例えば、被験体は、抗体組成物を投与した後にモニタリングされ得る。そのモニタリングからの情報に基づいて、追加の量の上記抗体組成物が投与され得る。当業者は、最適な投薬量、投薬方法論および反復率を容易に決定できる。

10

【0147】

以下の実施例は、本発明をさらに説明するが、当然、本発明の範囲を限定すると決して解釈すべきではない。

【実施例】

【0148】

(実施例1)

この実施例は、変化したアミノ酸配列を有する一連のバリエーション抗CD20抗体の軽鎖および重鎖が、部位特異的変異誘発によって作製できることを実証する。

20

【0149】

クローニングされた抗CD20軽鎖および重鎖コード配列の部位特異的変異を、MORPH Site-Specific Plasmid DNA Mutagenesis Kit (5 Prime to 3 Prime, Inc.)、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit、QuikChange Multi Site-Directed Mutagenesis KitおよびQuikChange Lightning Multi Site-Directed Mutagenesis Kit (全てAgilent Technologies、Santa Clara、CAから)を含む、当業者に周知の種々のプロトコルを使用して実施した。具体的には、QuikChange法は、非鎖置換ポリメラーゼ(non-strand displacing polymerase) (Pfu)を使用して、相補的なミスマッチしたプライマー対およびプライマー伸長を使用した。形質転換前に、親鑄型(メチル化するE. coli株から調製した)を、DpnI(メチル化DNAに対して特異的であり、新たに合成された二重鎖DNAを消化しない)で消化した。全ての変異を、ジデオキシ配列決定によって検証した。得られた軽鎖および重鎖ポリペプチドの発現および精製を、記載されたように実施した(Wilkins Stevensら: Recombinant immunoglobulin variable domains generated from synthetic genes provide a system for in vitro characterization of light chain amyloid proteins、Protein Sci. 4巻: 421~432頁(1995年))。抗体のV_HドメインおよびV_Lドメインを、E. coli宿主株BL26で発現させた。小規模(30mL)振盪培養を使用して十分なタンパク質を産生し、熱安定性を評価した。Hisタグ化タンパク質を、Ni-NTA Agarose (Qiagen)またはNi Sepharose (GE Healthcare、Piscataway、NJ)とのインキュベーションによって、E. coliペリプラズム画分から単離した。この親和性樹脂を、96ウェルフィルタープレート上で収集し、洗浄した。タンパク質を、500mMイミダゾールを含む緩衝液で溶出した。

30

40

【0150】

表1~3は、配列番号1および2に関し、それぞれ野生型抗CD20抗体の軽鎖および

50

重鎖を示し、その残基は共に、Kabat E. A.、Wu T. T.、Perry H. M.、Gottesman K. S. および Foeller C. (1991年)、Sequences of Proteins of Immunological Interest (編者Kabat)、第1巻、第5版、US Department of Health and Human Services、Bethesda、MD. (1991年) (V_L および V_H 配列) または EU 番号付け (C_{H2} 配列) に従って定められるように番号付けされている (特に示さない限り、本明細書で使用した全てのアミノ酸配列番号付けは、配列番号1および2を参照している / 配列番号1および2に基づく)。

表1. 野生型抗CD20軽鎖可変ドメインアミノ酸配列番号付けシステム

【表 1 - 1】

野生型 残基番号- Kabat番号	野生型残基- 配列番号11にお ける番号	野生型配列におけ る残基
L1	1	Q
L2	2	I
L3	3	V
L4	4	L
L5	5	S
L6	6	Q
L7	7	S
L8	8	P
L9	9	A
L10	10	I
L11	11	L
L12	12	S
L13	13	A
L14	14	S
L15	15	P
L16	16	G
L17	17	E
L18	18	K
L19	19	V
L20	20	T
L21	21	M
L22	22	T
L23	23	C
L24	24	R
L25	25	A
L26	26	S
L27	27	S
L28	-	-
L29	28	S
L30	29	V
L31	30	S
L32	31	Y
L33	32	I
L34	33	H
L35	34	W
L36	35	F
L37	36	Q
L38	37	Q
L39	38	K
L40	39	P

10

20

30

40

【表 1 - 2】

L41	40	G
L42	41	S
L43	42	S
L44	43	P
L45	44	K
L46	45	P
L47	46	W
L48	47	I
L49	48	Y
L50	49	A
L51	50	T
L52	51	S
L53	52	N
L54	53	L
L55	54	A
L56	55	S
L57	56	G
L58	57	V
L59	58	P
L60	59	V
L61	60	R
L62	61	F
L63	62	S
L64	63	G
L65	64	S
L66	65	G
L67	66	S
L68	67	G
L69	68	T
L70	69	S
L71	70	Y
L72	71	S
L73	72	L
L74	73	T
L75	74	I
L76	75	S
L77	76	R
L78	77	V
L79	78	E
L80	79	A
L81	80	E
L82	81	D
L83	82	A
L84	83	A

10

20

30

40

【表 1 - 3】

L85	84	T
L86	85	Y
L87	86	Y
L88	87	C
L89	88	Q
L90	89	Q
L91	90	W
L92	91	T
L93	92	S
L94	93	N
L95	94	P
L96	95	P
L97	96	T
L98	97	F
L99	98	G
L100	99	G
L101	100	G
L102	101	T
L103	102	K
L104	103	L
L105	104	E
L106	105	I
L107	106	K
L108	107	R

10

20

表 2 . 野生型抗 C D 2 0 重鎖可変ドメインアミノ酸配列番号付けシステム

【表 2 - 1】

野生型 残基番号- Kabat番号	野生型残基- 配列番号2にお ける番号	野生型配列におけ る残基
H1	1	Q
H2	2	V
H3	3	Q
H4	4	L
H5	5	Q
H6	6	Q
H7	7	P
H8	8	G
H9	9	A
H10	10	E
H11	11	L
H12	12	V

30

40

【表 2 - 2】

H13	13	K
H14	14	P
H15	15	G
H16	16	A
H17	17	S
H18	18	V
H19	19	K
H20	20	M
H21	21	S
H22	22	C
H23	23	K
H24	24	A
H25	25	S
H26	26	G
H27	27	Y
H28	28	T
H29	29	F
H30	30	T
H31	31	S
H32	32	Y
H33	33	N
H34	34	M
H35	35	H
H36	36	W
H37	37	V
H38	38	K
H39	39	Q
H40	40	T
H41	41	P
H42	42	G
H43	43	R
H44	44	G
H45	45	L
H46	46	E
H47	47	W
H48	48	I
H49	49	G
H50	50	A
H51	51	I
H52	52	Y
H52A	53	P
H53	54	G
H54	55	N
H55	56	G

10

20

30

40

【表 2 - 3】

H56	57	D
H57	58	T
H58	59	S
H59	60	Y
H60	61	N
H61	62	Q
H62	63	K
H63	64	F
H64	65	K
H65	66	G
H66	67	K
H67	68	A
H68	69	T
H69	70	L
H70	71	T
H71	72	A
H72	73	D
H73	74	K
H74	75	S
H75	76	S
H76	77	S
H77	78	T
H78	79	A
H79	80	Y
H80	81	M
H81	82	Q
H82	83	L
H82A	84	S
H82B	85	S
H82C	86	L
H83	87	T
H84	88	S
H85	89	E
H86	90	D
H87	91	S
H88	92	A
H89	93	V
H90	94	Y
H91	95	Y
H92	96	C
H93	97	A
H94	98	R
H95	99	S
H96	100	T

10

20

30

40

【表 2 - 4】

H97	101	Y
H98	102	Y
H99	103	G
H100	104	G
H100A	105	D
H100B	106	W
H100C	107	Y
H100D	108	F
H101	109	N
H102	110	V
H103	111	W
H104	112	G
H105	113	A
H106	114	G
H107	115	T
H108	116	T
H109	117	V
H110	118	T
H111	119	V
H112	120	S
H113	121	A

10

20

表 3 . 野生型抗 CD 20 重鎖定常ドメイン 2 アミノ酸配列番号付けシステム

【表 3 - 1】

野生型 残基番号- EU番号	野生型残基- 配列番号2にお ける番号	野生型配列における残基
H231	235	A
H232	236	P
H233	237	E
H234	238	L
H235	239	L
H236	240	G
H237	241	G
H238	242	P
H239	243	S
H240	244	V
H241	245	F
H242	246	L
H243	247	F
H244	248	P

30

40

【表 3 - 2】

H245	249	P
H246	250	K
H247	251	P
H248	252	K
H249	253	D
H250	254	T
H251	255	L
H252	256	M
H253	257	I
H254	258	S
H255	259	R
H256	260	T
H257	261	P
H258	262	E
H259	263	V
H260	264	T
H261	265	C
H262	266	V
H263	267	V
H264	268	V
H265	269	D
H266	270	V
H267	271	S
H268	272	H
H269	273	E
H270	274	D
H271	275	P
H272	276	E
H273	277	V
H274	278	K
H275	279	F
H276	280	N
H277	281	W
H278	282	Y
H279	283	V
H280	284	D
H281	285	G
H282	286	V
H283	287	E
H284	288	V
H285	289	H
H286	290	N

10

20

30

40

【表 3 - 3】

H287	291	A
H288	292	K
H289	293	T
H290	294	K
H291	295	P
H292	296	R
H293	297	E
H294	298	E
H295	299	Q
H296	300	Y
H297	301	N
H298	302	S
H299	303	T
H300	304	Y
H301	305	R
H302	306	V
H303	307	V
H304	308	S
H305	309	V
H306	310	L
H307	311	T
H308	312	V
H309	313	L
H310	314	H
H311	315	Q
H312	316	D
H313	317	W
H314	318	L
H315	319	N
H316	320	G
H317	321	K
H318	322	E
H319	323	Y
H320	324	K
H321	325	C
H322	326	K
H323	327	V
H324	328	S
H325	329	N
H326	330	K
H327	331	A
H328	332	L

10

20

30

40

【表 3 - 4】

H329	333	P
H330	334	A
H331	335	P
H332	336	I
H333	337	E
H334	338	K
H335	339	T
H336	340	I
H337	341	S
H338	342	K
H339	343	A
H340	344	K

10

【 0 1 5 1 】

以下の抗CD20抗体軽鎖を生成し、各々をそのアミノ酸配列変化（複数可）によって同定した（配列番号1に従って番号付けした）：Q1D、S5T、A9S、A9L、I10L、I10F、I10S、I10T、A13V、P15A、P15L、P15V、K18Q、K18R、K18E、M21I、M21L、S27Q、S27K、I32L、H33N、F35Y、P39S、S41A、S41T、S41Q、S42A、S42P、P45L、P45R、W46L、W46I、A49D、S55P、V59A、V59D、F61T、S69D、S69N、S69T、Y70F、S71T、A79P、A82L、A82V、A82F、Q88LおよびG99Q。

20

【 0 1 5 2 】

以下の抗CD20抗体重鎖を生成し、各々をそのアミノ酸配列変化（複数可）によって同定した（配列番号2に従って番号付けした）：

【 0 1 5 3 】

i . V37L、M20L、ならびにQ5V、P7S、A9G、A9L、E10G、K13Q、T28S、T30S、K67R、K67R：A68F、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、Y80F、M81L、S84N、A92G、W106S、F108A、N109DおよびA113Qのうち1つ；

30

【 0 1 5 4 】

ii . M20L、A92G、ならびにV18L、K19R、K19S、K19T、M20I、M20V、S25T、Y27F、Y32F、Y32S、P41H、G44E、L45Rのうち1つ；および

【 0 1 5 5 】

iii . V244L、L246I、V263L、V267A、V267I、V267L、V270L、V270S、V270F、V270I、V277I、F279I、F279L、V306T、V312I、V312L、V327A、V327L、I340A、I340L、T254E、M256L、M256Y、T260E、T260FおよびT260K。

40

【 0 1 5 6 】

さらに、複数のアミノ酸配列変化を有する抗CD20抗体重鎖を生成した（表4を参照のこと）。

表4 . 複数のアミノ酸配列変化を有する抗CD20抗体重鎖

【表 4】

試料ID	重鎖配列変化
RW004	野生型(WT)
RW005	M20I/M81L/A92G/N109D/V263L
RW006	M20I/M81L/A92G/N109D/V263L
RW007	M20L/M81L/A92G/N109D
RW008	M20L/M81L/A92G/N109D
RW009	M20L/M81L/A92G

10

【0157】

次いで、これらのバリエーション抗CD20軽鎖および重鎖を、増強された安定性についてスクリーニングした。

(実施例2)

【0158】

この実施例は、部位特異的変異誘発が、示差走査蛍光定量法(DSF)スクリーニングアッセイに基づいて、増強された安定性を有する抗CD20抗体軽鎖および重鎖ポリペプチド(anti-CD20 antibody heavy light and heavy chain polypeptide)を創製するために使用できることを実証している。

20

【0159】

示差走査蛍光定量法は、蛍光色素の存在下でタンパク質の熱的アンホールディングをモニタリングし、リアルタイムPCR装置を使用することによって典型的には実施される。DSFは、抗体の軽鎖および重鎖を含む広範なタンパク質に適用され得る。DSFに使用され得る蛍光色素は、蛍光がクエンチされる水溶液と比較して、非極性環境、例えば、高次構造がほぐされたタンパク質上の疎水性部位において高度に蛍光性である。使用されてきた種々の色素は、その光学特性に関して、特に、変性したタンパク質に結合することによって引き起こされる蛍光量子収率において、異なっている。タンパク質安定性分析のためにDSFを使用する場合、蛍光強度は、温度の関数としてプロットされて、二状態転移によって記述され得るシグモイド曲線を生成する。転移曲線の屈曲点(T_m)は、Boltzmann方程式などの単純な方程式を使用して計算される(例えば、Niesen F. H., Berglund H. および Vedadi M.: The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. Nature Protocols 2巻: 2212~21頁(2007年)を参照のこと)。

30

【0160】

V_L ドメインおよび V_H ドメインの相対的安定性を、タンパク質色素SYPRO Orangeの存在下でDSFによって個々に分析した(同上文献もまた参照のこと)。簡潔に述べると、5xSYPRO Orangeを含むPBS中10~20 μ Mのタンパク質試料40 μ lを、492nmでの励起および580nmでの発光を用いて、MX4000qPCRシステム(Stratagene, Agilent Technologies, Santa Clara, CA)中で1の増分で25から90に加熱した。タンパク質のアンホールディングを、変性したタンパク質に対する色素SYPRO Orange(Invitrogen, Inc., Carlsbad, CA)の結合の際の蛍光の増加として検出した。転移中点を、プログラムPrism 4(GraphPad Software, La Jolla, CA)を使用して、Boltzmann方程式へのデータの非線形最小二乗曲線フィットによって決定した(Niesen F. H., Be

40

50

rglund H. および Vedadi M.: The use of differential scanning fluorimetry to detect ligand interactions that promote protein stability. Nature Protocols 2巻: 2212~21頁(2007年)もまた参照のこと)。(V_H バリエントを、V37L/M20LまたはM20L/A92Gアミノ酸変化を有する「発現最適化」ドメインとして試験した。これらの組合せの全てを全長抗体において試験したわけではない。抗体断片をhisタグ化し、IMACを使用して精製した(完全抗CD20抗体は、プロテインA樹脂で精製した)。

【0161】

表中に列挙したT_mにおける変化(即ち)を、変異体タンパク質のT_mから野生型タンパク質のT_mを差し引くことによって計算する(V_H バリエント(variant)の場合、野生型V_Hは発現しなかったので、本発明者らは、発現を改善するための安定化残基を含む2つの異なるV_Hドメインと比較してデルタT_mを決定した)。0.3 以上の任意の T_mを、安定性の増強とみなした。結果を表4~6に示す。

表5. リツキシマブV_Lドメインのアミノ酸改変および熱安定性

【表 5】

V _L 変異	ΔT _m (°C)	V _L 変異	ΔT _m (°C)
Q1D	弱いシグナル	S41T	弱いシグナル
S5T	弱いシグナル	S41A	-2.91
A9S	-3.50	S42A	-1.38
A9L	-6.04	S42P	1.82
I10L	NA ^b	P45L	-10.07
I10F	弱いシグナル	P45R	弱いシグナル
I10S	-5.70	W46L	5.57
I10T	-3.62	W46I	6.73
A13V	-0.72	A49D	-1.59
P15A	-2.66	S55P	2.26
P15L	NA	V59A	0.67
P15V	NA	V59D	2.38
K18Q	-2.80	F61T	-15.07
K18R	NA	S69D	0.47
K18E	-2.97	S69N	0.70
M21I	-3.49	S69T	NA
M21L	-4.74	Y70F	0.76
S27Q	3.90	S71T	-1.56
S27K	-2.51	A79P	1.21
I32L	-8.52	A82L	弱いシグナル
H33N	弱いシグナル	A82V	-7.21
F35Y	-0.77	A82F	-8.45
P39S	-4.16	Q88L	-0.12
S41Q	0.31	G99Q	-1.82

10

20

30

^a T_m は、蛍光ベースの熱安定性アッセイにおけるシグナルが乏しいために得られなかった。

^b 変異が得られなかったまたは不十分なタンパク質発現。

表 6 . リツキシマブ V_H ドメインのアミノ酸改変および熱安定性

40

【表 6】

V37L/M20L フレームワーク ^{a,b}		M20L/A92G フレームワーク	
V _H 変異	ΔT _m (°C)	V _H 変異	ΔT _m (°C)
Q5V	1.08	V18L	-5.79
P7S	2.80	K19R	-7.26
A9G	-1.77	K19S	-5.13
A9L	-0.08	K19T	-4.18
E10G	0.34	M20I	0.67
K13Q	-0.13	M20V	-0.18
T28S	0.53	S25T	-4.00
T30S	-0.31	Y27F	-0.16
K67R	-0.11	Y32F	-0.51
K67R:A68F	-5.00	Y32S	0.66
A68F	0.32	P41H	-1.99
A68V	1.10	G44E:L45R	-6.90
T69I	1.28		
L70I	1.63		
A72V	2.25		
K74N	0.55		
K74T	1.01		
Y80F	-1.02		
M81L	4.53		
S84N	1.93		
A92G	3.43		
W106S:F108A	-0.38		
N109D	10.98		
A113Q	1.09		

10

20

30

^a 野生型リツキシマブ V_H ドメインは発現が乏しかった。本発明者らは、V_H ドメインのバリエーションを操作して、発現を改善した。これらは、変異誘発のためのフレームワークとして機能した。示された T_m 値は、対応するフレームワークと比較したものである。

^b 明確に測定されなかったフレームワーク変異に関する外挿された T_m 値は、以下のとおりである：V37L (1.0)、M20L (4.5)。

表 7 . リツキシマブ C_H2 ドメインのアミノ酸改変および熱安定性

40

【表 7】

C _{H2} 変異	ΔTm (°C)	C _{H2} 変異	ΔTm (°C)
V244L	-4.13	V306T	-4.66
L246L	-1.75	V312I	0.88
V263L	2.41	V312L	-4.91
V267A	-6.32	V327A	-6.25
V267I	-4.12	V327L	-11.03
V267L	-6.20	I340A	-8.49
V270L	-1.34	I340L	-6.29
V270S	-5.58	T254E	-2.34
V270F	-5.34	M256L	2.98
V270I	-0.86	M256Y	-2.85
V277I	3.84	T260E	-1.06
F279I	-3.35	T260F	-2.94
F279L	0.18	T260K	-0.29

10

20

(実施例 3)

【0162】

この実施例は、キャピラリー示差走査熱量測定(cDSC)を使用することによって、本発明によって提供されるいくつかの抗CD20抗体バリエーションの増強された安定性をさらに確認する。

【0163】

上記DSF研究から、一連のバリエーション抗体を、cDSCによる安定性分析のために選択した。二本鎖抗体を、CHO-S(懸濁培養に順応したチャイニーズハムスター卵巣)細胞系における一過性発現のために、重鎖ベクターおよび軽鎖ベクターの共トランスフェクションによって産生した。

30

【0164】

FreeStyle MAX CHO Expression System(Invitrogen)を、抗CD20抗体の一過性発現に使用した。CHO-S細胞を、L-グルタミンを補充したFreeStyle CHO Expression Mediumで培養した。トランスフェクションのために、細胞を 1×10^6 /mlに希釈し、1ug DNA/ml培養物でトランスフェクトした。1:1の比率の重鎖:軽鎖プラスミドを、製造業者によって記載されたように、OptiPro Serum Free Mediumで希釈し、FreeStyle MAX Transfection Reagentと混合した。この混合物を10分間インキュベートして、脂質-DNA複合体を形成させ、CHO-S細胞に添加した。この培養物を、135rpmで回転するオービタルシェイカープラットフォーム上で37、8%CO₂でインキュベートした。この培養培地を、4~7日後に収集し、抗CD20抗体をプロテインAアフィニティクロマトグラフィーによって精製した。

40

【0165】

DSFにおいて有望な結果を生じたアミノ酸配列変化を有する抗CD20抗体バリエーションのパネルを、cDSCによって特徴付けた。結果およびそのあり得る解釈を表8に示す。

表8. 単一アミノ酸変化の考えられる意味

50

【表 8】

変異	安定性の改善 (°C)	コメント
重鎖M20I	4.5	この安定化変異は、重鎖可変ドメインの下部コアに存在する;従って、これは、CD20に対する結合に影響を与える可能性が低い。安定性の改善に加えて、メチオニンの置換により、潜在的に酸化性のアミノ酸側鎖が除去されることによって、抗体の有効期間を改善できる。
重鎖M20L	4.5	この安定化変異は、重鎖可変ドメインの下部コアに存在する;従って、これは、CD20に対する結合に影響を与える可能性が低い。安定性の改善に加えて、メチオニンの置換により、潜在的に酸化性のアミノ酸側鎖が除去されることによって、抗体の有効期間を改善できる。
重鎖M81L	4.5	この安定化変異は、重鎖可変ドメインの中央コアに存在する。それはその構造のM20の次、隣接するベータ鎖上に存在しており、20位および80位は、ロイシンおよびイソロイシンなどのより大きい疎水性残基によって頻繁に占有される。メチオニンの除去は、望ましいと考えられる。
重鎖A92G	3.4	この安定化変異は、V _H ドメインの底部のループ中に位置する。それは、高い安定性の改善と、結合機能またはエフェクター機能への影響が低い可能性とを兼ね備える。
重鎖N109D	11.0	この変異によって生じた高い安定性の改善は、Asp109と98位のアルギニン残基との間の塩橋の形成から生じ得る。Asp109は、HC-CDR3の基部に位置する。
重鎖V263L	2.4	この変異は、ほとんどのIgG抗体における最も安定性が低いドメインであるC _{H2} ドメインを、中程度に安定化する。このドメインのアンホールディングは、抗体凝集と関連している。
軽鎖W46L	5.6	リツキシマブの軽鎖可変ドメインは、69.7°CのT _m で非常に安定であり、W46L変異はこのドメインをさらに安定化する。トリプトファンの置換は、潜在的に酸化性の残基および部分的に高次構造がほぐされた中間体の凝集に寄与し得る残基を除去する。

10

20

30

40

【 0 1 6 6 】

複数のアミノ酸配列変化を有する抗CD20抗体バリエーションの第2のパネルを、c D S Cによって特徴付けた。野生型抗CD20抗体は、試料「RW004」として同定される。試料「RW005~009」は安定化バリエーションである。そのアミノ酸配列変化を表4に示す。6つの安定化アミノ酸変化(表5~7から選択される)の組合せは、抗CD20 Fabドメイン(結合機能を含む該抗体の一部)の融点(T_m)を、86.5まで改

50

善した。これは、野生型タンパク質を超える最大 11.1 までの改善を示す。

【0167】

結果およびその解釈は、図5および表9に示される。

表9．複数のアミノ酸配列変化を有する抗CD20抗体バリエーションのcDSCの結果

【表9】

試料ID	軽鎖	重鎖	T _{max} (°C)
RW004	WT	野生型(WT)	75.36
RW005	W46L	M20I/M81L/A92G/N109D/V263L	86.53
RW006	WT	M20I/M81L/A92G/N109D/V263L	85.63
RW007	W46L	M20L/M81L/A92G/N109D	84.61
RW008	WT	M20L/M81L/A92G/N109D	84.60
RW009	WT	M20L/M81L/A92G	83.24

10

(実施例4)

【0168】

この実施例は、熱的チャレンジアッセイを使用して、本発明によって提供される複数のアミノ酸配列変化を有する一群の抗CD20抗体バリエーションの増強された安定性をさらに実証する。

20

【0169】

野生型および安定化抗CD20抗体バリエーションのアリコートを示された温度で10分間加熱し、次いで即座に氷上で冷却した。これらの試料を遠心分離して、いずれの沈澱した材料も除去した。プロテインA結合活性を保持する抗体を、プロテインAセンサーキットを使用して、Octet Biosensor (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA) で定量した。プロテインAは上記抗体のFc部分(特に、最も安定性が低いドメインであるC_H2ドメイン)に結合するので、そのデータは、可変ドメインの安定化が、上記抗体分子の全体的安定性を増加させたことを示す。2つ組(duplicate)は、異なる一過性発現実験から精製された抗体を示す。

30

【0170】

結果は図6に示され、野生型に対してバリエーションの明確な増強された安定性を示す。

【0171】

本明細書で引用した、刊行物、特許出願および特許を含む全ての参考文献は、各参考文献が個々にかつ具体的に参照によって組み込まれることが示され、その全体が本明細書中に記載されているのと同じ程度まで、参照によって本明細書に組み込まれる。

【0172】

本発明を説明することに関して(特に、以下の特許請求の範囲に関して)、用語「a」および「an」および「the」ならびに類似の指示対象の使用は、本明細書に特に示さない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、単数形および複数形の両方をカバーすると解釈すべきである。用語「含む(comprising)」、「有する(having)」、「含む(including)」および「含む(containing)」は、特に示さない限り、オープンエンドの用語(即ち、「含むがそれらに限定されない」を意味する)と解釈すべきである。本明細書中の値の範囲の列挙は、本明細書に特に示さない限り、その範囲内に入る各別々の値に個々に言及する簡略化された方法として機能することのみを意図し、各別々の値は、本明細書で個々に列挙されているかのように、本明細書中に組み込まれる。本明細書に記載される全ての方法は、本明細書に特に示さない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、任意の適切な順序で実施され得る。本明細書に提供される任意のおよび全ての例または例示的用語(例えば、「~など/例えば(such as)」の使用は、本発明をより良く説明することのみを意図しており、特に特許請求され

40

50

ない限り、本発明の範囲を限定するものではない。本明細書中の用語は、任意の特許請求されていない要素を、本発明の実施に必須のものとして示すと解釈してはならない。

【 0 1 7 3 】

本発明を実施するための、本発明者らが知る最良の形態を含む本発明の好ましい実施形態が、本明細書に記載される。好ましい実施形態のバリエーションは、上記の説明を読めば当業者に明らかになり得る。本発明者らは、当業者が、適宜かかるバリエーションを使用することを予期しており、また本発明者らは、本発明が、本明細書中に具体的に記載された以外の方法で実施されることを意図している。従って、本発明は、適用法によって許容される限り、本明細書に添付された特許請求の範囲において列挙される主題の全ての改変および等価物を含む。さらに、全てのその可能なバリエーションでの上記要素の任意の組合せが、本明細書に特に示さない限りまたは文脈と明らかに矛盾しない限り、本発明によって包含される。

10

【 図 1 】

Figure 1

配列番号1(抗CD20抗体野生型軽鎖アミノ酸配列):

```

QIVLSQSP ALLSASPGEK
VTMTCRASSS VSYIHWQK PGSSPKPWIY ATSNLASGVP
VRFSGSGSGT SYSLTISRVE AEDAATYYCQ QWTSNPPTFG
GGTKLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNMF
YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTL
TLISKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEK

```

【 図 2 】

Figure 2

配列番号2(抗CD20抗体野生型重鎖アミノ酸配列):

```

Q VQLQQPGAEL VKPGASVKMS
CKASGYTFTS YNMHWVKQTF GRGLEWIGAI YPGNGDTSYN
QKFKGKATLT ADKSSSTAYM QLSSLTSEDS AVYYCARSTY
YGGDWYFNW GAGTTVTVSA ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG
GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTPFAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP
KSCDKHTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPPK KDTLMSRTP
EVTCCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
KARGQPREPQ VYTLPPSRDE LTRKQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSEFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHHT QKSLSLSPGK

```

【 図 3 】

Figure 3

配列番号3(シグナル配列を有する軽鎖):

```

MDFQVQIISF LLISASVIMS RGQIVLSQSP ALLSASPGEK
VTMTCRASSS VSYIHWQK PGSSPKPWIY ATSNLASGVP
VRFSGSGSGT SYSLTISRVE AEDAATYYCQ QWTSNPPTFG
GGTKLEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNMF
YPREAKVQWK VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTL
TLISKADYEKH KVIACEVTHQ GLSSPVTKSF NRGEK

```

(シグナル配列に下線を付す)

【 図 4 】

Figure 4

配列番号4(シグナル配列を有する重鎖):

```

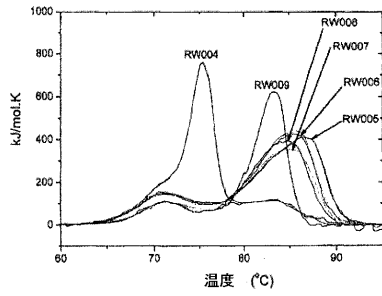
MGWSLILFL VAVATRVLSQ VQLQQPGAEL VKPGASVKMS
CKASGYTFTS YNMHWVKQTF GRGLEWIGAI YPGNGDTSYN
QKFKGKATLT ADKSSSTAYM QLSSLTSEDS AVYYCARSTY
YGGDWYFNW GAGTTVTVSA ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG
GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTPFAVLQSS
GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKQVEP
KSCDKHTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPPK KDTLMSRTP
EVTCCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS
KARGQPREPQ VYTLPPSRDE LTRKQVSLTC LVKGFYPSDI
AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSEFFLY SKLTVDKSRW
QQGNVFSCSV MHEALHNHHT QKSLSLSPGK

```

(シグナル配列に下線を付す)

【 図 5 】

Figure 5



【 図 6 】

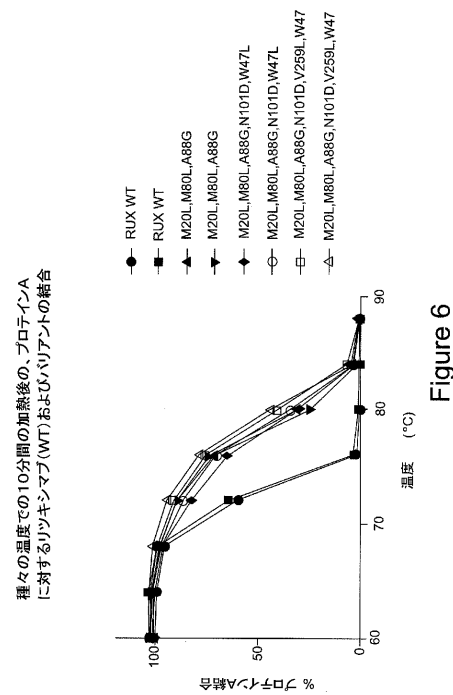


Figure 6

【 配 列 表 】

2015506687000001.app

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 26 年 9 月 18 日 (2014.9.18)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 特 許 請 求 の 範 囲

【 補 正 対 象 項 目 名 】 全 文

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 特 許 請 求 の 範 囲 】

【 請 求 項 1 】

単離された安定化抗CD20抗体であって、

a. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA79Pのうち1つもしくは複数を含む；

b. 単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M20LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y32S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M81L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F279LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を含む；ならびに

c. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a)に列挙した配列番号1におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む、または前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b)に列挙した配列番号2におけるアミノ酸配列変化

のうち少なくとも1つを含む、
単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項2】

前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項3】

前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Iアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項4】

前記重鎖アミノ酸配列が、以下のアミノ酸配列変化M20L、M20I、M81L、A92G、N109DまたはV263Lのうち1つを有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項5】

前記重鎖アミノ酸配列が、M20Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項6】

前記重鎖アミノ酸配列が、M20Iアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項7】

前記重鎖アミノ酸配列が、M81Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項8】

前記重鎖アミノ酸配列が、A92Gアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項9】

前記重鎖アミノ酸配列が、N109Dアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項10】

前記重鎖アミノ酸配列が、V263Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項11】

a．前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、および

b．前記重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G、N109DおよびV263Lのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、
請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項12】

a．前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b．前記重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G、N109DおよびV263Lのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、
請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項13】

a．前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、および

b．前記重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81L、A92GおよびN109Dのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、
請求項1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

【請求項14】

a．前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b．前記重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81L、A92GおよびN109Dのアミ

ノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 1 に記載の単離された安定化抗 CD 20 抗体。

【請求項 15】

a . 前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 を含み、および
b . 前記重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L、M 8 1 L および A 9 2 G のアミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 1 に記載の単離された抗 CD 20 抗体。

【請求項 16】

前記抗 CD 20 抗体の重鎖または軽鎖のいずれかが、示差走査熱量測定 (D S C)、円二色性 (C D) 分光法、蛍光発光分光法、核磁気共鳴 (N M R) 分光法、サイズ排除クロマトグラフィーまたは熱的チャレンジアッセイによって測定した場合に、野生型抗 CD 20 抗体の対応する重鎖または軽鎖よりも優れた熱安定性を有する場合に、該抗 CD 20 抗体が安定化しているとみなされる、請求項 1 に記載の単離された安定化抗 CD 20 抗体。

【請求項 17】

前記抗 CD 20 抗体が、同じ量の野生型抗 CD 20 抗体と比較した場合に、増強された抗原結合活性、有効期間、血清半減期、A U C または $C_{m a x}$ を有する、請求項 1 に記載の単離された安定化抗 CD 20 抗体。

【請求項 18】

単離された安定化抗 CD 20 抗体であって、

a . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化：S 4 1 Q、S 4 2 P、W 4 6 L、W 4 6 I、S 5 5 P、V 5 9 A、V 5 9 D、S 6 9 D、S 6 9 N、Y 7 0 F および A 7 9 P のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み；

b . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 2 または以下のアミノ酸配列変化：V 3 7 L および M 2 0 L、M 2 0 L および A 9 2 G、Q 5 V、P 7 S、E 1 0 G、M 2 0 L、M 2 0 I、T 2 8 S、Y 3 2 S、A 6 8 F、A 6 8 V、T 6 9 I、L 7 0 I、A 7 2 V、K 7 4 N、K 7 4 T、M 8 1 L、S 8 4 N、A 9 2 G、N 1 0 9 D、A 1 1 3 Q、V 2 6 3 L、V 2 7 7 I、F 2 7 9 L ならびに V 3 1 2 I のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 2 を含み；

c . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、(a) に列挙した配列番号 1 におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み、または該安定化抗 CD 20 抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配列の等価物が、(b) に列挙した配列番号 2 におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み；ならびに

d . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体が、インタクトな抗体、F v 断片、単鎖可変領域 (S c F v) 抗体、モノクローナル抗体、F a b 抗体断片、F a b ' 抗体断片または F a b ' 2 F a b 抗体断片の形態である、
単離された安定化抗 CD 20 抗体。

【請求項 19】

請求項 18 に記載の安定化抗 CD 20 抗体の単一の軽鎖または重鎖をコードする、単離された核酸。

【請求項 20】

R N A または D N A である、請求項 19 に記載の単離された核酸。

【請求項 21】

請求項 19 に記載の核酸のうちいずれか 1 つの発現を導く、単離されたベクター。

【請求項 22】

前記発現が誘導性である、請求項 21 に記載の単離されたベクター。

【請求項 23】

請求項 19 に記載のベクターのうち 1 つまたは複数を含み、単離された細胞。

【請求項 24】

原核生物細胞である、請求項 2 3 に記載の細胞。

【請求項 2 5】

真核生物細胞である、請求項 2 3 に記載の細胞。

【請求項 2 6】

チャイニーズハムスター卵巣細胞である、請求項 2 5 に記載の真核生物細胞。

【請求項 2 7】

前記ベクターのうち 1 つまたは複数によって一過性に形質転換される、請求項 2 3 に記載の細胞。

【請求項 2 8】

前記ベクターのうち 1 つまたは複数によって安定に形質転換される、請求項 2 2 に記載の細胞。

【請求項 2 9】

単離された前記抗 CD 20 抗体の軽鎖または重鎖アミノ酸配列が、

a . 該抗 CD 20 抗体が CD 20 分子に結合する能力、補体を固定する能力、CD - 20 発現細胞をオプソニン化する能力、抗体依存性細胞傷害 (ADCC) を活性化する能力、抗体依存性プログラム細胞死を活性化する能力、マクロファージ依存性抗 CD 20 免疫応答を活性化する能力、化学療法に対して感受性の CD 20 保有細胞を活性化する能力を増強する；

b . 該抗 CD 20 抗体が補体を固定する能力を低減させる；

さらなるアミノ酸配列変化、ならびに、

c . (a) および (b) のさらなるアミノ酸配列変化の組合せ、を有する、請求項 1 に記載の単離された抗 CD 20 抗体。

【請求項 3 0】

前記抗 CD 20 抗体がエフェクターに結合している、請求項 1 のいずれか 1 項に記載の単離された安定化抗 CD 20 抗体。

【請求項 3 1】

前記エフェクターが、放射性同位体、化学療法剤、毒素、生体応答改変因子または第 2 の抗体である、請求項 3 0 に記載の単離された抗 CD 20 抗体。

【請求項 3 2】

PEG、アルブミンまたはポリシアル酸に結合している、請求項 1 に記載の単離された抗 CD 20 抗体。

【請求項 3 3】

請求項 1 に記載の抗 CD 20 抗体および薬学的に許容されるキャリアを含む、薬理的組成物。

【請求項 3 4】

患者において疾患を処置するための組成物であって、該組成物は、薬学的に許容されるキャリア中の治療有効量の安定化抗 CD 20 抗体を含み、ここで、

a . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化：S 4 1 Q、S 4 2 P、W 4 6 L、W 4 6 I、S 5 5 P、V 5 9 A、V 5 9 D、S 6 9 D、S 6 9 N、Y 7 0 F および A 7 9 P のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み；

b . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号 2 または以下のアミノ酸配列変化：V 3 7 L および M 2 0 L、M 2 0 L および A 9 2 G、Q 5 V、P 7 S、E 1 0 G、M 2 0 L、M 2 0 I、T 2 8 S、Y 3 2 S、A 6 8 F、A 6 8 V、T 6 9 I、L 7 0 I、A 7 2 V、K 7 4 N、K 7 4 T、M 8 1 L、S 8 4 N、A 9 2 G、N 1 0 9 D、A 1 1 3 Q、V 2 6 3 L、V 2 7 7 I、F 2 7 9 L ならびに V 3 1 2 I のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 2 を含み；ならびに

c . 単離された該安定化抗 CD 20 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a) に列挙した配列番号 1 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含む、または該安定化抗 CD 20 抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b) に列挙した配列番号 2 における該アミノ酸配列変

化のうち少なくとも1つを含む、
組成物。

【請求項35】

前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、請求項34に記載の組成物。

【請求項36】

前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W46Iアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、請求項34に記載の組成物。

【請求項37】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、以下のアミノ酸配列変化M20L、M20I、M81L、A92G、N109DまたはV263Lのうち1つを有する配列番号2を含む、請求項34に記載の組成物。

【請求項38】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の組成物。

【請求項39】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20Iアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の組成物。

【請求項40】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M81Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の組成物。

【請求項41】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、A92Gアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の組成物。

【請求項42】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、N109Dアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の組成物。

【請求項43】

前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、V263Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項37に記載の組成物。

【請求項44】

a. 前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、および

b. 前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G、N109DおよびV263Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項34に記載の組成物。

【請求項45】

a. 前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b. 前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G、N109DおよびV263Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項34に記載の組成物。

【請求項46】

a. 前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、および

b. 前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81L、A92GおよびN109Dアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、請求項34に記載の組成物。

【請求項47】

a. 前記安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b. 前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81L、A92G

、および N 1 0 9 D アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 を含み、および
b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L、M 8 1 L および A 9
2 G アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、
請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

前記抗 C D 2 0 抗体の重鎖または軽鎖のいずれかが、示差走査熱量測定 (D S C)、円
二色性 (C D) 分光法、蛍光発光分光法、核磁気共鳴 (N M R) 分光法、サイズ排除クロ
マトグラフィーまたは熱的チャレンジアッセイによって測定した場合に、野生型抗 C D 2
0 抗体の対応する重鎖または軽鎖よりも優れた熱安定性を有する場合に、該抗 C D 2 0 抗
体が安定化しているとみなされる、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 5 0】

前記安定化抗 C D 2 0 抗体が、同じ量の野生型抗 C D 2 0 抗体と比較した場合に、増強
された抗原結合活性、有効期間、血清半減期、A U C または $C_{m a x}$ を有する、請求項 3
4 に記載の組成物。

【請求項 5 1】

前記抗 C D 2 0 抗体の軽鎖または重鎖アミノ酸配列が、該抗体が C D 2 0 分子に結合す
る能力、補体を固定する能力、C D - 2 0 発現細胞をオプソニン化する能力、抗体依存性
細胞傷害 (A D C C) を活性化する能力、抗体依存性プログラム細胞死を活性化する能力
、マクロファージ依存性抗 C D 2 0 免疫応答を活性化する能力、化学療法に対して感受性
の C D 2 0 保有細胞を活性化する能力を増強する、または該抗 C D 2 0 抗体が補体を固定
する能力を低減させるさらなるアミノ酸変化、ならびにそれらの組合せを有する、請求項
3 4 に記載の組成物。

【請求項 5 2】

前記抗 C D 2 0 抗体がエフェクターに結合している、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

前記エフェクターが、放射性同位体、化学療法剤、毒素、生体応答改変因子または第 2
の抗体である、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 4】

前記抗 C D 2 0 抗体が、P E G、アルブミンまたはポリシアル酸に結合している、請求
項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

前記疾患が、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、関節リウマチ、ウェゲナー肉
芽腫症または顕微鏡的多発血管炎である、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

前記抗 C D 2 0 抗体が、インタクトな抗体、単鎖可変領域 (S c F v) 抗体、モノクロー
ナル抗体、F a b 抗体断片、F a b ' 抗体断片または F a b ' 2 抗体断片の形態である
、請求項 3 4 に記載の組成物。

【請求項 5 7】

患者において C D 2 0 ポリペプチドを定量的に検出するための組成物であって、該組成
物は、薬学的に許容されるキャリア中の診断有効量の安定化抗 C D 2 0 抗体を含み、

a . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列
の等価物が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化：S 4 1 Q、S 4 2 P、W 4 6 L
、W 4 6 I、S 5 5 P、V 5 9 A、V 5 9 D、S 6 9 D、S 6 9 N、Y 7 0 F および A 7
9 P のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み；

b . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列
の等価物が、配列番号 2 または以下のアミノ酸配列変化：V 3 7 L および M 2 0 L、M 2
0 L および A 9 2 G、Q 5 V、P 7 S、E 1 0 G、M 2 0 L、M 2 0 I、T 2 8 S、Y 3

2 S、A 6 8 F、A 6 8 V、T 6 9 I、L 7 0 I、A 7 2 V、K 7 4 N、K 7 4 T、M 8 1 L、S 8 4 N、A 9 2 G、N 1 0 9 D、A 1 1 3 Q、V 2 6 3 L、V 2 7 7 I、F 2 7 9 L ならびに V 3 1 2 I のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 2 を含み；

c . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、(a) に列挙した配列番号 1 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み、または該安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配列の等価物が、(b) に列挙した配列番号 2 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み；ならびに

d . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体が、インタクトな抗体、F v 断片、単鎖可変領域 (S c F v) 抗体、モノクローナル抗体、F a b 抗体断片、F a b ' 抗体断片または F a b ' 2 F a b 抗体断片の形態である、
組成物。

【請求項 5 8】

生物学的検体中の C D 2 0 ポリペプチドを定量的に検出する方法であって、診断量の安定化抗 C D 2 0 抗体を該生物学的検体と接触させるステップを含み、

a . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化：S 4 1 Q、S 4 2 P、W 4 6 L、W 4 6 I、S 5 5 P、V 5 9 A、V 5 9 D、S 6 9 D、S 6 9 N、Y 7 0 F および A 7 9 P のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み；

b . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 2 または以下のアミノ酸配列変化：V 3 7 L および M 2 0 L、M 2 0 L および A 9 2 G、Q 5 V、P 7 S、E 1 0 G、M 2 0 L、M 2 0 I、T 2 8 S、Y 3 2 S、A 6 8 F、A 6 8 V、T 6 9 I、L 7 0 I、A 7 2 V、K 7 4 N、K 7 4 T、M 8 1 L、S 8 4 N、A 9 2 G、N 1 0 9 D、A 1 1 3 Q、V 2 6 3 L、V 2 7 7 I、F 2 7 9 L ならびに V 3 1 2 I のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 2 を含み；

c . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、(a) に列挙した配列番号 1 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み、または該安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配列の等価物が、(b) に列挙した配列番号 2 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み；ならびに

d . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体が、インタクトな抗体、F v 断片、単鎖可変領域 (S c F v) 抗体、モノクローナル抗体、F a b 抗体断片、F a b ' 抗体断片または F a b ' 2 F a b 抗体断片の形態である、方法。

【請求項 5 9】

前記抗 C D 2 0 抗体が、E L I S A アッセイ、ウエスタンブロット、スロットブロット、抗原捕捉アッセイまたはマイクロアレイアッセイにおいて使用される、請求項 5 7 に記載の組成物。

【請求項 6 0】

単離された抗 C D 2 0 抗体であって、

a . 該抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化：Q 1 D、S 5 T、A 9 S、A 9 L、I 1 0 L、I 1 0 F、I 1 0 S、I 1 0 T、A 1 3 V、P 1 5 A、P 1 5 L、P 1 5 V、K 1 8 Q、K 1 8 R、K 1 8 E、M 2 1 I、M 2 1 L、S 2 7 Q、S 2 7 K、I 3 2 L、H 3 3 N、F 3 5 Y、P 3 9 S、S 4 1 A、S 4 1 T、S 4 1 Q、S 4 2 A、S 4 2 P、P 4 5 L、P 4 5 R、W 4 6 L、W 4 6 I、A 4 9 D、S 5 5 P、V 5 9 A、V 5 9 D、F 6 1 T、S 6 9 D、S 6 9 N、S 6 9 T、Y 7 0 F、S 7 1 T、A 7 9 P、A 8 2 L、A 8 2 V、A 8 2 F、Q 8 8 L および G 9 9 Q のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み；

b . 該抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号 2、または以下のアミノ酸配列変化：

i . V 3 7 L、M 2 0 L、ならびに Q 5 V、P 7 S、A 9 G、A 9 L、E 1 0 G、K

13Q、T28S、T30S、K67R、K67R、A68F、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、Y80F、M81L、S84N、A92G、W106S、F108A、N109DおよびA113Qのうち1つもしくは複数；

ii. M20L、A92G、ならびにV18L、K19R、K19S、K19T、M20I、M20V、S25T、Y27F、Y32F、Y32S、P41H、G44E、L45Rのうち1つもしくは複数；および

iii. V244L、L246I、V263L、V267A、V267I、V267L、V270L、V270S、V270F、V270I、V277I、F279I、F279L、V306T、V312I、V312L、V327A、V327L、I340A、I340L、T254E、M256L、M256Y、T260E、T260FおよびT260K、

のうち1つもしくは複数を有する配列番号2を含み；ならびに

c. ここで、該抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a)に列挙した配列番号1におけるアミノ酸変化のうち少なくとも1つを含み、または該抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b)に列挙した配列番号2におけるアミノ酸変化のうち少なくとも1つを含む、

単離された抗CD20抗体。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0009

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0009】

さらに、本発明は、患者または生物学的検体中のCD20ポリペプチドを定量的に検出する方法を提供し、この方法は、診断有効量の本発明によって提供される安定化抗CD20抗体を該患者に投与するステップまたは該検体をこの診断有効量の本発明によって提供される安定化抗CD20抗体と接触させるステップを含む。

本発明の好ましい実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

単離された安定化抗CD20抗体であって、

a. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA79Pのうち1つもしくは複数を有する配列番号1を含み；

b. 単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M20LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y32S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M81L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F279LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を有する配列番号2を含み；ならびに

c. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a)に列挙した配列番号1におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む、または前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b)に列挙した配列番号2におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含む、

単離された安定化抗CD20抗体。

(項目2)

前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、項目

1 に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目3)

前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Iアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目4)

前記重鎖アミノ酸配列が、以下のアミノ酸配列変化M20L、M20I、M81L、A92G、N109DまたはV263Lのうち1つを有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目5)

前記重鎖アミノ酸配列が、M20Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目6)

前記重鎖アミノ酸配列が、M20Iアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目7)

前記重鎖アミノ酸配列が、M81Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目8)

前記重鎖アミノ酸配列が、A92Gアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目9)

前記重鎖アミノ酸配列が、N109Dアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目10)

前記重鎖アミノ酸配列が、V263Lアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目11)

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G、N109DおよびV263Lのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目12)

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20I、M81L、A92G、N109DおよびV263Lのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目13)

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、W46Lアミノ酸配列変化を有する配列番号1を含み、および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81L、A92GおよびN109Dのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目14)

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b. 前記重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81L、A92GおよびN109Dのアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目1に記載の単離された安定化抗CD20抗体。

(項目15)

a. 前記軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1を含み、および

b . 前記重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L、M 8 1 LおよびA 9 2 Gのアミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、

項目 1 に記載の単離された抗 C D 2 0 抗体。

(項目 1 6)

前記抗 C D 2 0 抗体の重鎖または軽鎖のいずれかが、示差走査熱量測定 (D S C)、円二色性 (C D) 分光法、蛍光発光分光法、核磁気共鳴 (N M R) 分光法、サイズ排除クロマトグラフィーまたは熱的チャレンジアッセイによって測定した場合に、野生型抗 C D 2 0 抗体の対応する重鎖または軽鎖よりも優れた熱安定性を有する場合に、該抗 C D 2 0 抗体が安定化しているとみなされる、項目 1 に記載の単離された安定化抗 C D 2 0 抗体。

(項目 1 7)

前記抗 C D 2 0 抗体が、同じ量の野生型抗 C D 2 0 抗体と比較した場合に、増強された抗原結合活性、有効期間、血清半減期、A U C または $C_{m a x}$ を有する、項目 1 に記載の単離された安定化抗 C D 2 0 抗体。

(項目 1 8)

単離された安定化抗 C D 2 0 抗体であって、

a . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化 : S 4 1 Q、S 4 2 P、W 4 6 L、W 4 6 I、S 5 5 P、V 5 9 A、V 5 9 D、S 6 9 D、S 6 9 N、Y 7 0 F および A 7 9 P のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み ;

b . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号 2 または以下のアミノ酸配列変化 : V 3 7 L および M 2 0 L、M 2 0 L および A 9 2 G、Q 5 V、P 7 S、E 1 0 G、M 2 0 L、M 2 0 I、T 2 8 S、Y 3 2 S、A 6 8 F、A 6 8 V、T 6 9 I、L 7 0 I、A 7 2 V、K 7 4 N、K 7 4 T、M 8 1 L、S 8 4 N、A 9 2 G、N 1 0 9 D、A 1 1 3 Q、V 2 6 3 L、V 2 7 7 I、F 2 7 9 L ならびに V 3 1 2 I のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 2 を含み ;

c . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、(a) に列挙した配列番号 1 におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み、または該安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配列の等価物が、(b) に列挙した配列番号 2 におけるアミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含み ; ならびに

d . 単離された該安定化抗 C D 2 0 抗体が、インタクトな抗体、F v 断片、単鎖可変領域 (S c F v) 抗体、モノクローナル抗体、F a b 抗体断片、F a b ' 抗体断片または F a b ' 2 F a b 抗体断片の形態である、
単離された安定化抗 C D 2 0 抗体。

(項目 1 9)

項目 1 8 に記載の安定化抗 C D 2 0 抗体の単一の軽鎖または重鎖をコードする、単離された核酸。

(項目 2 0)

R N A または D N A である、項目 1 9 に記載の単離された核酸。

(項目 2 1)

項目 1 9 に記載の核酸のうちいずれか 1 つの発現を導く、単離されたベクター。

(項目 2 2)

前記発現が誘導性である、項目 2 1 に記載の単離されたベクター。

(項目 2 3)

項目 1 9 に記載のベクターのうち 1 つまたは複数を含み、単離された細胞。

(項目 2 4)

原核生物細胞である、項目 2 3 に記載の細胞。

(項目 2 5)

真核生物細胞である、項目 2 3 に記載の細胞。

(項目 2 6)

チャイニーズハムスター卵巣細胞である、項目 2 5 に記載の真核生物細胞。

(項目 2 7)

前記ベクターのうち 1 つまたは複数によって一過性に形質転換される、項目 2 3 に記載の細胞。

(項目 2 8)

前記ベクターのうち 1 つまたは複数によって安定に形質転換される、項目 2 2 に記載の細胞。

(項目 2 9)

単離された前記抗 CD 2 0 抗体の軽鎖または重鎖アミノ酸配列が、

a . 該抗 CD 2 0 抗体が CD 2 0 分子に結合する能力、補体を固定する能力、CD - 2 0 発現細胞をオプソニン化する能力、抗体依存性細胞傷害 (A D C C) を活性化する能力、抗体依存性プログラム細胞死を活性化する能力、マクロファージ依存性抗 CD 2 0 免疫応答を活性化する能力、化学療法に対して感受性の CD 2 0 保有細胞を活性化する能力を増強する；

b . 該抗 CD 2 0 抗体が補体を固定する能力を低減させる；

さらなるアミノ酸配列変化、ならびに、

c . (a) および (b) のさらなるアミノ酸配列変化の組合せ、を有する、項目 1 に記載の単離された抗 CD 2 0 抗体。

(項目 3 0)

前記抗 CD 2 0 抗体がエフェクターに結合している、項目 1 のいずれか 1 項に記載の単離された安定化抗 CD 2 0 抗体。

(項目 3 1)

前記エフェクターが、放射性同位体、化学療法剤、毒素、生体応答改変因子または第 2 の抗体である、項目 3 0 に記載の単離された抗 CD 2 0 抗体。

(項目 3 2)

P E G、アルブミンまたはポリシアル酸に結合している、項目 1 に記載の単離された抗 CD 2 0 抗体。

(項目 3 2)

項目 1 に記載の抗 CD 2 0 抗体および薬学的に許容されるキャリアを含む、薬理的組成物。

(項目 3 4)

患者において疾患を処置する方法であって、薬学的に許容されるキャリア中の治療有効量の安定化抗 CD 2 0 抗体を該患者に投与するステップを含み、ここで、

a . 単離された前記安定化抗 CD 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 または以下のアミノ酸配列変化：S 4 1 Q、S 4 2 P、W 4 6 L、W 4 6 I、S 5 5 P、V 5 9 A、V 5 9 D、S 6 9 D、S 6 9 N、Y 7 0 F および A 7 9 P のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 1 を含み；

b . 単離された該安定化抗 CD 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号 2 または以下のアミノ酸配列変化：V 3 7 L および M 2 0 L、M 2 0 L および A 9 2 G、Q 5 V、P 7 S、E 1 0 G、M 2 0 L、M 2 0 I、T 2 8 S、Y 3 2 S、A 6 8 F、A 6 8 V、T 6 9 I、L 7 0 I、A 7 2 V、K 7 4 N、K 7 4 T、M 8 1 L、S 8 4 N、A 9 2 G、N 1 0 9 D、A 1 1 3 Q、V 2 6 3 L、V 2 7 7 I、F 2 7 9 L ならびに V 3 1 2 I のうち 1 つもしくは複数を有する配列番号 2 を含み；ならびに

c . 単離された該安定化抗 CD 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a) に列挙した配列番号 1 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含む、または該安定化抗 CD 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b) に列挙した配列番号 2 における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも 1 つを含む、

方法。

(項目 3 5)

前記安定化抗 CD 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W 4 6 L アミノ酸配列変化を有する

配列番号 1 を含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 6)

前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W 4 6 I アミノ酸配列変化を有する配列番号 1 を含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 7)

前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、以下のアミノ酸配列変化 M 2 0 L、M 2 0 I、M 8 1 L、A 9 2 G、N 1 0 9 D または V 2 6 3 L のうち 1 つを有する配列番号 2 を含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 3 8)

前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 3 9)

前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 I アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 0)

前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 8 1 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 1)

前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、A 9 2 G アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、N 1 0 9 D アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 3)

前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、V 2 6 3 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 7 に記載の方法。

(項目 4 4)

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W 4 6 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 1 を含み、および

b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 I、M 8 1 L、A 9 2 G、N 1 0 9 D および V 2 6 3 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 4 5)

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 を含み、および

b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 I、M 8 1 L、A 9 2 G、N 1 0 9 D および V 2 6 3 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、W 4 6 L アミノ酸配列変化を有する配列番号 1 を含み、および

b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L、M 8 1 L、A 9 2 G および N 1 0 9 D アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 4 6)

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 を含み、および

b . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の重鎖アミノ酸配列が、M 2 0 L、M 8 1 L、A 9 2 G、および N 1 0 9 D アミノ酸配列変化を有する配列番号 2 を含む、項目 3 4 に記載の方法。

(項目 4 8)

a . 前記安定化抗 C D 2 0 抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号 1 を含み、および

b . 前記安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、M20L、M81LおよびA92Gアミノ酸配列変化を有する配列番号2を含む、項目34に記載の方法。

(項目49)

前記抗CD20抗体の重鎖または軽鎖のいずれかが、示差走査熱量測定(DSC)、円二色性(CD)分光法、蛍光発光分光法、核磁気共鳴(NMR)分光法、サイズ排除クロマトグラフィーまたは熱的チャレンジアッセイによって測定した場合に、野生型抗CD20抗体の対応する重鎖または軽鎖よりも優れた熱安定性を有する場合に、該抗CD20抗体が安定化しているとみなされる、項目34に記載の方法。

(項目50)

前記安定化抗CD20抗体が、同じ量の野生型抗CD20抗体と比較した場合に、増強された抗原結合活性、有効期間、血清半減期、AUCまたはC_{max}を有する、項目34に記載の方法。

(項目51)

前記抗CD20抗体の軽鎖または重鎖アミノ酸配列が、該抗体がCD20分子に結合する能力、補体を固定する能力、CD-20発現細胞をオプソニン化する能力、抗体依存性細胞傷害(ADCC)を活性化する能力、抗体依存性プログラム細胞死を活性化する能力、マクロファージ依存性抗CD20免疫応答を活性化する能力、化学療法に対して感受性のCD20保有細胞を活性化する能力を増強する、または該抗CD20抗体が補体を固定する能力を低減させるさらなるアミノ酸変化、ならびにそれらの組合せを有する、項目34に記載の方法。

(項目52)

前記抗CD20抗体がエフェクターに結合している、項目34に記載の方法。

(項目53)

前記エフェクターが、放射性同位体、化学療法剤、毒素、生体応答改変因子または第2の抗体である、項目52に記載の方法。

(項目54)

前記抗CD20抗体が、PEG、アルブミンまたはポリシアル酸に結合している、項目34に記載の方法。

(項目55)

前記疾患が、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、関節リウマチ、ウェゲナー肉芽腫症または顕微鏡的多発血管炎である、項目34に記載の方法。

(項目56)

前記抗CD20抗体が、インタクトな抗体、単鎖可変領域(SCFV)抗体、モノクローナル抗体、Fab抗体断片、Fab'抗体断片またはFab'2抗体断片の形態である、項目34に記載の方法。

(項目57)

患者においてCD20ポリペプチドを定量的に検出する方法であって、薬学的に許容されるキャリア中の診断有効量の安定化抗CD20抗体を該患者に投与するステップを含み、

a . 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA79Pのうち1つもしくは複数を含む、

b . 単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M20LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y32S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M81L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F279LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を含む、

c. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、(a)に列挙した配列番号1における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含み、または該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配列の等価物が、(b)に列挙した配列番号2における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含み；ならびに

d. 単離された該安定化抗CD20抗体が、インタクトな抗体、Fv断片、単鎖可変領域(ScFv)抗体、モノクローナル抗体、Fab抗体断片、Fab'抗体断片またはFab'2 Fab抗体断片の形態である、方法。

(項目58)

生物学的検体中のCD20ポリペプチドを定量的に検出する方法であって、診断量の安定化抗CD20抗体を該生物学的検体と接触させるステップを含み、

a. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：S41Q、S42P、W46L、W46I、S55P、V59A、V59D、S69D、S69N、Y70FおよびA79Pのうち1つもしくは複数を有する配列番号1を含み；

b. 単離された該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列または該重鎖アミノ酸配列の等価物が、配列番号2または以下のアミノ酸配列変化：V37LおよびM20L、M20LおよびA92G、Q5V、P7S、E10G、M20L、M20I、T28S、Y32S、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、M81L、S84N、A92G、N109D、A113Q、V263L、V277I、F279LならびにV312Iのうち1つもしくは複数を有する配列番号2を含み；

c. 単離された該安定化抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列または該軽鎖アミノ酸配列の等価物が、(a)に列挙した配列番号1における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含み、または該安定化抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列もしくは該重鎖アミノ酸配列の等価物が、(b)に列挙した配列番号2における該アミノ酸配列変化のうち少なくとも1つを含み；ならびに

d. 単離された該安定化抗CD20抗体が、インタクトな抗体、Fv断片、単鎖可変領域(ScFv)抗体、モノクローナル抗体、Fab抗体断片、Fab'抗体断片またはFab'2 Fab抗体断片の形態である、方法。

(項目59)

前記抗CD20抗体が、ELISAアッセイ、ウエスタンブロット、スロットブロット、抗原捕捉アッセイまたはマイクロアレイアッセイにおいて使用される、項目57に記載の方法。

(項目60)

単離された抗CD20抗体であって、

a. 該抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、配列番号1または以下のアミノ酸配列変化：Q1D、S5T、A9S、A9L、I10L、I10F、I10S、I10T、A13V、P15A、P15L、P15V、K18Q、K18R、K18E、M21I、M21L、S27Q、S27K、I32L、H33N、F35Y、P39S、S41A、S41T、S41Q、S42A、S42P、P45L、P45R、W46L、W46I、A49D、S55P、V59A、V59D、F61T、S69D、S69N、S69T、Y70F、S71T、A79P、A82L、A82V、A82F、Q88LおよびG99Qのうち1つもしくは複数を有する配列番号1を含み；

b. 該抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、配列番号2、または以下のアミノ酸配列変化：

i. V37L、M20L、ならびにQ5V、P7S、A9G、A9L、E10G、K13Q、T28S、T30S、K67R、K67R、A68F、A68F、A68V、T69I、L70I、A72V、K74N、K74T、Y80F、M81L、S84N、A92G、W106S、F108A、N109DおよびA113Qのうち1つもしくは複数を

i

ii . M 2 0 L、A 9 2 G、ならびに V 1 8 L、K 1 9 R、K 1 9 S、K 1 9 T、M 2 0 I、M 2 0 V、S 2 5 T、Y 2 7 F、Y 3 2 F、Y 3 2 S、P 4 1 H、G 4 4 E、L 4 5 Rのうち1つもしくは複数；および

iii . V 2 4 4 L、L 2 4 6 I、V 2 6 3 L、V 2 6 7 A、V 2 6 7 I、V 2 6 7 L、V 2 7 0 L、V 2 7 0 S、V 2 7 0 F、V 2 7 0 I、V 2 7 7 I、F 2 7 9 I、F 2 7 9 L、V 3 0 6 T、V 3 1 2 I、V 3 1 2 L、V 3 2 7 A、V 3 2 7 L、I 3 4 0 A、I 3 4 0 L、T 2 5 4 E、M 2 5 6 L、M 2 5 6 Y、T 2 6 0 E、T 2 6 0 Fおよび T 2 6 0 K、

のうち1つもしくは複数を有する配列番号2を含み；ならびに

c . ここで、該抗CD20抗体の軽鎖アミノ酸配列が、(a)に列挙した配列番号1におけるアミノ酸変化のうち少なくとも1つを含み、または該抗CD20抗体の重鎖アミノ酸配列が、(b)に列挙した配列番号2におけるアミノ酸変化のうち少なくとも1つを含む、

単離された抗CD20抗体。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 12/21888
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12P 21/08; C07K 16/00; A61K 39/00 (2012.01) USPC - 424/133.1; 424/141.1; 530/387.3 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) USPC: 424/133.1; 424/141.1; 530/387.3 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 424/130.1, 133.1, 141.1; 530/387.1, 387.3, 388.1 (keyword limited; terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Google; PubMed Search terms: anti-CD20, anti/body, rituximab, substitution, mutation, stabilized, S41Q, V37L, W46L, N109D, SEQ ID NO:1, SEQ ID NO:2		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2006/0160996 A1 (LAZAR et al.) 20 July 2006 (20.07.2006) para [0024], [0031], [0074]; Fig. 38A-B; SEQ ID NOS:3, 4	1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60
A	US 2009/0281284 A1 (SHIOTSUKA et al.) 12 November 2009 (12.11.2009) para [0385]	1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60
A	US 2005/0147614 A1 (BEGENT et al.) 7 July 2005 (07.07.2005) claim 2	1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60
A	US 2002/0146750 A1 (HOOGENBOOM et al.) 10 October 2002 (10.10.2002) para [0204]	1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60
A	WO 2010/008690 A1 (STEVENS) 21 January 2010 (21.01.2010) para [0028]-[0029]	1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60
A	US 2010/0034738 A1 (GOLDENBERG et al.) 11 February 2010 (11.02.2010)	1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60
A	US 2009/0060921 A1 (DICKEY et al.) 5 March 2009 (05.03.2009)	1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60
A	US 2009/0155257 A1 (ADAMS et al.) 18 June 2009 (18.06.2009)	1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 19 July 2012 (19.07.2012)		Date of mailing of the international search report 24 SEP 2012
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT QSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/21888

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I: Claims 1, 16-33*, and 60, isolated stabilized anti-CD20 antibody, limited to substitution S41Q of the light chain and substitution V37L of the heavy chain.

Group II*: Claims 1-33* and 60, isolated stabilized anti-CD20 antibody, wherein the substitution of the light chain is selected from S42P, W46L, W46I, S55P, V59A, V59D, S69D, S69N, Y70F, and A79P, and the substitution of the heavy chain is selected from M20L, M20I, A92G, Q5V, P7S, E10G, M20L, M20I, T28S, Y32S, A68F, A68V, T69I, L70I, A72V, K74N, K74T, M81L, S84N, A92G, N109D, A13Q, V263L, V277I, F279L, and V312I. If Applicant elects to have this group searched, Applicant must specify the specific light chain and heavy chain substitutions to be searched. Each substitution constitutes an inventive concept.

NOTE: Claims 3, 5-8, 10, 15, were not searched as part of Groups I or II as they are directed to non-elected subject matter.

(Continued on extra sheet)

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
1-2, 4, 9, 11-14, 16-33, 60, limited to substitutions S41Q and W46L of the light chain and substitutions V37L and N109D of the heavy chain.
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 12/21888

Continuation of Box III - observations where unity of invention is lacking:

Group III+: Claims 34-56, method of treating a disease. If Applicant elects to have this group searched, Applicant must specify the specific light chain and heavy chain substitutions to be searched. Each substitution constitutes an inventive concept.

Group IV: Claims 57-59, method of quantitatively detecting a CD20 polypeptide.

*Note: there are two instances of claim 32, and claim 33 is missing. The second instance of claim 32 is referenced herein as claim 33.

The inventions listed as Groups I, II+, III+, and IV do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The shared technical feature of the inventions listed as Groups I, II+, III+, and IV is a stabilized anti-CD20 antibody as generally set forth in claim 1. This shared technical feature fails to provide a contribution over the prior art, as evidenced by US 2006/0160996 A1 to Lazar et al. (published 20 July 2006; hereinafter "Lazar"). Lazar discloses an isolated stabilized (para [0031] - "Improved solution properties herein includes but is not limited to stability and solubility") anti-CD20 antibody (para [0074]), wherein

(a) the isolated stabilized anti-CD20 antibody light chain amino acid sequence comprises claimed SEQ ID NO:1 (para [0074]; Fig. 38A; SEQ ID NO:3);

(b) the isolated stabilized anti-CD20 antibody heavy chain amino acid sequence comprises claimed SEQ ID NO:2 (para [0074]; Fig. 38B; SEQ ID NO:4); and

(c) the isolated stabilized anti-CD20 antibody heavy chain amino acid sequence comprises at least one amino acid substitution at position V263 (para [0024] - substitution at position 263 of the Fc domain, which comprises the heavy chain). Lazar specifically teaches substitution V263I (para [0024]), but does not teach substitution V263L. However, it was well-known in the art that L and I are very similar in structure and can often be substituted for each other without any major functional effects. Accordingly, it would have been obvious to one of skill in the art to make a V263L substitution in place of the disclosed V263I substitution, in order to provide an anti-CD20 antibody with the same improved stability. In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

The shared technical feature of the inventions listed as Groups I, II+, and IV+ is wherein the stabilized anti-CD20 antibody is in the form of an intact antibody, Fv fragment, a single chain variable region (ScFv) antibody, a monoclonal antibody, a Fab antibody fragment, a Fab' antibody fragment or a Fab'2 Fab antibody fragment. This shared technical feature fails to provide a contribution over Lazar, which teaches that the stabilized anti-CD20 antibody is in the form of an Fv fragment (para [0021]). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

The shared technical feature of the inventions listed as Groups III+ and IV+ is a stabilized anti-CD20 antibody in a pharmaceutically acceptable carrier. This shared technical feature fails to provide a contribution over Lazar, which discloses a stabilized (para [0031] - "Improved solution properties herein includes but is not limited to stability and solubility") anti-CD20 antibody (para [0074]) in a pharmaceutically acceptable carrier (para [0123]). In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

The shared technical feature of the inventions listed as Groups III+ is the general method of claim 34. This shared technical feature fails to provide a contribution over Lazar, which discloses method of treating a disease in a patient comprising administering to the patient a therapeutically effective amount (para [0110], [0126]) of a stabilized (para [0031] - "Improved solution properties herein includes but is not limited to stability and solubility") anti-CD20 antibody (para [0074]) in a pharmaceutically acceptable carrier (para [0123]), wherein

(a) the isolated stabilized anti-CD20 antibody light chain amino acid sequence comprises claimed SEQ ID NO:1 (para [0074]; Fig. 38A; SEQ ID NO:3);

(b) the isolated stabilized anti-CD20 antibody heavy chain amino acid sequence comprises claimed SEQ ID NO:2 (para [0074]; Fig. 38B; SEQ ID NO:4); and

(c) the isolated stabilized anti-CD20 antibody heavy chain amino acid sequence comprises at least one amino acid substitution at position V263 (para [0024] - substitution at position 263 of the Fc domain, which comprises the heavy chain). Lazar specifically teaches substitution V263I (para [0024]), but does not teach substitution V263L. However, it was well-known in the art that L and I are very similar in structure and can often be substituted for each other without any major functional effects. Accordingly, it would have been obvious to one of skill in the art to make a V263L substitution in place of the disclosed V263I substitution, in order to provide an anti-CD20 antibody with the same improved stability. In the absence of a contribution over the prior art, the shared technical feature is not a shared special technical feature.

Further, the special technical feature of the inventions listed as Group III+ is treatment of a disease. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I, II+, and IV+. The special technical feature of the inventions listed as Group IV+ is the quantitative detection of a CD20 polypeptide. This special technical feature is not shared by the inventions of Groups I, II+, and III+.

Unity of invention exists only when the same or corresponding technical feature is shared by the claimed inventions. Without a shared special technical feature, the inventions of Groups I, II+, III+, and IV lack unity with one another.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	1 0 1
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
G 0 1 N 37/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
G 0 1 N 33/543 (2006.01)	G 0 1 N 33/53	D
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 37/00	1 0 2
	G 0 1 N 33/543	5 0 1 A
	G 0 1 N 33/531	A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, H U, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI , NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ウィルトン, ローズマリー

アメリカ合衆国 イリノイ 6 0 1 2 6 , エルムハースト, エス. ブライアン ストリート
8 4 0

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA61 CA01 DA01 DA02 DA05 DA11 EA04 GA11 GA25
HA08
4B065 AA01X AA57X AA87X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA01 CA24 CA44
4C085 AA13 AA14 AA21 BB41 CC23 EE01 EE03 GG01 GG02 GG03
GG04 GG05 GG06
4H045 AA11 AA30 BA09 BA50 BA53 BA57 BA71 BA72 CA40 DA75
EA20 FA74

专利名称(译)	抗CD20抗体利妥昔单抗的稳定化		
公开(公告)号	JP2015506687A	公开(公告)日	2015-03-05
申请号	JP2014553280	申请日	2012-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	治疗性蛋白国际有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	治疗性蛋白国际有限责任公司		
[标]发明人	ウィルトンローズマリー		
发明人	ウィルトン, ローズマリー		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 A61P35/00 A61P35/02 A61P29/00 A61P19/02 A61P9/00 A61K39/395 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	A61P19/02 A61P29/00 C07K16/2887 C07K2317/565 C07K2317/567 C07K2317/94		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/28 C07K16/28.ZNA C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 A61P35/00 A61P35/02 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P9/00 A61K39/395.N A61K39/395.D G01N33/53.D G01N37/00.102 G01N33/543.501.A G01N33/531.A		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA61 4B024/CA01 4B024/DA01 4B024/DA02 4B024/DA05 4B024/DA11 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/GA25 4B024/HA08 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA87X 4B065/AA90X 4B065/AA90Y 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA01 4B065/CA24 4B065/CA44 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/BB41 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/GG01 4C085/GG02 4C085/GG03 4C085/GG04 4C085/GG05 4C085/GG06 4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA09 4H045/BA50 4H045/BA53 4H045/BA57 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA75 4H045/EA20 4H045/FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了分离的稳定抗CD20抗体及其制备方法和用于诊断和治疗动物疾病，包括人淋巴瘤，白血病和自身免疫。

