

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-502454

(P2004-502454A)

(43) 公表日 平成16年1月29日(2004.1.29)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A 4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18	4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/02	G 0 1 N 33/53	D 4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-509461 (P2002-509461)	(71) 出願人	501401489 ケンブリッジ・ユニヴァーシティ・テクニカル・サーヴィシズ・リミテッド イギリス国、シービー2 1 エスビー ケンブリッジ、ミル・レイン 1 6
(86) (22) 出願日	平成13年7月9日 (2001.7.9)	(74) 代理人	100099623 弁理士 奥山 尚一
(85) 翻訳文提出日	平成15年1月7日 (2003.1.7)	(74) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(86) 国際出願番号	PCT/GB2001/003059	(74) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(87) 国際公開番号	W02002/004607		
(87) 国際公開日	平成14年1月17日 (2002.1.17)		
(31) 優先権主張番号	0016824.5		
(32) 優先日	平成12年7月7日 (2000.7.7)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	0017139.7		
(32) 優先日	平成12年7月12日 (2000.7.12)		
(33) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(31) 優先権主張番号	60/270, 588		
(32) 優先日	平成13年2月23日 (2001.2.23)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト骨髄腫細胞系

(57) 【要約】

ヒトモノクローナル抗体の産生方法において使用するためのヒト骨髄腫細胞系が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数回の連続 *in vitro* 培養により増殖利点に関する選択が行われたヒトモノクローナル抗体産生方法に使用するためのヒト骨髓腫細胞系。

【請求項2】

- a) PEG 耐性、
- b) HAT 感受性、および
- c) ウバイン耐性

から成るグループから選択される1つ以上の特性を有するヒトモノクローナル抗体産生方法に使用するためのヒト骨髓腫細胞系。

10

【請求項3】

特性 a、b および c のいずれをも有する請求項2記載のヒト骨髓腫細胞系。

【請求項4】

染色体数が増加するか、1つ以上の染色体異常を有する請求項1～3のいずれか1項に記載の骨髓腫細胞系。

【請求項5】

ほぼ四倍体である請求項4記載の骨髓腫細胞系。

【請求項6】

染色体2、14および22の1つ以上が二倍体であり、染色体異常が認められない請求項4または5記載の骨髓腫細胞系。

20

【請求項7】

本明細書に実質的に記載され、寄託番号 E C A C C 0 0 0 7 1 1 0 8 に寄託されている試料と同じであるか、またはそれに由来する K a r p a s 7 0 7 として本明細書において知られている請求項1～6いずれか1項に記載の骨髓腫細胞系。

【請求項8】

- a) 骨髓腫患者から初代骨髓腫細胞を分離するステップと、
- b) 初代骨髓腫細胞を凌ぐ増殖利点に関して選択するために、複数回の *in vitro* 培養により細胞を *in vitro* で培養し、増殖させるステップと、
- c) 1つ以上の HAT 感受性細胞についての選択が可能な薬剤に細胞を曝露し、
- d) 任意選択により、細胞をウバインに曝露し、ウバイン耐性を有する1つ以上の細胞を選択するステップと、
- e) 細胞をポリエチレングリコール (PEG) に曝露し、1つ以上の PEG 耐性細胞を選択するステップと

30

を含み、上記ステップ c～e は個別に、あるいはあらゆる順序で連続して実施できることを特徴とするヒト骨髓腫細胞系の産生方法。

【請求項9】

- f) HAT、ウバイン、PEG 以外の薬剤に対する感受性または耐性を付与することが可能なマーカーを細胞内に導入するステップを含み、ステップ f) はステップ a) 以後の方法のいずれの時点でも実施できる、請求項8記載の方法。

【請求項10】

請求項1から7のいずれか1項に記載のヒト骨髓腫細胞系とヒト白血球の融合ステップを含むヒトハイブリドーマの産生方法。

40

【請求項11】

- a) ポリエチレングリコール (PEG)、不活化センダイウイルスの存在下に、または電気融合条件下に、請求項1から7のいずれか1項に記載のヒト骨髓腫細胞系とヒト白血球とをインキュベーションするステップと、
- b) ハイブリッド細胞を選択するステップと

を含む請求項10記載の方法。

【請求項12】

ステップ b) は、

50

i) ウワバインを含むHAT存在下で、またはウワバインを含まないHAT存在下でインキュベーションを継続するステップと、

ii) HAT耐性であり、任意選択によりウワバイン耐性の細胞を選択するステップと、

iii) HAT耐性であり、任意選択によりウワバイン耐性の細胞を培養し、個々のハイブリドーマクローンを選択するステップと

を含む請求項11記載の方法。

【請求項13】

白血球が、抗体産生リンパ球、EBV不死化リンパ球のようなリンパ芽球、またはリンホカイン産生白血球である請求項10から12のいずれか1項記載の方法。

【請求項14】

白血球がヒト対象から新たに分離される請求項10から13のいずれか1項記載の方法。

【請求項15】

ヒト白血球が、種々の程度の抗原活性化を示すリンパ球集団の一部であり、ヒト骨髄腫細胞系が、この集団の抗原活性化リンパ球と優先的に融合する請求項10から12のいずれか1項記載の方法。

【請求項16】

請求項10から15のいずれかに記載の方法により産生されるヒトハイブリドーマ細胞系。

【請求項17】

多数の粗面小胞体を有する請求項16記載のヒトハイブリドーマ細胞系。

【請求項18】

請求項16または17記載のハイブリドーマ細胞系により産生されるヒトモノクローナル抗体。

【請求項19】

疾患の治療方法または予防方法において使用するための請求項18記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項20】

ヒト対象への液性免疫付与に使用するための請求項19記載のヒトモノクローナル抗体。

【請求項21】

(i) ヒト対象からリンパ球を分離するステップと、

(ii) 請求項10から15のいずれか1項に記載の方法においてリンパ球を使用することによりヒトハイブリドーマを産生するステップと、

(iii) ハイブリドーマにより分泌される抗体を分離するステップと

を含む抗体の産生方法。

【請求項22】

抗体が疾患を治療および/または予防できる請求項21記載の方法。

【請求項23】

リンパ球が腫瘍浸潤リンパ球であり、抗体が癌の治療または予防に有用である請求項22記載の方法。

【請求項24】

(i) 請求項22または23記載の方法による疾患に特異的な抗体を産生するステップと、

(ii) その抗体により特異的に認識される抗原を推定するステップと

を含む疾患に特異的な抗原の同定方法。

【請求項25】

(i) 種々の免疫反応段階におけるヒト対象からのリンパ球を分離するステップと、

(ii) 請求項10～15のいずれか1項に記載の方法においてリンパ球を使用することによるヒトハイブリドーマを産生するステップと、

(iii) それぞれのハイブリドーマにより分泌される抗体を分離するステップと

を含むヒトにおける免疫反応の監視方法。

10

20

30

40

50

【請求項 26】

(i) 1つ以上の抗体をコードする遺伝子により請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のヒト骨髓腫細胞系をトランスフェクションするステップと、
 (ii) トランスフェクションされた骨髓腫細胞系により抗体を産生させるステップとを含むヒト抗体産生方法。

【請求項 27】

請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の骨髓腫細胞系から得られる細胞と、液性因子を産生できる白血球とを融合するステップを含む液性因子の産生方法。

【請求項 28】

ハイブリッドハイブリドーマを生じる突然変異体を選択する方法における請求項 16 記載のヒトハイブリドーマ細胞系の使用。 10

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は、ヒト骨髓腫細胞系に関する。特に、ヒトモノクローナル抗体を産生できるヒトハイブリドーマ作製方法におけるヒト骨髓腫細胞系に関する。

【0002】

[背景技術]

マウスモノクローナル抗体の供給技術は、Kohler & Milstein (1, 2) により 1975 年に考案された。この方法において、免疫感作マウスの抗体産生脾臓細胞が、マウス骨髓腫細胞と融合され、ハイブリドーマとして知られるハイブリッド細胞が産生される。融合後、骨髓腫親細胞を死滅させる薬物を使用して細胞が選択されるのに対して、非融合親脾臓細胞は限定された寿命しか持たず、すぐに死滅するので、ハイブリッド細胞だけが生き残る。これらのハイブリドーマは、無限に増殖する能力と、脾臓細胞ドナーの免疫感作に使用された抗原に特異的な抗体を分泌する能力を有する。これらの所望の特異性を有する抗体を産生するハイブリドーマはクローニングされ、均質な抗体分子集団を産生するハイブリドーマ細胞系(すなわちモノクローナル抗体)を生じる。 20

【0003】

この技術を改変して、ヒトモノクローナル抗体を産生するための研究に多大な努力が傾けられてきた。マウス骨髓腫を使用してヒトモノクローナル抗体を得る試みは、異種特異的ハイブリッドが関連するヒト染色体を直ちに喪失するため失敗に終わった。ヒトモノクローナル抗体を産生するために、既知の抗体分泌ヒト骨髓腫細胞系(例えば、U266ヒト骨髓腫細胞系を分泌する I g E、およびリンパ芽球および形質芽球細胞の異種混合物を含む R P M I - 8 2 2 6 細胞系(3))を使用する試みもなされたが、有望な初期レポートにもかかわらず、全て失敗に終わった。 30

【0004】

ヒト抗体を産生するハイブリドーマの入手に失敗したため、種々の代替細胞系が検討された。例えば、エプスタイン-バーウイルス(E B V)が、抗体を産生するヒト末梢血 B リンパ球の不死化に使用された。しかし、このような細胞系は、マウスモノクローナル抗体産生ハイブリドーマと比較すると、多くの欠点を有する。例えば、これらの細胞系は、増殖に関して不安定な傾向があり、抗体産生能が低く、E B V は抗体反応に関与するリンパ芽球を優先的に不死化しない(4)。 40

【0005】

抗体を産生するヒト細胞系の必要性を回避するヒト形質を有するモノクローナル抗体を産生するための方法も開発された。例えば、有用なマウスモノクローナル抗体が、齧歯類可変領域とヒト普遍領域を結合することにより、「ヒト化」された(キメラ抗体)(13)。これは、抗体のヒト抗マウス免疫原性を減少させたが、残りの免疫原性は外来の可変領域フレームワークによって保持される。更に、抗原結合特異性は、本質的にマウスドナーのものである。C D R の移植とフレームワーク操作(E P 0 2 3 9 4 0 0)により、ヒトにおける治療に利用できるヒト化マウス抗体を産生できる程度まで抗体操作が改善され、正確となった。しかし、それでも抗体特異性は、マウス結合部位ドナーにより決定さ 50

れる。更に、それらの産生は、配列の複雑な操作が必要で、かつ面倒である。

【0006】

そのV遺伝子の回収と、抗体遺伝子内への操作が可能で、その結果モノクローナル抗体が産生されるヒトモノクローナル抗原結合断片の *in vitro* 産生のために、ファージディスプレイ技術が開発された(14)。しかし、この経路によるヒトモノクローナル抗体の産生は複雑な複数段階の手順で、抗体の結合特異性は、無作為に産生される配列の組み合わせの結果として *in vitro* で操作されるため、天然抗体の場合の様に *in vivo* 親和性成熟を受けていない。

【0007】

マウスの代わりにヒト免疫グロブリン遺伝子を含む形質転換マウス系が作製された(15) 10
)。このマウス系はヒト遺伝子を含み、ヒト抗体を産生するが、作られた多様性は、ヒトにおいてではなくマウス宿主において選択され、また抗体はマウスにおいて親和性成熟を受けるので、抗体は真にヒトではない。

【0008】

分析の観点から、公知の方法によっても、特異的抗原投与に対するヒトの免疫反応を詳細に分析することはできない。ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)増幅後の重鎖と軽鎖の遺伝子の直接分析が、特定の状態の人々により発現される抗体の種類の特徴を明らかにする最良の方法となっている。この方法は、重鎖-軽鎖の対形成の情報が失われるという欠点を有する。

【0009】

モノクローナル抗体を産生するためのマウスハイブリドーマ法は、(上記のハイブリドーマに基づかない方法を上回る)更なる長所を有する。それは、抗原活性化B細胞を優先的に不死化できる点で、そのためモノクローナル抗体を長時間供給することができる。 20

【0010】

従って、従来のマウスモノクローナル抗体産生方法の利点を全て備えたヒトモノクローナル抗体の産生方法が必要とされている。

【0011】

[発明の概要]

本発明は、従来のマウスモノクローナル抗体作製方法に使用されるマウス骨髄腫と同様に作用できるヒト骨髄腫細胞系を提供する。従って、本発明により、真のヒトハイブリドーマおよびモノクローナル抗体の信頼性の高い産生が初めて可能となる。 30

【0012】

従って、本発明は、ハイブリッド細胞を産生するために、ポリエチレングリコール(PEG)融合プロトコール、不活化センダイウイルスの利用(2)または電気融合法(17)等の標準技術を用いて、ヒトリンパ球と融合させることが可能なヒト骨髄腫細胞系に関する。本発明者は、増殖に関して重要な利点(すなわち、骨髄腫患者からの初代プラズマ細胞培養よりも倍加時間がはるかに短い点)を有する骨髄腫細胞系の産生方法も開発した。

【0013】

本発明のヒト骨髄腫細胞系は、一般の抗体産生細胞として使用できる。例えば、既知の抗体遺伝子を骨髄腫細胞系にトランスフェクションすることにより、以前にその特徴が明らかにされている抗体を産生できる。骨髄腫細胞系は、「生理学的」抗体産生に適している。なぜならば、骨髄腫細胞により産生されるタンパク質の翻訳後修飾が、ヒト抗体産生細胞により産生されるものと同じの可能性が高いからである。 40

【0014】

しかし、好ましい実施例において、本発明の骨髄腫細胞系は、ヒトモノクローナル抗体を産生できるヒトハイブリッドの産生方法に使用される。従って、本発明の更なる点は、ヒト骨髄腫細胞系をヒトリンパ球と融合させるステップを含むハイブリドーマ産生方法、そのような方法により産生されるヒトハイブリドーマ細胞系、およびそのようなハイブリドーマにより産生されるヒトモノクローナル抗体に関する。

【0015】

本発明のハイブリドーマ産生方法を、病的状態の自然の身体反応により誘発されるヒト抗体の不死化に使用できる。これによって、免疫反応を経時的に監視でき、また他の方法により作製される抗体よりも、治療により有用と思われる抗体供給源を供給することもできる。このような抗体の特異性の分析を利用して、*in vivo*で抗体を誘発した疾患に特異的な抗原に関する情報を提供することができる。この情報は、次にワクチンの改善の様な抗原に基づく治療方法の考案に利用できる。

【0016】

[発明の詳細な説明]

第一の点において、本発明は、ヒトモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマ産生方法における利用に適したヒト骨髄腫細胞系に関する。

10

【0017】

骨髄腫細胞系は、骨髄腫患者からの、例えば、骨髄または末梢血からの初代プラズマ細胞培養から作製できる。均質な細胞系を作製するために、患者の細胞は*in vitro*で培養され、増幅される。

【0018】

新しく作製されたヒト骨髄腫細胞系が、70時間程度の比較的長い倍加時間を有することは普通である。しかし、本発明者は驚くことに、細胞を*in vitro*で培養することにより、はるかに迅速に増殖する細胞系を産生することが可能であることを発見した。例えば、倍加時間を約35時間以下に短縮することが可能である。

【0019】

本発明の骨髄腫細胞系の倍加時間を、以前の*in vitro*培養処理の細胞系の倍加時間の0.75倍以下、好ましくは0.5倍以下とすることができる。本発明の骨髄腫細胞系は、50時間以下、好ましくは40時間以下、より好ましくは30時間以下である。

20

【0020】

標準ポリエチレングリコール(PEG)融合プロトコルを用いるために、本発明の骨髄腫細胞系をPEG耐性とすることができる。本発明者は、99%のヒト骨髄腫細胞が、リンパ球融合のためにPEGによる1回目の処理後に死滅したことを見いだした。骨髄腫細胞は、複数回のPEG処理によりPEG耐性を付与できる。本発明者は、約20回の処理により、約25%の細胞しかPEG処理により死滅しない細胞系が産生されることを発見した。PEG抵抗性骨髄腫細胞の選択により、ヒトリンパ球と融合し、本発明のヒト/ヒトハイブリドーマを産生できる細胞系が産生される。

30

【0021】

標準マウスモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマ産生方法において、融合細胞は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン(HAT)培地を用いて選択される。マウス骨髄腫細胞は、酵素ヒポキサンチン：グアノシンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT)を欠失しているのでHAT感受性であるが、一方ハイブリドーマ細胞は、脾臓細胞融合パートナーによりHGPRT遺伝子が供給されているのでHAT耐性である。同じ選択方法を用いるために、本発明の骨髄腫細胞系は、HAT感受性でなくてはならない。HAT感受性は、8-アザグアニンおよび/または6-チオグアニンまたは本技術において公知のその他の選択物質において増殖させることにより選択できる。本明細書に使用されている様に、「HAT感受性」とは、ハイブリドーマ融合法において、HAT培地で処理することにより、非融合骨髄腫を優先的に死滅させ、その結果ハイブリドーマ細胞が単離される。

40

【0022】

細胞系または組織由来の新鮮細胞(例えば、骨髄、扁桃、リンパ節、脾臓、悪性組織)を用いる融合および選択方法を促進するために、ウワバイン耐性を付与することは骨髄腫細胞系にとって好都合である。ウワバイン濃度を漸増させて培養を継続することにより、細胞にウワバイン耐性を付与できる。得られた細胞系はHAT感受性とウワバイン耐性を有する。

【0023】

50

増殖に利点を有する骨髄腫細胞は、倍加時間が長い骨髄腫細胞よりも、染色体数が多い。本発明の骨髄腫細胞は、染色体数が増加しているか（異数性：anuploid）、またはほぼ4倍体であり、また多くの肉眼的染色体異常を有することがある。しかし、染色体2、14、22の1つ以上（好ましくは全て）は、正常および/または2倍体である。Gバンディング法の様な標準技術を用いて染色体分析を実施できる。

【0024】

本発明者は、倍加時間が短く、PEG耐性、ウバイン耐性およびHAT感受性を有するヒト骨髄腫細胞系を産生し、特徴を明らかにした（具体例参照）。この細胞系は、「Karapas 707」として知られ、標本は、寄託番号00071108として、ECCC, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JGに寄託されている。

10

【0025】

本発明の第二の点は、骨髄腫細胞系産生方法に関する。（上記に説明されている）増殖の利点、HAT感受性、ウバイン耐性および/またはPEG感受性に関する選択ステップに加えて、本方法は、HAT、ウバイン、PEG以外の薬剤に対する感受性または耐性を付与できるマーカーを細胞に導入するステップも含めることができる。このようなマーカーは、例えば、本技術において公知の遺伝子工学により細胞内に導入できる。代表的マーカーには、検出可能な産物を産生する - ガラクトシダーゼの様な酵素、抗生物質耐性または感受性を付与するタンパク質、ガンシクロピルの存在下に細胞死を引き起こす単純疱疹ウイルスチミジンキナーゼ（HATK）の様な、特定の条件でその存在が細胞に対して致死的である遺伝子（「自殺遺伝子」）がある。

20

【0026】

本発明は第三の点は、ヒトハイブリドーマ細胞系産生方法に関する。ハイブリドーマは、従来のマウスハイブリドーマ産生方法（7）と類似の方法により産生できる。例えば、本発明の第一の点の骨髄腫細胞系は、例えば、標準PEG融合プロトコール、不活化センダイウイルスまたは電気融合法を用いて、ヒトリンパ球と融合できる。

【0027】

ハイブリッド細胞は、本技術において公知の方法のいずれによっても非融合細胞から選択できる。例えば、ハイブリッド細胞は、細胞ソーティング（例えば、蛍光発色細胞ソーティング（FACS））、磁気ビーズの利用、あるいは細胞毒性の利用により、選択および/または単離できる。ハイブリッド細胞選択のための従来のマウスの方法は、リンパ球と融合していない骨髄腫細胞を選択的に死滅させる化学薬品（HAT）を含む培地で融合後の細胞集団を増殖させることが含まれる。次に、ハイブリッド細胞を任意でクローニングし、均質なハイブリドーマ細胞系を産生することができる。一般的ハイブリドーマ産生方法は本技術において公知である。例えば、以下の手順を使用できる。

30

【0028】

免疫感作されたヒト由来のヒトリンパ球の単一細胞懸濁液を、2 mM L-グルタミン、1 mMのピルビン酸ナトリウム、100単位/mlのペニシリン、100 µg/mlのストレプトマイシンを補足した血清を含まないRPMI 1640（RPMI）の中に形成する。細胞懸濁液を滅菌70メッシュNitec細胞濾過器で濾過し、200gで5分間遠心分離により2回洗浄し、血清を含まないRPMIにペレットを再懸濁する。

40

【0029】

2×10^8 個のリンパ球を、 4×10^7 個の骨髄腫細胞と合わせ（融合前3日間11%胎児ウシ血清（FBS）補足RPMIの中で対数期に維持）、遠心分離し、上清を吸引する。細胞ペレットを取り除き、1分間攪拌しながら、2 mlの37 PEG 1500（75 mM HEPES中に50%、pH 8.0）を加え、14 mlの血清を含まないRPMIを7分間かけて加えた。更なるRPMIを加えることができ、200gで10分間遠心分離する。上清を廃棄後、ペレットを15% FBS、100 mMのヒポキサンチンナトリウム、0.4 mMのアミノプテリン、16 mMのチミジン（HAT）、25単位/mlのIL-6、 1.5×10^6 個/mlのリンパ球を含む200 mlのRPMIに再懸濁する。懸濁液を10個の96ウェル平底組織培養プレートに200 µl/ウェルで分配する。各

50

ウェルから100 μ lを18G注射針で吸引し、10U/mlのIL-6を含む、または含まない、かつリンパ球を含まない100 μ l/ウェル平板培養培地を加えることにより、細胞を融合後2、4、6日目にフィーディングする。

【0030】

細胞増殖が60~80%の密集成長に達したら、培養上清を各ウェルから取り出し、ELISAにより目的の抗原に対する反応性に関してスクリーニングする。ELISAは以下のように実施される。Immulon4培養皿を、4で、pH9.6の50mMの炭酸緩衝液に含めた抗原を100ng/ウェル、50 μ l/ウェルで被覆する。プレートを0.05%Tween 20を含むPBSで洗浄し、0.5%Fish Skin Gelatinを用いて37で30分間遮断する。プレートを上記のように洗浄し、50 μ lの培養上清を加える。37で30分間インキュベーション後、ホースラディッシュペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG(fc)[PBSTに1:10,000で希釈されたもの]を加える。プレートを37で30分間インキュベーションし、PBSTで洗浄し、pH4.5の100mMクエン酸中の1mg/mlのTMBと0.15ml/mlの30% H_2O_2 から成る100 μ lの基質を加える。50mlの15% H_2SO_4 を加えて、呈色反応を止める。A450をプレートリーダーで読み取る。

10

【0031】

リンパ球という言葉は、あらゆる抗体産生細胞を含むことを意図している。例えば、リンパ球は、EBV形質転換B細胞の様なリンパ芽球でもよい。リンパ芽球は*in vitro*培養細胞でもよい。あるいはリンパ芽球は、ヒト対象からの新鮮分離細胞も可能である。例えば、リンパ球は、扁桃や、リンパ節、脾臓、血液または骨髄等の臓器から入手できる。

20

【0032】

ヒト対象は、健常者でも、特に特定抗原により免疫感作されたヒトでも、あるいは特定の疾患に罹患していた(そして、回復した)患者でもよい。あるいは、ヒト対象は特定の疾患患者でもよい。従って、ヒト対象由来のリンパ球は、目的の抗体を産生することが可能である。

【0033】

本発明の骨髄腫は、非抗体産生リンパ球、あるいはリンホカインを産生するその他の白血球とも融合できる。特に好ましいのは、治療用の抗腫瘍抗体またはリンホカインを産生する腫瘍浸潤細胞である。

30

【0034】

本発明のハイブリドーマ産生方法と、従来のマウスモノクローナル抗体分泌ハイブリドーマ産生方法の一利点は、骨髄腫細胞系が抗原により活性化されるリンパ球と優先的に融合する点である。

【0035】

本発明は、ハイブリドーマ細胞系と、そのような細胞系により産生されるモノクローナル抗体も提供する。

【0036】

好ましくは、本発明のハイブリドーマは高収量の抗体を産生する。例えば、ハイブリドーマは、100 μ g/ml以上の抗体、好ましくは少なくとも200 μ g/mlの抗体、より好ましくは少なくとも300 μ g/mlの抗体を分泌できる。

40

【0037】

本発明のハイブリドーマは、大量の粗面小胞体(RES)を含むことができる。(検出可能量の粗面小胞体を含む様に見えない)骨髄腫細胞の細胞質と対照的に、本発明者は、本発明のハイブリドーマ細胞の細胞質が、プラズマ細胞と似た平行で同心的なRESにより取り込まれるのを発見した。本明細書に使用されている「大量の」という言葉は、ハイブリドーマのRES量がプラズマ細胞に認められる量に匹敵することを示すために使用されている。

【0038】

50

モノクローナル抗体は、全てのアイソタイプが可能で、例えば、I g G、I g M、I g D、I g AまたはI g Eである。モノクローナル抗体は、軽鎖、重鎖または両者を含むことができる。

【0039】

好ましくは、抗体は、ある疾患の予防または治療に有用である。例えば、疾患特異性抗体産生細胞をある患者から分離し、細胞を本発明の方法により不死化し、抗体を大量に産生することができる。抗体を受動免疫化プロトコルにより患者に投与し、疾患に対する抵抗性を付与することができる。あるいは、患者に抗体を投与して免疫反応を高め、感染の一掃を補助できる。種々の白血球を用いて得られるハイブリドーマは、一連の液性因子を上昇させることができる。

10

【0040】

本発明の方法により産生されるヒトモノクローナル抗体は、*in vitro*および*in vivo*診断応用、*in vivo*分析および試薬への応用等のリガンド-ポリペプチド結合を含むほぼ全てのプロセスに使用できる。例えば、抗体分子は、本技術に精通する者にとって公知の方法により、抗体に基づく分析法、例えば、ELISA法に利用できる。

【0041】

上記に示す様に、本発明により産生される抗体は、診断、予防、治療手順に利用される。例えば、本発明により産生される抗体は、凝集反応、ELISA、免疫ペルオキシダーゼ、ウェスタンブロット、標準免疫組織学的方法による*in situ*タンパク質検出に利用できる。これらの応用例に使用するために、抗体は本技術において公知の方法により標識される。更に、そのような抗体は、樹脂の様なクロマトグラフィー支持体と複合体を形成し、アフィニティークロマトグラフィー法に予備的に利用できる。この様な技術は全て、本技術において公知である。

20

【0042】

本発明により作製された抗体の治療および予防的利用は、レシピエントまたは患者にそれらを投与することが含まれる。

【0043】

少なくとも90~95%の均質性を有するほぼ純粋な抗体が、患者への投与に好ましく、98~99%以上の均質性が医薬品利用には最も好ましい。部分的または目的の均質性に一旦精製されたなら、選択された抗体を診断または治療に(生体外を含む)、または分析方法、免疫蛍光染色等の開発および実施に利用できる(Lefkowitz and Pernis, (1979および1981) *Immunological Methods*, Volumes I and II, Academic Press, NY)。

30

【0044】

本発明の抗体は、典型的には炎症状態、アレルギー性過敏症、癌、細菌またはウイルス感染、自己免疫疾患(I型糖尿病、多発性硬化症、慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、クローン病、重症筋無力症が含まれるが、これらに限定されない。)の予防、抑制または治療に用途を見いだせる。

【0045】

本明細書において、「予防」とは疾患誘発前の防御組成物の投与を意味する。「抑制」とは、誘発イベント後であるが、疾患の臨床的出現前の組成物の投与を意味する。「治療」とは、病状が顕性となった後の防御組成物の投与を意味する。

40

【0046】

疾患の防御または治療における抗体の有効性をスクリーニングするために利用できる動物モデル系は入手可能である。感受性マウスにおける全身性エリテマトーデス(SLE)の試験方法は、本技術において公知である(Knight et al., (1978) *J. Exp. Med.*, 147:1653; Reinersten et al. (1978) *New Eng. J. Med.*, 299:515)。重症筋無力症(MG)は、別の種の可溶性アセチルコリン受容体タンパク質を用いて疾患を誘発することにより、S J L

50

ノ雌マウスにおいて試験される (Lindstrom et al. (1988) Adv. Immunol., 42:233)。関節炎は、II型コラーゲンの注入により感受性系マウスにおいて誘発される (Stuart et al. (1984) Ann. Rev. Immunol., 42:233)。アジュバント関節炎が、マイコバクテリア熱ショックタンパク質の注入により感受性ラットにおいて誘発されるモデルが説明されている (Van Eden et al. (1988) Nature, 331:171)。説明されている様に (Maron et al. (1980) J. Exp. Med., 152:1115)、甲状腺炎は、サイログロブリン投与により、マウスにおいて誘発される。インスリン依存性糖尿病 (IDDM) は、自然に発症するか、Kanasawa et al. (1984) Diabetologia, 27:113により説明されている様に特定の系統のマウスにおいて誘発することができる。マウスおよびラットにおける実験的アレルギー性脳脊髄炎は、ヒトにおける多発性硬化症のモデルとなる。このモデルにおいて、ミエリン塩基性タンパク質の投与により脱髄性脳症が誘発される (Patterson (1986) Textbook of Immunopathology, Mischere et al., 編, Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin et al. (1973) Science, 179:478および Satoh et al. (1987) J. Immunol., 138:179参照)。

10

【0047】

本発明の抗体は、その他の抗体、特に疾患の原因であるヒト細胞上のその他のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体 (MAbs) と組み合わせても使用できる。例えば、適切なT細胞マーカーには、第1回白血球分化ワークショップ (Bernhard et al. (1984) Leukocyte Typing, Springer Verlag, NY) により命名されたいわゆる「分化集団」(Clusters of Differentiation) に分類されるものを含めることができる。

20

【0048】

一般に、本抗体は、薬理的に適切な担体と共に精製形態で利用される。典型的には、これらの担体には、水溶液またはアルコール/水溶液、エマルジョンまたは懸濁液、生理食塩水および/または緩衝媒体を含むあらゆるものが含まれる。非経口賦形剤には、塩化ナトリウム溶液、リンゲルデキストロース、デキストロースと塩化ナトリウム、乳酸リンゲル液が含まれる。適切な生理学的に許容可能な補助薬は、ポリペプチド複合体を懸濁状態に保つ必要がある場合には、カルボキシメチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、アルギネートなどのシクナーから選択される。

30

【0049】

静脈内投与用賦形剤には、リンゲルデキストロースに基づく補充液の様な水分および栄養補充液、電解質補充液が含まれる。抗菌剤、抗酸化剤、キレート剤、不活性ガス等の保存剤およびその他の添加剤も含めることができる (Mack (1982) Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版)。

【0050】

本発明の抗体は、単独で投与される組成物としても、または他の薬剤と共に使用することもできる。その他の薬剤には、シクロスポリン、メトトレキサート、アドリアマイシンまたはシスプラチン等の種々の免疫療法薬および免疫毒素が含まれる。医薬組成物には、本発明の選択された抗体、レセプター、またはその結合タンパク質と組み合わせた、更に異なる特異性を有する本発明の選択されたポリペプチドの組み合わせた種々の細胞毒性物質またはその他の物質の「カクテル」が含まれ、それらは投与前プールされていても、されていなくてもよい。

40

【0051】

本発明の医薬組成物の投与経路は、本技術において通常の技術を有する者にとって公知の全てが可能である。制限なしの免疫療法を含む治療には、本発明の抗体を標準技術に従って、全ての患者に投与できる。投与は、非経口投与、静脈注射、筋肉注射、腹腔内投与、

50

経皮吸収、肺からの投与経路、または適切であれば、カテーテルによる直接注入等の適切な投与様式が可能である。投与量および投与回数は、年齢、性別、患者の状態、その他の同時服用薬物、禁忌、医師が考慮に入れるべきその他のパラメータによって変わる。

【0052】

本発明の抗体は、凍結保存可能で、使用前に適切な担体に溶解できる。この技術は、従来の免疫グロブリンに関して有効であることが明らかにされており、本技術において公知の凍結および溶解技術を用いることができる。凍結溶解により、抗体活性が様々な程度に低下する可能性があり（例えば、従来の免疫グロブリン、IgM抗体は、IgG抗体よりも活性低下が大きい傾向がある）、それを補償するために使用量を増加する様に調整しなくてはならない場合があることは、本技術に精通する者にとって明らかである。

10

【0053】

本発明の抗体を含む組成物またはそのカクテルは、予防および/または治療のために投与できる。特定の治療適用例において、選択された細胞集団の少なくとも部分的阻害、抑制、変化、死滅またはその他の測定可能なパラメータを達成する十分量が、「治療有効量」と定義される。この投与量を達成するための必要量は、疾患の重得度および患者自身の免疫システムの一般的状態によって変動するが、体重1kgあたり抗体0.005から5.0mgの範囲の投与量が一般的で、0.05から2.0mg/kg/用量の投与量がより一般的に使用される。予防適用例においては、本発明の選択されたポリペプチドまたはそのカクテルを含む組成物も、同様の投与量またはやや少ない投与量で投与される。

【0054】

本発明の抗体を含む組成物は、予防および治療場面で利用でき、哺乳動物における選択標的細胞集団の変更、不活化、死滅または除去を助ける。更に、本明細書に説明されている抗体は、標的細胞集団を体外または*in vitro*で選択的に死滅、減少させるか、あるいは不均質細胞収集物から効率的に除去するために使用できる。哺乳動物の血液を体外で選択された抗体、細胞表面レセプターまたはその結合タンパク質と合わせ、それによって望ましくない細胞を死滅させ、あるいは血液から除去し、標準技術に従って哺乳動物に戻すことができる。

20

【0055】

患者の抗体産生細胞から特定の抗体を無制限量産生できる能力は、免疫反応に関する有用な情報を得るためにも利用できる。例えば、患者が病気に罹っている場合、免疫システムが標的とする疾患に特異的な抗原を推定することができる。この情報は、この疾患を治療および/または予防するためのより優れた薬物とワクチンをデザインするために利用できる。

30

【0056】

殆ど全ての疾患が抗体を介する免疫反応を引き起こし、従って、免疫応答は抗体を介する治療による予防/治療のための候補機序である。本発明の手法は、病態の自然の防御反応により惹起されるヒト抗体の不死化に非常に重要である。しかし、腫瘍浸潤リンパ球を不死化するための本発明の方法の利用が特に興味深い。これは、有用な抗癌抗体を産生し、腫瘍特異抗原を明らかにすることもできる。このような抗原は次に抗癌ワクチンとして利用できる。

40

【0057】

異なる時点で産生された抗体を分析することにより、抗原刺激に対する免疫反応の経過を明らかにすることもできる。コレステロールによって、特定の治療方法またはワクチン接種プロトコルの最適タイミングに関する有用な情報が提供される。

【0058】

本発明の更なる点において、抗体産生遺伝子を用いて細胞系のトランスフェクションを行う事により抗体を産生するための、本発明の第一の点のヒト骨髓腫細胞系の利用が提供される。ヒト骨髓腫により実施される翻訳後修飾は、ヒト抗体において形成されるものと同じである。従って、生物工学的産生に関して、ヒト骨髓腫細胞系は、ヒトハイブリドーマから得られる抗体だけでなく、既知の抗体遺伝子のトランスフェクションにより得られる

50

抗体の産生にも好ましい。

【0059】

本発明のヒトハイブリドーマ細胞系は、別のリンパ球と融合後ハイブリッドハイブリドーマ(16)を産生する様にマウスAp2/0-Ag14が作製されるのと同じ方法で、HAT感受性も有する突然変異体を選択するためにも利用できる。特に、低濃度/検出不能濃度の抗体を産生するが、高濃度のRERを有する本発明の骨髄腫細胞系を使用して産生されるハイブリドーマは、目的の抗体を産生できる第二のリンパ球と融合させるために選択される。この方法で、所望の抗体を高力価で分泌できるハイブリッドハイブリドーマが作製できる。

【0060】

以下の具体例は、本発明を説明するためのもので、本発明を制限することを意図するものではない。本発明は特に、これらの具体例に説明されている具体例に関する。

【0061】

[具体例]

[具体例1 - 改善されたヒト骨髄腫細胞系の作製]

本発明者は、20年間にわたり、新しいヒト骨髄腫細胞系の作製を試みてきた。本発明者は、多発性骨髄腫と診断された53才男性患者の骨髄と末梢血液から作製された骨髄腫細胞系を過去に説明している(5,6)。この細胞系は現在軽鎖のみを分泌するので、重鎖も産生する骨髄腫細胞系よりも実用上の利点を有する可能性がある。

【0062】

<増殖上の利点を有する骨髄腫細胞の選択>

分離後のこの骨髄腫細胞系の倍加時間は70時間以上であるが、何ヶ月以上も連続*in vitro*培養後、より迅速に増殖する細胞が出現し、倍加時間は約30~40時間となり、静置培養時にガラスまたはプラスチックの表面に付着する傾向が高くなった。付着細胞は、ハイブリドーマ産生に使用されるマウス骨髄腫細胞と同様に、激しくピペッティングすることにより簡単に剥がすことができる。

【0063】

<HAT感受性およびウバイン耐性の選択>

従来のマウスハイブリドーマ作製方法は、非融合マウス骨髄腫細胞がヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン(HAT)に対して感受性を有するという事実に基づいている。(HAT)感受性を有するヒト骨髄腫細胞を選択するために、それらを8-アザグアニンの中で増殖させた。30 μ g/mlの濃度で増殖したアザグアニン耐性細胞を更に30 μ g/mlの2-アミノ-6-メルカプトプリン(6-チオグアニン)を作用させた。最初に出現した20個のクローンの、HAT培地に対する感受性を検査した。耐性を生じない様に見えた最も迅速に増殖したクローンを更なる研究のために選択した。骨髄腫細胞を抗体産生細胞系とも融合できる様にするために、ウバイン耐性サブラインに関しても選択することを決定した、ウバイン濃度を上昇させながら骨髄腫細胞を増殖させることにより、最終的にHAT感受性ウバイン耐性サブラインが出現した。

【0064】

[具体例2 - ヒトハイブリドーマの作製]

ハイブリドーマ形成のための条件とスクリーニングを至適化するために、本発明者は、既知の特異性を有する抗体産生ヒトBリンパ球を(初回融合のために)作製することを決定した。そのため、健康HIV-1感染者の末梢血リンパ球をEBVで感染させた。EBV不死化B細胞から、HIV-1 gp41に対するモノクローナル抗体産生細胞が選択され、クローニングされ、細胞系Karpas164と命名された。その時、本発明者は、種々の分子量のポリエチレングリコール(PEG)を用いてEBV不死化ヒトリンパ球と骨髄腫細胞を融合することを試みたが失敗した。

【0065】

ハイブリッドの作製に何回も失敗した理由を検討するために、細胞融合に用いたのと同じ手法を用いて、骨髄腫細胞のみをPEGで処理した、その後、HATまたはウバインは

10

20

30

40

50

含まない増殖培地に細胞を接種し、生存力を検査した。PEG処理細胞の検査から、PEGの毒性が極めて高く、99%以上の細胞を死滅させることが明らかとなった。

【0066】

<PEG耐性サブラインの作製>

上記所見を考慮して、本発明者はPEG耐性サブラインの作製を試みることを決定した。これは、マウスハイブリドーマ形成に使用されたプロトコルに従って、 10^7 個の骨髓腫細胞をPEG(分子量1500)で処理することにより達成された。結果として生じた少数の生存可能な細胞を再度PEGで処理した。PEG処理により死滅する細胞が約4分の1だけとなる様な骨髓腫のサブラインが出現するまで、約18ヶ月間にわたり20回以上この様な処理サイクルを繰り返した。しかし、この過程で、HAT耐性細胞が再度出現した。従って、細胞をもう一度8-アザグアニンで処理し、クローニングした。HAT培地で増殖させた時に復帰しなかったクローンを分離した。この細胞系は、骨髓腫Karpas 707細胞系として知られ、その試料は寄託番号E C A C C 0 0 0 7 1 1 0 8として保存されている。

10

【0067】

<EBV不死化リンパ球との融合>

次に、標準PEG融合プロトコル(7)を用いて、HAT感受性、PEG耐性細胞を、gp41に対するモノクローナル抗体を産生するEBV不死化ヒトBリンパ球164細胞と融合した。細胞懸濁液をマルチウェルプラスチックトレイに接種した。HATとウバインの存在下に増殖後、骨髓腫細胞系に似たクローンが出現した。組織培養液は、抗ウイルス抗体に関するKarpas AIDS細胞テスト(8)において、アセトン固定HIV-1感染Karpas 45T細胞の膜の強力な染色を示した。

20

【0068】

<ハイブリドーマにより産生されるヒトモノクローナル抗体の特徴付け>

HIV-1のgp41の幾つかのポリペプチドを用いる更なる研究により、我々のモノクローナル抗体がペプチドL A V E R Y L K D Q Q L L G I W Gに対して反応するが、HIV-1の他の4つのポリペプチドに対しては反応しなかったことを確立することができた(結果は示されていない)。このモノクローナル抗体が認識するエピトープは、HIV-1のAfrican NDK株(9)には存在しない様に見える。なぜならば、抗体がNDK感染細胞とは反応しないが、HIV-1のCambridge分離株(10)だけでなく、初期French LAV分離株(11)とも反応するからである。データベース検索により、HIV-1のFrench(LAV)分離株とBritish(CAM1)分離株が上記アミノ酸配列を共有しているが、African分離株はリジンからアルギニンに突然変異を有することが確認される。

30

【0069】

<新鮮ヒトリンパ球との融合>

164細胞系との融合に成功後、本発明者は、それらの骨髓腫細胞が新鮮ヒトリンパ球とも抗体産生ハイブリドーマを形成するかどうかを確立することを決定した。骨髓腫細胞を、成人の末梢血由来の未分画白血球(WBC)と、2人の小児の外科手術により摘出された扁桃から調製された扁桃細胞と融合した。PEG融合後に得られた細胞懸濁液を、24および96ウェルプラスチック組織培養プレートに接種後、20%ウシ胎児血清およびHATを補足したRPMI-1640培地の中で最初の12日間増殖させた。その後、増殖培地のみ単独を使用し、骨髓腫細胞が扁桃細胞と融合した約25%のウェルにおいて、また骨髓腫細胞が血液白血球と融合した約10%のウェルにおいて、その後の2~3週間コロニー形成を観察した。活性細胞増殖のあるウェルから収集した組織培養液を、IgGの存在に関してELISAにより分析した。この方法において、新たに形成されたハイブリドーマにより産生されたIgGモノクローナル抗体を補足するために、プロテインAをプラスチックウェルに使用した。100以上のウェルの培養液がIgGを含んでいた。

40

【0070】

本発明者は、現在まで、末梢血リンパ球との融合から20以上の独立したIg分泌ハイブ

50

リッドを、扁桃細胞との融合から100以上の抗体産生ハイブリドーマを作製した。

【0071】

[具体例3 - ヒト骨髄腫細胞系およびハイブリドーマの特徴付け]

<ハイブリドーマの形態学的分析>

出現した多くの細胞の増殖パターンは多様であった。静置培養の場合、骨髄腫細胞は、プラス地区表面を覆う不規則なモザイクを形成する均質パターンの付着細胞に増殖し、細胞は培養液の中に持続的に放出されていた。ローラーフラスコで増殖すると、殆どの細胞が、種々の大きさのクラスターとして懸濁液中に残った。一部のハイブリッドの増殖は、骨髄腫細胞に似ていたが、その他の多くは異なる形態と増殖形態を獲得した。静置培養では、一部のハイブリッドはプラスチック表面に付着し、多くの厚いが、短い紡錘体、四角形、三角形を呈した。その他は主に単細胞またはクラスターとして懸濁状態で増殖した。

10

【0072】

培養骨髄腫の超微細構造検査により、培養1年目に大量の粗面小胞体(RER)を含んでいた細胞と対照的に(5)、長期*in vitro*増殖後、細胞は殆どのRERを喪失したことが明らかにされた。しかし、2つのハイブリッド、707/164および707/105(血液B細胞を用いて形成)を検討すると、いずれの場合も、ハイブリッドはプラズマ細胞に似ていた(図4)。細胞質の大部分が、平行で同心的なRERにより取り込まれ、囊の拡張度は細胞毎に異なっていた。RERの内容物は、微細顆粒物質に見え、これは恐らく免疫グロブリンであろう。多数のミトコンドリアが多くの切片で観察され、ゴルジ部分を通る切片は高度に発達した装置を示していた。EBV不死化164B細胞の超微細構造検査では、RERの少数の短く薄い鎖しか認められなかったことから、融合リンパ芽球がIg産生のために潜在性骨髄腫RERをなぜか活性化すると示唆することは非合理的ではないであろう。

20

【0073】

<骨髄腫細胞系の染色体分析>

抗体産生細胞が、実際に骨髄腫とヒトリンパ球のハイブリッドであるかことを確認するために、Czepulkowski et al. (12)により説明されているGバンディング法を用いる染色体分析のために細胞培養を調製した。早くから、培養骨髄腫細胞は(新鮮親細胞の様に)幾つかの染色体異常を含む45本の染色体を持つ低二倍体であることが発見されている(5)。しかし、選択的増殖の利点(複数回の*in vitro*培養後)を有し、PEG耐性を有する骨髄腫細胞が、多くの並外れて多数の肉眼的染色体異常を含むほぼ四倍体であることが明らかにされた。事実23本の染色体のうち13本が異常であった。核型分析により、その全てが普通よりも短くもある染色体1の5つのコピーと、3つの標識染色体が明らかとなった。染色体2、14、22(免疫グロブリン遺伝子を含む)が正常で二倍体であることに言及するのは興味深いことである。

30

【0074】

PEG処理を何回も行ったために、これらの染色体核型異常が引き起こされたどうかを確立するために、PEG処理前に凍結された細胞の染色体も分析した。分析結果から、これらの変化は全てPEG処理前から存在することが明らかとなった。そこで、何ヶ月にもわたる連続*in vitro*培養と8-アザグアニン、6-チオグアニン、HAT、ウワバインによる処理の間、低二倍体骨髄腫細胞よりも増殖利点を有するほぼ四倍体細胞系が出現した様に思われる。

40

【0075】

<ハイブリッド細胞系の染色体分析>

164細胞によるハイブリドーマの核分析により、細胞が、骨髄腫細胞のほぼ四倍体染色体とリンパ芽球の正常染色体を含む、ほぼ六倍体であることが明らかにされた。

【0076】

HIV-1のgp41に対するモノクローナル抗体を産生するEBV形質転換リンパ芽球(Karpas 164系)の核型分析により、細胞の約10%が骨髄腫細胞系にも検出されるのと類似の転座、t(1;16)(p11;q10)を示すことが明らかにされてい

50

る。これは、長期 *in vitro* 培養によるものと思われる。

【0077】

< I g G 産生の分析 >

I g G 産生量に関して、E B V 感染リンパ芽球とハイブリッド(707/164)による H I V - 1 の g p 4 1 に対する抗体分泌量の比較分析により、同じ条件で同数の細胞(10⁶/m l)を培養後、ハイブリドーマがリンパ芽球の少なくとも8倍以上の抗体を産生することが明らかにされた。具体的には、ハイブリッド707/164は470 μ g / m l の I g G を分泌し、164細胞は分析検出量未満しか分泌せず、これは培養4日後に70 μ g / m l であった。どちらの細胞培養も、抗体合成に関する遺伝情報は同じであることから、本発明のハイブリドーマ細胞が、抗体産生に関して遙かに有効であることは明らかである。

10

【0078】

免疫グロブリン分泌試験から、骨髄腫細胞が少量の軽鎖のみを産生することが確認されている。扁桃細胞および血液リンパ球との融合物は、I g G と I g M を分泌するクローンを産生した。扁桃細胞と形成されたハイブリッドの1つは、軽鎖(+)のみを産生する。I g 産生にこのような多様性があることは、骨髄腫細胞系が、全てでなければ殆どの範囲の抗体産生細胞とハイブリドーマを形成できることを示唆している。事実、本発明者は、本明細書に説明されている骨髄腫細胞系により形成されるハイブリドーマは、マウスハイブリドーマよりも抗体産生に関して遙かに有効であることを見いだした(具体的には、H I V - 1 の g p 4 1 に対する抗体を分泌するハイブリドーマは、470 μ g / m l の収量の I g G を産生し、血液リンパ球と融合後に形成されるハイブリドーマは、210 μ g / m l と 150 μ g / m l の I g G を産生した)。これは、マウスハイブリドーマの粗面小胞体がまばらに存在するのに対して、ヒトハイブリドーマに多数の粗面小胞体が存在することと相関していた。

20

【0079】

本発明の範囲および意図を逸脱しない本発明の説明されている方法およびシステムに関する種々の改変および変更は、本技術に精通する者にとって明らかである。本発明は、特定の好ましい実施例と関連づけて説明されているが、請求されている本発明はその様な実施例に不当に制限されるものではない。事実、化学または生物または関連分野に精通する者にとって明らかな本発明の実施方式の種々の改変は、本発明により包含されるものである。上記明細書に言及されている全ての出版物は、引用する事により本明細書の一部を成す事とする。

30

【0080】

[引用文献]

【表1】

1. Cotton, R.G.H. and Milstein, C. *Nature* **244**, 42-43 (1973).
2. Köhler, G. and Milstein, C. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
3. Nilsson, K. *Int. J. Cancer* **7**, 380-396 (1971).
4. Roder, J.C., Cole, S.P.C. and Kozbor, D. *Meth Enzym.* **121**, 140-167 (1989).
5. Karpas, A., Fischer, P., Swirsky, D. *Science* **216**, 997-999 (1982).
6. Karpas, A., Fischer, P., Swirsky, D. *Lancet* **i**, 931-933 (1982).
7. Galfre, G. & Milstein, C. *Meth. Enzymology*, **7B**, 3-46 (1981) 10
8. Karpas, A., Gilson, W., Bevan, P.C., Oates, J.K. *Lancet* **ii**, 695-697 (1985).
9. Ellrodt, A. *et al. Lancet* **i**, 1383-1385 (1984)
10. Karpas, A. *Mole. Biol. Med.* **1**, 457-459 (1983).
11. Barré-Sinoussi, F. *et al. Science* **220**, 868-871 (1983).
12. Czepulkowski, B.H., Bhatt, B., Rooney, D.E. in *Human cytogenetics: A practical approach. Vol 2*, IRL Press, Oxford University Press (1992).
13. Winter, G. and Milstein, C. *Nature* **349**, 293-299 (1991).
14. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 433-455 (1994). 20
15. Bruggemann, M. and Neuberger, M.S. *Immunol. Today* **17**, 391-397 (1996).
16. Shulman *et al. Nature* **276**, 269-270 (1978).
17. Panova & Gustafsson, (1995) *Hybridoma* **14,3**, 265-269

【図面の簡単な説明】

【図 1】

2つのハイブリドーマ、707/164 () および707/100 () によるIgG分泌量の定量。各ハイブリドーマを、10%ウシ胎児血清補足RPMI-1640増殖培地に 3×10^5 個/mlの細胞濃度で接種した。試料を表示されている感覚で収集し、免疫固定によるIgGの定量と細胞計数に供した。4日後、707/164ハイブリドーマの細胞数は 8×10^5 個/mlに達したが、707/100ハイブリドーマは 6×10^5 個/mlであった。その後、生存可能な細胞数は減少し、10日目までには、ほとんど全ての細胞が死滅したが、その時点で培地のIgG濃度は最高であった。すなわち、両培地共、IgG濃度は $210 \mu\text{g/ml}$ であった。

【図 2】

骨髓腫Karpas 707細胞系とハイブリドーマにより分泌される免疫グロブリンの分析。10%透析ウシ胎児血清と $250 \mu\text{Ci/ml}$ の $[35\text{S}]$ メチオニンおよびシステインを補足したL-メチオニン、L-シスチン欠乏培地(Amersham International)において、 2×10^6 個/mlの細胞濃度で細胞を増殖させた。CO₂インキュベータの中で37℃で8時間、細胞培養した。培養後、細胞懸濁液を1000gで5分間遠心分離した。上清を、完全還元後、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析した。放射標識された分泌されたIgGの同一性が免疫固定により確認された。

パネル:

- 1 骨髓腫細胞により産生される少量の 軽鎖 40
- 2 164細胞のハイブリッドにより産生されるgp41HIV-1と反応するIgG 50

3, 4 骨髄腫細胞を新鮮白血球と融合することにより形成される I g G 産生ハイブリドーマ

5, 8, 9, 16 扁桃細胞により形成される I g G 産生ハイブリドーマ

6, 7 軽鎖のみを分泌する扁桃細胞による 2 つのハイブリドーマ

10 ~ 12 新鮮扁桃細胞により形成されるハイブリドーマにより分泌される I g M。バンド 12 は、このハイブリドーマが両方の軽鎖を分泌することを示唆している。

13 重鎖 G および M が陰性であったため、このハイブリドーマは 2 つの軽鎖のみを分泌する様に見える。

14 骨髄腫と扁桃細胞のハイブリッドにより産生される 2 つの軽鎖を有する I g G

15 高濃度の軽鎖のみを分泌する扁桃細胞のハイブリドーマ

10

【図 3 a】

ほぼ 4 倍体である K a r p a s 7 0 7 細胞系の染色体の核型。免疫グロブリン遺伝子を含む染色体 2、14、22 が正常と 2 倍体であることに注意。

【化 1】

83,XX,-X,-X,del(1)(p11p36)x4,+del(1)(q11q44),-2,-2,der(3)del(3)(p21p25)inv(3)(q23q25),+del(3)(q13q21),der(5)t(1;5)(p11;q31),der(5)t(2;5)(q21;q31),del(5)(q13q33)x2,+add(5)(q31),-6,-6,add(7)(p25),del(8)(q22q24),-9,del(11)(q23q25),-11,del(12)(p12p13),-13,-13,-14,-14,add(15)(p11)x2,der(16)t(1;16)(p11;p11),add(16)(p11)x2,-16,der(18)t(1;18)(q23;p11),add(18)(p11),add(18)(q23),-18,add(19)(q13)x2,+der(19)t(1;19)(q11;p13)+der(19)t(dup(1)(q23q44);19)(q11;p13),-21,-22,-22,+mar1x2,+mar2

20

【図 3 b】

染色体 N o . 1 の場合明らかな正常の染色体対を含むほぼ 6 倍体であるハイブリドーマ K a r p a s 7 0 7 / 1 6 4 の核型。

30

【化 2】

125,XXX,-X,-X,-X,del(1)(p11p36)x4,+del(1)(q11q44),-2,-2,add(3)(p25),der(3)del(3)(p21p25)inv(3)(q23q25),add(4)(q31),-4,der(5)t(1;5)(p11;q31),der(5)t(2;5)(q21;q31),del(5)(q13q33)x2,+add(5)(q31),del(6)(q21q23)-6,-6,add(7)(p25)x2,del(8)(q22q24),-9,del(11)(q23q25),-11,del(12)(p12p13)x2,-13,-13,-14,-14,add(15)(p11)x2,der(16)t(1;16)(p11;p11),add(16)(p11)x2,-16,der(18)t(1;18)(q23;p11),add(18)(p11),add(18)(q23),-18,add(19)(q13)x2,+der(19)t(1;19)(q11;p13),+der(19)t(dup(1)(q23q44);19)(q11;p13),-21,-21,-22,-22,+mar1x2,+mar2

40

【図 4】

骨髄腫 (a) とハイブリドーマ (b) の電子顕微鏡写真。検出可能量の粗面小胞体 (R E R) を含まない様に見える骨髄腫細胞の細胞質と対照的に、ハイブリドーマの細胞質は、プラズマ細胞に似た平行で同心の R E R により取り込まれる。これらの形態学的観察結果は、骨髄腫により産生される低濃度の軽鎖と、ハイブリドーマにより分泌される高濃度の I g G 濃度と関係づけることができる。細胞を 3 % グルタルアルデヒドの中で固定し、

50

極薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛の中で染色した。

【国際公開パンフレット】

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

(18) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/04607 A1(51) International Patent Classification: C12N 5/08, 5/24,
C07K 16/00, G01N 33/53, A61P 35/00, C12N 15/07,
G01N 33/577 # A61K 39/395, A61P 35/00

(21) International Application Number: PCT/GB01/03059

(22) International Filing Date: 9 July 2001 (09.07.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0016824.5 7 July 2000 (07.07.2000) GB
0017139.7 12 July 2000 (12.07.2000) GB
00270588 23 February 2001 (23.02.2001) US(81) Designated States (national): AB, AG, AI, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GU, GT,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KH, KG, KP, KR, KZ, LC,
LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,
MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TH, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA,
ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BI, CF,
CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).Declaration under Rule 4.17:
of inventorship (Rule 4.17(ii)) for US only(71) Applicant (for all designated States except US): GEN-
FOLD HOLDINGS S.A. (PA/PA), Panama City (PA).

(72) Inventor: and

(75) Inventor/Applicant (for US only): KARPAS, Abraham
[GB/GB], Cambridge Serologicals Limited, MRC Centre,
Hills Road, Cambridge CB2 2QH (GB).(74) Agents: MASCHHO, Antonio et al., D Young & Co, 21
New Fetter Lane, London EC4A 1DA (GB).Published:
with international search report
before the expiration of the time limit for amending the
claims and to be republished in the event of receipt of
amendmentsFor two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning
of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 02/04607 A1

(54) Title: HUMAN MYELOMA CELL LINE

(57) Abstract: There is provided a human myeloma cell line for use in a method for producing a human monoclonal antibody.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

HUMAN MYELOMA CELL LINE

The present invention relates to a human myeloma cell line. In particular it relates to the use of a human myeloma cell line in a method for making a human hybridoma capable of producing human monoclonal antibodies.

BACKGROUND

The technique for providing murine monoclonal antibodies was devised in 1975 by Köhler & Milstein (1,2). In this method, antibody-producing spleen cells from an immunised mouse are fused with cells from a mouse myeloma to produce hybrid cells known as hybridomas. After fusion, the cells are selected using drugs that kill the myeloma parental cell, whereas the unfused parental spleen cells have a limited life-span and soon die, so that only hybrid cells survive. These hybridomas have the capacity to proliferate indefinitely and to secrete antibody specific for the antigen used to immunise the spleen cell donor. Those hybridomas producing antibody of the desired specificity are cloned, resulting in a hybridoma cell line producing a homogenous population of antibody molecules (i.e. monoclonal antibodies).

Much research effort has been directed to the adaptation of this technology to produce human monoclonal antibodies. Attempts to use the mouse myelomas to derive human monoclonal antibodies were unsuccessful because the hetero-specific hybrids quickly lose the relevant human chromosomes. Attempts have also been made to use known antibody-secreting human myeloma cell lines (such as the IgE λ secreting U266 human myeloma cell line, and the RPMI-8226 cell line which contains a heterogeneous mixture of lymphoblastoid and plasmablast cells (3)) for the production of human monoclonal antibodies, but they have all failed, in spite of promising early reports.

Due to the lack of success in obtaining human antibody-producing hybridomas, various alternative cell lines have been considered. For example, the Epstein-Barr virus (EBV) has been used to immortalise antibody-producing human peripheral blood B-lymphocytes. However, such cell lines have a number of drawbacks when compared with the murine monoclonal antibody-producing hybridomas. For example, they tend to be unstable with

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

respect to growth, they are low producers of antibodies, and EBV does not preferentially immortalise lymphoblasts engaged in antibody responses (4).

5 Strategies have also been developed to produce monoclonal antibodies with human character which bypass the need for an antibody-producing human cell line. For example, useful mouse monoclonal antibodies have been "humanised" by linking rodent variable regions and human constant regions (chimeric antibodies) (13). This somewhat reduces the human anti-mouse immunogenicity of the antibody but residual immunogenicity is retained by virtue of the foreign V-region framework. Moreover, the antigen-binding
10 specificity is essentially that of the murine donor. CDR-grafting and framework manipulation (EP 0239400) has improved and refined antibody manipulation to the point where it is possible to produce humanised murine antibodies which are acceptable for therapeutic use in humans. However, the antibody specificity remains determined by the murine binding site donor. Moreover, their production involves complex manipulation of
15 sequences and is laborious.

Phage display technology has been developed for the *in vitro* generation of human monoclonal antigen-binding fragments, whose V genes can be recovered and engineered into antibody genes to produce monoclonal antibodies (14). However, production of
20 human monoclonal antibodies by this route is a complex multi-step procedure, and the binding specificity of the antibodies, since it is engineered *in vitro* as a result of combination of randomly-generated sequences, is not subjected to *in vivo* affinity maturation as is the case with natural antibodies.

25 A transgenic mouse strain which contains human instead of mouse immunoglobulin genes has been developed (15). This mouse strain contains human genes and produces human antibodies; however because the diversity created is selected not in a human but the mouse host, and the antibodies undergo affinity maturation in the mouse, the antibodies are not truly human.

30 From an analytical perspective, none of the known methods is capable of dissecting man's immune response to specific antigen challenges. Direct analysis of genes from heavy and light chains following polymerase chain reaction (PCR) amplification has become the method of choice to characterise the type of antibodies expressed by people in certain

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

conditions. This method has the disadvantage that the information of the heavy-light chains pairing is lost.

5 The murine hybridoma procedure for producing monoclonal antibodies has the added advantage (over the above-mentioned non hybridoma based procedures) that it can preferentially immortalise antigen activated B cells, thus producing a long-lasting supply of monoclonal antibodies.

10 There is thus a need for a method for producing human monoclonal antibodies which has all the advantages of the conventional murine monoclonal antibody production method.

SUMMARY OF THE INVENTION

15 The present invention provides a human myeloma cell line which is capable of acting in an analogous manner to the mouse myeloma used in conventional methods for making murine monoclonal antibodies. Therefore, for the first time, the present invention enables the reliable production of truly human hybridomas and monoclonal antibodies.

20 The present invention thus concerns a human myeloma cell line which is capable of being fused with a human lymphocyte using a standard technique, such as a polyethylene glycol (PEG) fusion protocol, use of inactivated Sendai virus (2) or electrofusion methods (17), to produce hybrid cells. The present inventor has also developed a method for producing a myeloma cell line with a considerable growth advantage (i.e. a much shorter doubling time than a primary plasma cell culture from a myeloma patient).

25

The human myeloma cell line of the present invention can be used as a general antibody producing cell. For example, previously characterised antibodies can be produced by transfection of the myeloma cell line with known antibody genes. The myeloma cell line 30 is suited for "physiological" antibody production because the post-translational modifications of proteins produced by the myeloma cells are likely to be identical to those produced by human antibody-producing cells.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

In a preferred embodiment, however, the myeloma cell line of the present invention is used in a method for producing a human hybridoma which is capable of producing human monoclonal antibodies. Further aspects of the invention, therefore, relate to: a method for producing a hybridoma, which comprises the step of fusing a human myeloma cell line with a human lymphocyte; a human hybridoma cell line produced by such a method; and a human monoclonal antibody produced by such a hybridoma.

The hybridoma-production method the present invention can be used to immortalise human antibodies that are provoked by the natural body reaction in pathological conditions. This enables an immune response to be monitored over time, and also provides a source of antibodies which are more likely to be useful in therapy than antibodies prepared by other methods. Analysis of the specificity of such antibodies can be used to provide information on the disease-specific antigens which provoked the antibody *in vivo*. This information can, in turn be used to devise antigen-based therapeutic strategies, such as improved vaccines.

BRIEF DESCRIPTION OF THE FIGURES

Figure 1: Quantitation of IgG secretion by two hybridomas. 707/164(o) and 707/100(e). Each hybridoma was seeded at a concentration of 3×10^5 cells/ml in RPMI-1640 growth medium supplemented with 10% fetal bovine serum. Samples were collected at the indicated intervals for IgG quantitation by immunofixation and for cell counts. After four days the cell count of the 707/164 hybridoma reached 8×10^5 cells/ml while that of the 707/100 hybridoma was 6×10^5 cells/ml. Thereafter the number of viable cells decreased and by the 10th day nearly all the cells were dead when the level of IgG in the medium was at its highest, namely 210 μ g/ml of IgG for both cultures.

Figure 2: Analysis of immunoglobulin secreted by the myeloma Karpas 707 cell line and hybridomas. The cells were grown at a concentration of 2×10^6 cells/ml in L-methionine, L-cystine deficient medium which was supplemented with 10% dialysed fetal bovine serum and with [³⁵S] methionine and cysteine at 250 μ Ci/ml (Amersham International). The cells were incubated for 8 hours at 37°C in a CO₂ incubator. After incubation the cell suspensions were centrifuged at 1000g for 5 minutes. The supernatant

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

was analysed by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis after total reduction. The identity of radiolabelled secreted Ig was confirmed by immunofixation.

Panel:

- 5
- 1 Small quantity of κ light chain produced by the myeloma cells
- 2 IgG that react with the gp41 HIV-1 produced by the hybrid with the 164 cells.
- 10 3,4 IgG producing hybridoma formed by fusing the myeloma cells with fresh white blood cells.
- 5, 8, 9, 16 IgG producing hybridoma formed with tonsil cells.
- 15 6,7 Two hybridomas with tonsil cells that secrete the κ light chain only.
- 10-12 IgM secreted by hybridoma formed with fresh tonsil cells. Band 12 suggests that this hybridoma secretes both light chains.
- 20 13 This hybridoma appears to secrete only the two light chains since it was negative for the heavy chains G and M.
- 14 IgG with the two light chains produced by a hybrid between the myeloma and tonsil cells.
- 25 15. Hybridoma with tonsil cells that secrete high levels of light chain only.

Figure 3a Karyotype of the chromosomes of the Karpas 707 cell line which are near tetraploid. Note that chromosomes 2, 14 and 22 which contain the immunoglobulin genes are normal and diploid.

30

83,XX,-X,-X,del(1)(p11p36)x4,+del(1)(q11q44),-2,-2,der(3)del(3)(p21p25)inv(3)(q23q25),+del(3)(q13q21),der(5)t(1;5)(p11;q31),der(5)t(2;5)(q21;q31),del(5)(q13q33)x2,+add(5)(q31),-6,-6,add(7)(p25),del(8)(q22q24),-9,

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

del(11)(q23q25),-11,del(12)(p12p13),-13,-13,-14,-14,add(15)(p11)x2,
 der(16)t(1;16)(p11;p11),add(16)(p11)x2,-16,der(18)t(1;18)(q23;p11),
 add(18)(p11),add(18)(q23),-18,add(19)(q13)x2,+der(19)t(1;19)(q11;p13)
 +der(19)t(dup(1)(q23q44);19)(q11;p13),-21,-22,-22,+mar1x2,+mar2

5

b. Karyotype of the hybridoma Karpas 707/164 which is near hexaploid containing the normal pairs of chromosomes which are readily obvious in the case of chromosomes No. 1.

- 10 125,XXX,-X,-X,-X,del(1)(p11p36)x4,+del(1)(q11q44),-2,-2,add(3)(p25),
 der(3)del(3)(p21p25)inv(3)(q23q25),add(4)(q31),-4,der(5)t(1;5)(p11;q31),
 der(5)t(2;5)(q21;q31),del(5)(q13q33)x2,+add(5)(q31),del(6)(q21q23)
 -6,-6,add(7)(p25)x2,del(8)(q22q24),-9,del(11)(q23q25),-11,
 del(12)(p12p13)x2,-13,-13,-14,-14,add(15)(p11)x2,der(16)t(1;16)(p11;p11),
 15 add(16)(p11)x2,-16,der(18)t(1;18)(q23;p11),add(18)(p11),add(18)(q23),
 -18,add(19)(q13)x2,+der(19)t(1;19)(q11;p13),+der(19)t(dup(1)(q23q44);19)(q11;p13),
 -21,-21,-22,-22,+mar1x2,+mar2

- Figure 4: Electron micrograph of the myeloma (a) and hybridoma (b). In contrast to
 20 the cytoplasm of the myeloma cells which does not appear to contain detectable levels of
 rough endoplasmic reticulum (RER), the cytoplasm of the hybridoma is taken up by
 parallel and concentric RER resembling plasma cells. These morphological observations
 can be correlated with the low level of κ light chain produced by the myeloma and high
 levels of IgG which is secreted by a hybridoma. The cells were fixed in 3%
 25 glutaraldehyde and the ultra-thin sections stained in uranyl acetate and lead citrate.

DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION

- In a first aspect, the present invention relates to a human myeloma cell line which is
 30 suitable for use in a method for producing a human monoclonal antibody-secreting
 hybridoma.

The myeloma cell line may be developed from primary plasma cell cultures from patients
 with myeloma, for example from the bone marrow or peripheral blood of such patients.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

In order to develop a homogenous cell line, the cells from the patients are cultured *in vitro* and amplified.

- 5 It is normal for newly developed human myeloma cell lines to have a relatively long doubling time, of the order of 70 hours. However, the present inventor has surprisingly found that it is possible to produce a much faster growing cell line by culturing the cells *in vitro*. For example, it is possible to reduce the doubling time to approximately 35 hours or less.
- 10 The myeloma cell line of the present invention may have a doubling time which is less than 0.75, preferable less than 0.5 times the doubling time of the cell line before *in vitro* culture treatment. The myeloma cell line of the present invention may have a doubling time of less than 50 hours, preferably less than 40 hours, more preferably about 30 hours.
- 15 In order to use the standard polyethylene glycol (PEG) fusion protocol, the myeloma cell line of the present invention may be resistant to PEG. The present inventor found that 99% of human myeloma cells were killed after first treatment with PEG for lymphocyte fusion. Myeloma cells may be made PEG-resistant by treating cells with multiples cycles of PEG. The present inventor has found that in the region of twenty cycles of treatment
- 20 produces a cell line in which only about 25% of cells are killed by PEG treatment. Selection of a PEG-resistant myeloma cell results in a cell line which can be fused with human lymphocytes to produce a human/human hybridoma in accordance with the present invention.
- 25 In the standard murine monoclonal antibody-secreting hybridoma production method, fused cells are selected using hypoxanthin, aminopterin, thymidin (HAT) medium. Murine myeloma cells are HAT-sensitive because they lack the enzyme hypoxanthine:guanosine phosphoribosyl transferase (HGPRT), whereas hybridoma cells are HAT-resistant, the HGPRT gene being provided by the spleen cell fusion partner. In
- 30 order to use the same selection procedure, the myeloma cell line of the invention should be sensitive to HAT. HAT sensitivity may be selected by growth in 8-azaguanine and/or 6-thioguanine or other selective agents as known in the art. As used herein, the term "HAT-sensitive" means that, in a hybridoma fusion procedure, treatment with HAT

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

medium results in preferential killing of unfused myelomas such that hybridoma cells may be isolated.

5 It is convenient for the myeloma cell line to be Ouabain resistant, to facilitate the fusion and selection procedure with cell lines or with fresh cells isolated from tissues (such as bone marrow, tonsil, lymph node, spleen and malignant tissue). Cells may be rendered Ouabain resistant by continued culture in increasing Ouabain concentrations. The resulting cell lines are HAT-sensitive and Ouabain resistant.

10 It has been found that the myeloma cells having a growth advantage have an increased chromosome number compared to myeloma cells with longer doubling times. The myeloma cells of the present invention may have an increase in the number of chromosomes (aneuploid), or be near tetraploid, and may have a number of gross chromosomal abnormalities. However, one or more (preferably all) of chromosomes 2,
15 14 and 22 may be normal and/or diploid. Chromosomal analysis may be performed using standard techniques such as the G-banding method.

The present inventor has produced and characterised a human myeloma cell line which has a short doubling time, is PEG resistant, Ouabain resistant and HAT sensitive (see the
20 Examples). This cell line is known as "Karpas 707", and a sample has been deposited at the ECACC, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, under Deposit No. 00071108.

The second aspect of the invention relates to a method for producing a myeloma cell line.
25 In addition to steps selecting for: a growth advantage, HAT-sensitivity, Ouabain-resistance and/or PEG sensitivity (as described above), the method may also comprise the step of introducing into the cells a marker capable of conferring sensitivity or resistance to an agent other than HAT, Ouabain and PEG. Such a marker or marker(s) may be introduced into the cell by, for example, genetic engineering methods known in the art.
30 Representative markers: enzymes producing a detectable product, such as β -galactosidase; proteins which confer antibiotic resistance or susceptibility; and genes whose presence is fatal to the cell under certain conditions ("suicide genes"), such as herpes simplex virus thymidine kinase (HSVTK) which causes cell death in the presence of gancyclovir.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

The third aspect of the invention relates to a method for producing a human hybridoma cell line. The hybridoma may be produced by a method analogous to the conventional method for producing murine hybridomas (7). For example, the myeloma cell line of the
5 first aspect of the present invention may be fused with a human lymphocyte using, for example, a standard PEG fusion protocol, inactivated Sendai virus or electrofusion methods.

Hybrid cells may be selected from unfused cells by any of the means known in the art.
10 For example, hybrid cells may be selected and/or isolated by cell sorting (such as by fluorescence-activated cell sorting (FACS)), using magnetic beads or using cytotoxicity. The conventional murine method for selecting hybrid cells involves growing the cell population post-fusion in a medium containing a chemical which will selectively kill myeloma cells which are not fused with lymphocytes (such as HAT). The hybrid cells
15 may then optionally be cloned to produce a homogenous hybridoma cell line. General methods for hybridoma production are known in the art. For example, the following procedure may be used:

A single-cell suspension of human lymphocytes from an immunised individual is formed
20 in serum free RPMI 1640, supplemented with 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (RPMI). The cell suspension is filtered through sterile 70-mesh Nitex cell strainer, and washed twice by centrifuging at 200 g for 5 minutes and resuspending the pellet in 20 ml serum free RPMI.

25 2×10^5 lymphocytes are combined with 4×10^7 myeloma cells (kept in log phase in RPMI with 11% foetal bovine serum (FBS) for three days prior to fusion), centrifuged and the supernatant is aspirated. The cell pellet is dislodged and 2 ml of 37°C PEG 1500 (50% in 75 mM HEPES, pH 8.0) is added while stirring over the course of one
30 minute, followed by the addition of 14 ml of serum free RPMI over seven minutes. Additional RPMI can be added and the cells are centrifuged at 200 g for 10 minutes. After discarding the supernatant, the pellet is resuspended in 200 ml RPMI containing 15% FBS, 100 mM sodium hypoxanthine, 0.4 mM aminopterin, 16 mM thymidine

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

(HAT), 25 units/ml IL-6 and 1.5×10^6 lymphocytes/ml. The suspension is dispensed into ten 96-well flat bottom tissue culture plates at 200 μ l/well. Cells are fed on days 2, 4, and 6 days post-fusion by aspirating 100 μ l from each well with an 18 G needle, and adding 100 μ l/well plating medium with or without 10 U/ml IL-6 and lacking lymphocytes.

When cell growth reaches 60-80% confluence, culture supernatants are taken from each well and screened for reactivity to the desired antigen by ELISA. ELISAs may be performed as follows. Immulon 4 plates are coated at 4°C with 50 μ l/well with 100ng/well of antigen in 50 mM carbonate buffer, pH 9.6. Plates are washed with PBS with 0.05% Tween 20 and blocked 30 minutes at 37°C with 0.5% Fish Skin Gelatin. Plates are washed as described above and 50 μ l culture supernatant is added. After incubation at 37°C for 30 minutes, 50 μ l of horseradish peroxidase conjugated goat anti-human IgG(fc) [diluted 1:10,000 in PBST] is added. Plates are incubated at 37°C for 30 minutes, washed with PBST and 100 μ l of substrate, consisting of 1 mg/ml TMB and 0.15ml/ml 30% H_2O_2 in 100 mM Citrate, pH 4.5, is added. The colour reaction is stopped with the addition of 50 ml of 15% H_2SO_4 . A_{450} is read on a plate reader.

The term lymphocyte is intended to include any antibody-producing cell. For example, the lymphocyte may be a lymphoblast, such as an EBV-transformed B cell. The lymphocyte may also be an *in vitro* cultured cell. Alternatively, the lymphocyte may be freshly isolated from a human subject. For example, the lymphocytes can be obtained from organs such as tonsils as well as lymph nodes, spleen, blood or bone marrow.

A human subject may be a healthy individual, in particular an individual who has been immunised with a particular antigen, or who has had (and recovered from) a particular disease. The human subject may alternatively be an individual who *has* a particular disease. A lymphocyte from the human subject may, therefore, be capable of producing an antibody of interest.

Myelomas according to the invention may also be fused with non-antibody-producing lymphocytes, or other white blood cells, which produce lymphokines. Especially preferred are tumour-infiltrating cells which produce anti-tumor antibodies or

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

lymphokines of therapeutic utility. The hybridomas thus obtained are capable of reliably producing anti-tumor antibodies or lymphokines in large quantities.

5 One advantage with the hybridoma-production method of the present invention, as well as the conventional method for producing mouse monoclonal antibody-secreting hybridomas, is that the myeloma cell line preferentially fuses with antigen-activated lymphocytes.

10 The present invention also provides a hybridoma cell line, and a monoclonal antibody produced by such a cell line.

Preferably the hybridoma of the present invention produces a high yield of antibodies. For example, the hybridoma may secrete more than 100 $\mu\text{g/ml}$ antibody, preferably at least 200 $\mu\text{g/ml}$ antibody, more preferably at least 300 $\mu\text{g/ml}$ antibody.

15 The hybridoma of the present invention may have extensive rough endoplasmic reticulum (RER). In contrast to the cytoplasm of the myeloma cells (which do not appear to contain detectable levels of rough endoplasmic reticulum), the present inventor has found that the cytoplasm of a hybridoma cell of the present invention is taken up by parallel and
20 concentric RER resembling plasma cells. The term "extensive" is used herein to indicate that the levels of RER in the hybridoma are comparable to those found in plasma cells.

The monoclonal antibody may be of any isotype: for example IgG, IgM, IgD, IgA or IgE. It may comprise light chains, heavy chains or both.

25 Preferably the antibody is useful in the prevention or treatment of a disease. For example, if a disease-specific antibody-producing cell is isolated from one patient, the cell could be immortalised by the method of the present invention, enabling the antibody to be produced in large quantities. The antibody may be given to a patient in a passive
30 immunisation protocol to confer resistance to the disease. Alternatively, the antibody may be given to a patient suffering from the disease to boost immune responses and help clear the infection. It is possible that the derived hybridomas with various white blood cells will give rise to a range of therapeutic humoral factors.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

Human monoclonal antibodies produced according to the method of the present invention may be employed in substantially any process which involves ligand-polypeptide binding, including *in vivo* therapeutic and prophylactic applications, *in vitro* and *in vivo* diagnostic applications, *in vitro* assay and reagent applications, and the like. For example, antibody
5 molecules may be used in antibody based assay techniques, such as ELISA techniques, according to methods known to those skilled in the art.

As alluded to above, the antibodies produced according to the invention are of use in diagnostic, prophylactic and therapeutic procedures. For example, antibodies produced
10 according to the invention are of use diagnostically in agglutination, ELISA, immunoperoxidase, Western blot and *in situ* protein detection by standard immunohistochemical procedures. For use in these applications, the antibodies may be labelled in accordance with techniques known to the art. In addition, such antibodies may
15 be used preparatively in affinity chromatography procedures, when complexed to a chromatographic support, such as a resin. All such techniques are well known to one of skill in the art.

Therapeutic and prophylactic uses of antibodies prepared according to the invention involve the administration of thereof to a recipient or patient.

20 Substantially pure antibodies of at least 90 to 95% homogeneity are preferred for administration to a patient, and 98 to 99% or more homogeneity is most preferred for pharmaceutical uses. Once purified, partially or to homogeneity as desired, the selected antibodies may be used diagnostically or therapeutically (including extracorporeally) or in
25 developing and performing assay procedures, immunofluorescent stainings and the like (Lefkowitz and Pernis, (1979 and 1981) Immunological Methods, Volumes I and II, Academic Press, NY).

The antibodies thereof of the present invention will typically find use in preventing,
30 suppressing or treating inflammatory states, allergic hypersensitivity, cancer, bacterial or viral infection, and autoimmune disorders (which include, but are not limited to, Type I diabetes, multiple sclerosis, rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus, Crohn's disease and myasthenia gravis).

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

In the instant application, the term "prevention" involves administration of the protective composition prior to the induction of the disease. "Suppression" refers to administration of the composition after an inductive event, but prior to the clinical appearance of the disease. "Treatment" involves administration of the protective composition after disease symptoms become manifest.

Animal model systems which can be used to screen the effectiveness of the antibodies in protecting against or treating the disease are available. Methods for the testing of systemic lupus erythematosus (SLE) in susceptible mice are known in the art (Knight *et al.* (1978) *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten *et al.* (1978) *New Eng. J. Med.*, 299: 515). Myasthenia Gravis (MG) is tested in SJL/J female mice by inducing the disease with soluble AchR protein from another species (Lindstrom *et al.* (1988) *Adv. Immunol.*, 42: 233). Arthritis is induced in a susceptible strain of mice by injection of Type II collagen (Stuart *et al.* (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). A model by which adjuvant arthritis is induced in susceptible rats by injection of mycobacterial heat shock protein has been described (Van Eden *et al.* (1988) *Nature*, 331: 171). Thyroiditis is induced in mice by administration of thyroglobulin as described (Maron *et al.* (1980) *J. Exp. Med.*, 152: 1115). Insulin dependent diabetes mellitus (IDDM) occurs naturally or can be induced in certain strains of mice such as those described by Kanasawa *et al.* (1984) *Diabetologia*, 27: 113. EAE in mouse and rat serves as a model for MS in human. In this model, the demyelinating disease is induced by administration of myelin basic protein (see Paterson (1986) *Textbook of immunopathology*, Mischer *et al.*, eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin *et al.* (1973) *Science*, 179: 478; and Satoh *et al.* (1987) *J. Immunol.*, 138: 179).

The antibodies of the present invention may also be used in combination with other antibodies, particularly human monoclonal antibodies (MAbs) reactive with other markers on human cells responsible for the diseases. For example, suitable T-cell markers can include those grouped into the so-called "Clusters of Differentiation," as named by the First International Leukocyte Differentiation Workshop (Bernhard *et al.* (1984) *Leukocyte Typing*, Springer Verlag, NY).

Generally, the present antibodies will be utilised in purified form together with pharmacologically appropriate carriers. Typically, these carriers include aqueous or

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

alcoholic/aqueous solutions, emulsions or suspensions, any including saline and/or buffered media. Parenteral vehicles include sodium chloride solution, Ringer's dextrose, dextrose and sodium chloride and lactated Ringer's. Suitable physiologically-acceptable adjuvants, if necessary to keep a polypeptide complex in suspension, may be chosen from
5 thickeners such as carboxymethylcellulose, polyvinylpyrrolidone, gelatin and alginates.

Intravenous vehicles include fluid and nutrient replenishers and electrolyte replenishers, such as those based on Ringer's dextrose. Preservatives and other additives, such as antimicrobials, antioxidants, chelating agents and inert gases, may also be present (Mack
10 (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16th Edition).

The antibodies of the present invention may be used as separately administered compositions or in conjunction with other agents. These can include various immunotherapeutic drugs, such as cyclosporine, methotrexate, adriamycin or cisplatinum, and immunotoxins. Pharmaceutical compositions can include "cocktails" of various
15 cytotoxic or other agents in conjunction with the selected antibodies, receptors or binding proteins thereof of the present invention, or even combinations of selected polypeptides according to the present invention having different specificities, such as polypeptides selected using different target ligands, whether or not they are pooled prior to
20 administration.

The route of administration of pharmaceutical compositions according to the invention may be any of those commonly known to those of ordinary skill in the art. For therapy, including without limitation immunotherapy, the antibodies of the invention can be
25 administered to any patient in accordance with standard techniques. The administration can be by any appropriate mode, including parenterally, intravenously, intramuscularly, intraperitoneally, transdermally, *via* the pulmonary route, or also, appropriately, by direct infusion with a catheter. The dosage and frequency of administration will depend on the age, sex and condition of the patient, concurrent administration of other drugs,
30 counterindications and other parameters to be taken into account by the clinician.

The antibodies of this invention can be lyophilised for storage and reconstituted in a suitable carrier prior to use. This technique has been shown to be effective with conventional immunoglobulins and art-known lyophilisation and reconstitution

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

techniques can be employed. It will be appreciated by those skilled in the art that lyophilisation and reconstitution can lead to varying degrees of antibody activity loss (e.g. with conventional immunoglobulins, IgM antibodies tend to have greater activity loss than IgG antibodies) and that use levels may have to be adjusted upward to compensate.

5

The compositions containing the present antibodies or a cocktail thereof can be administered for prophylactic and/or therapeutic treatments. In certain therapeutic applications, an adequate amount to accomplish at least partial inhibition, suppression, modulation, killing, or some other measurable parameter, of a population of selected cells is defined as a "therapeutically-effective dose". Amounts needed to achieve this dosage will depend upon the severity of the disease and the general state of the patient's own immune system, but generally range from 0.005 to 5.0 mg of antibody *per* kilogram of body weight, with doses of 0.05 to 2.0 mg/kg/dose being more commonly used. For prophylactic applications, compositions containing the present selected polypeptides or cocktails thereof may also be administered in similar or slightly lower dosages.

10
15

A composition containing an antibody according to the present invention may be utilised in prophylactic and therapeutic settings to aid in the alteration, inactivation, killing or removal of a select target cell population in a mammal. In addition, the antibodies described herein may be used extracorporeally or *in vitro* selectively to kill, deplete or otherwise effectively remove a target cell population from a heterogeneous collection of cells. Blood from a mammal may be combined extracorporeally with the selected antibodies, cell-surface receptors or binding proteins thereof whereby the undesired cells are killed or otherwise removed from the blood for return to the mammal in accordance with standard techniques.

20
25

The capacity to produce unlimited quantities of a particular antibody from an antibody-producing cell in a patient can also be used to gain valuable information about the immune response. For example, if the patient has a disease, it is possible to deduce the disease-specific antigens targeted by the immune system. This information can be used to design better drugs and vaccines to treat and/or prevent the disease.

30

Almost every disease produces an antibody-mediated immune response, and so is a candidate for prevention/treatment by an antibody-mediated therapy. The procedure of the

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

present invention will be invaluable to immortalise human antibodies provoked by the natural defensive reaction of pathological conditions. Of particular interest, however, is the use of the method of the present invention to immortalise tumour-infiltrating lymphocytes. This may produce useful anti-cancer antibodies and also uncover tumour specific antigens. Such antigens could in turn be used as anti-cancer vaccines.

5

By analysing antibodies produced at different times, it is also possible to map the course of an immune response to antigenic challenge. This may provide valuable information on the optimum timing for a particular treatment strategy or vaccination protocol.

10

In a further aspect of the present invention there is provided the use of a human myeloma cell line according to the first aspect to produce an antibody, by transfection of the cell line with antibody-producing genes. The post-translational modifications effected by the human myeloma are identical to those formed in human antibodies. Thus, for biotechnological production, the human myeloma line is preferred to produce antibodies derived not only from human hybridomas but also by transfection of already known antibody genes.

15

A human hybridoma cell line of the present invention may also be used to select a mutant that will be also HAT-sensitive in the same way that the murine Sp2/0-Ag14 was developed to produce a hybrid hybridoma (16) following fusion with another lymphocyte. In particular, a hybridoma produced using the myeloma cell line of the present invention which produces low/undetectable levels of antibody, but has high levels of RER, may be selected for fusion with a second lymphocyte capable of producing an antibody of interest. In this way, a hybrid hybridoma may be produced which is capable of secreting high titres of the desired antibody.

20

25

The following examples serve to illustrate the present invention, but should not be construed as a limitation thereof. The invention particularly relates to the specific embodiments described in these examples.

30

EXAMPLES

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

Example 1 – Production of an improved human myeloma cell line

The present inventor has been trying to develop new human myeloma cell lines for over twenty years. The present inventor has previously described a myeloma cell line which was developed from the bone marrow and peripheral blood of a 53 year old male patient diagnosed as having multiple myeloma (5,6). Since this cell line now secretes only κ light chain it has a potential practical advantage over myeloma cell lines that also produce the heavy chain.

Selecting for myeloma cells having a growth advantage

10 The doubling time of this myeloma cell line after isolation was over 70 hours, but following continuous *in vitro* culture over many months a faster growing cell emerged with a doubling time of approximately 30-40 hours, with an increase tendency to stick to the surfaces of glass or plastic when in stationary culture. The adherent cells can be detached easily by forceful pipetting in a similar way to the mouse myeloma cells used to
15 generate hybridomas.

Selection for HAT-sensitivity and Ouabain-resistance

The conventional method for making murine hybridomas relies on the fact that the unfused murine myeloma cells are sensitive to hypoxanthin, aminopterin, thymidin (HAT). In order to select for human myeloma cells which are (HAT)-sensitive, they were grown in 8-azaguanine. Azaguanine-resistant cells that grew at a concentration of 30 μ g/ml were further subjected to 30 μ g/ml of 2-Amino-6-mercaptopurine (6-Thioguanine). The first twenty clones that grew out were tested for their sensitivity to HAT medium. The fastest growing clone which did not seem to produce any resistance
25 was selected for further work. In order to be able to fuse the myeloma cells also with antibody producing cell lines it was decided to select also for an Ouabain resistant subline. Growing the myeloma cells with an increasing concentration of Ouabain eventually led to the emergence of a HAT-sensitive Ouabain-resistant subline.

30 Example 2 – Production of a human hybridoma

In order to optimise the conditions and screening for hybridoma formation the present inventor decided to develop (for the initial fusions) an antibody-producing human B-cell lymphocyte with known specificity. Therefore the peripheral blood lymphocytes from healthy HIV-1 infected individual were infected with EBV. From the EBV-immortalised

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

B-cells, cells that produced monoclonal antibodies to HIV-1 gp41 were selected and cloned, and referred to as Cell line Karpas 164. The present inventor then attempted unsuccessfully to fuse the myeloma cells with the EBV-immortalised human lymphocytes using polyethylene glycol (PEG) of different molecular weights.

5

In order to try to investigate the reasons for the repeated failure to develop hybrids the myeloma cells alone were treated with PEG using the same procedure as that used for cell fusion. Thereafter, the cells were seeded in growth medium, but without HAT or Ouabain, and examined for viability. Examination of the PEG-treated cells revealed that

10 the PEG was highly toxic, killing over 99% of the cells.

Development of a PEG-resistant sub-line

In view of the above findings, the present inventor decided to try and develop a PEG-resistant subline. This was achieved by treating about 10^7 myeloma cells with PEG (1500MW) following the protocol used for murine hybridoma formation. The few viable

15

cells which eventually grew out were treated again with PEG. He repeated such cycles of treatment more than twenty times over a period of about 18 months before a subline of the myeloma emerged where only about one quarter of the cells were killed by the PEG treatment. However, in the process HAT-resistant cells reappeared. The cells were

20

therefore treated once more with 8-azaguanine and cloned. A clone was isolated which did not revert when grown in HAT medium. This cell line is known as the myeloma Karpas 707 cell line, a sample of which has been deposited as Deposit No. ECACC 00071108.

25 *Fusion with EBV-immortalised lymphocytes*

The HAT-sensitive, PEG-resistant cells were then fused with the EBV immortalised human B-lymphocytes 164 cells producing the monoclonal antibodies to gp41 using a standard PEG fusion protocol (7). The cell suspension was seeded in multi-well plastic trays. Following growth in the presence of HAT and Ouabain, clones resembling the

30

myeloma cell line grew out. The tissue culture fluid gave strong staining of the membranes of acetone fixed HIV-1 infected Karpas 45 T-cells in the Karpas AIDS cell test for anti-viral antibodies (8).

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

Characterisation of the human monoclonal antibody produced by the hybridoma

Further studies using several polypeptides of the gp41 of HIV-1 enabled us to establish that our monoclonal antibody reacted against the peptide LAVERYLKDQQLGIWG but it failed to react against four other peptides of the gp41 of HIV-1 (results not shown). The epitope that this monoclonal antibody recognises seems not to be present in the African NDK strain of HIV-1 (9), since the antibody fails to react with NDK infected T-cells but reacts not only with the Cambridge isolate of HIV-1 (10) but also with the early French LAV isolate (11). A database search confirms that both the French (LAV) and British (CAMI) isolates of HIV-1 share the above amino acid sequence, whereas the African isolate has a lysine to arginine mutation.

Fusion with fresh human lymphocytes

After the successful fusion with the 164 cell line the present inventor decided to establish whether their myeloma cells would also form antibody-producing hybridomas with fresh human lymphocytes. They fused the myeloma cells with unfractionated white blood cells (WBC) from the peripheral blood of an adult and with tonsil cells prepared from surgically removed tonsils from two children. The cell suspensions obtained after the PEG fusion were seeded in 24 and 96 wells plastic tissue culture plates and grown in RPMI-1640 medium supplemented with 20% foetal bovine serum and HAT for the first 12 days. Thereafter, growth medium alone was used and colony formation was observed during the following 2-3 weeks in approximately 25% of the wells when the myeloma cells were fused with tonsil cells and in about 10% of the wells when the myeloma cells were fused with blood WBC. Tissue culture fluid collected from wells with active cell growth was assayed by ELISA for the presence of IgG. In this method, protein-A was used on the plastic wells to capture the IgG monoclonal antibodies produced by the newly formed hybridomas. The culture fluid from over 100 of the wells contained IgG.

The present inventor has, to date, developed over 20 independent Ig secreting hybrids from fusion with peripheral blood lymphocytes and over 100 antibody producing hybrids from fusion with tonsil cells.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

Example 3 – Characterisation of the human myeloma cell line and hybridomas*Morphological analysis of the hybridomas*

The growth pattern of many of the cells that grew out was variable. When in stationary culture, myeloma cells grow in a uniform pattern of adherent cells forming an irregular mosaic which covered the plastic surface with continuous release of cells into the culture fluid. When grown in roller flasks, most cells remain in suspension as clusters of variable size. The growth of some hybrids resembled the parent myeloma cells but many others acquired a distinct morphology and growth forms. In stationary culture, some hybridomas adhered to the plastic surfaces and displayed numerous thick but short spindles, rectangular and triangular shapes. Other grew mainly in suspension as single cells or clusters.

Ultrastructural examination of the cultured myeloma revealed that in contrast to the cells which contained large amounts of rough endoplasmic reticulum (RER) during the first year in culture (5), after long-term *in vitro* growth the cells have lost most of the RER. However, examination of two hybridomas, 707/164 and 707/105 (formed with blood B-cells) revealed that in both cases the hybrids resembled plasma cells (Figure 4). A large part of the cytoplasm was taken up by parallel and concentric RER while the degree of dilatation of the cisternae varied from cell to cell. The contents of the RER appeared as fine granular material which is probably immunoglobulin. A large number of mitochondria could be seen in most sections, while sections through the Golgi area revealed highly developed apparatus. Since the ultrastructural examination of EBV-immortalised 164 B-cells revealed only a small number of short and thin strands of RER it will not be unreasonable to suggest that the fused lymphoblast somehow activates the latent myeloma RER for the production of Ig.

Chromosomal analysis of the myeloma cell line

To confirm that the antibody producing cells were indeed a hybrid of myeloma and human lymphocytic, cell cultures were prepared for chromosome analysis using the G-banding method described by Czepulkowski et al. (12). Early on, the cultured myeloma cells (like the fresh patient cells) were found to be hypodiploid with 45 chromosomes containing several chromosomal abnormalities (5). However, the myeloma cells which had the selective growth advantage (after multiple cycles of *in vitro* culture) and which had increased PEG-resistance were revealed to be near tetraploid containing numerous

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

and unusual high number of gross chromosomal abnormalities. In fact 13 of the 23 chromosomes were abnormal. Karyotypic analysis revealed 5 copies of chromosome 1 all of which were also shorter than usual, and 3 marker chromosomes. It is interesting to note that the chromosomes 2, 14 and 22 (which contain the immunoglobulin genes) are normal and diploid.

In order to establish whether the repeated cycles of PEG treatment induced these chromosomal karyotype abnormalities, the chromosomes of cells which were frozen prior to the PEG treatment were also analysed. The analysis revealed that all these changes were present before the PEG treatment. Hence it appears that, during the continuous *in vitro* culture over many months and treatment with 8-azaguanine, 6-thioguanine, HAT and Ouabain, a near tetraploid cell line emerged which had a growth advantage over the hypodiploid myeloma cells.

15 *Chromosomal analysis of the hybridoma cell lines*

Karyotype analysis of the hybridoma with the 164 cells revealed that the cells are near hexaploid, containing the near tetraploid chromosome of the myeloma cell and the normal chromosome from the lymphoblast.

20 Karyotype analysis of the EBV-transformed lymphoblasts (Karpas 164 line) that produce monoclonal antibody to gp41 of HIV-1 shows that about 10% of the cells display a similar translocation, t(1;16) (p11;q10) to that detected also in the myeloma cell line. This may be due to prolonged *in vitro* culture.

25 *Analysis of IgG production*

As to the quantity of IgG production, a comparative assay for the secretion of antibodies to the gp41 of HIV-1 by the EBV infected lymphoblasts and the hybrid (707/164) revealed that the hybridoma produced at least eight times more antibodies than the lymphoblasts following culture of identical number of cells (10^6 /ml) under the same conditions. Specifically, the hybrid 707/164 secreted 470µg/ml of IgG while the 164 cells secreted less than the assay detection level, which is 70µg/ml after four days in culture. Since both cell cultures have the same genetic information for the antibody synthesis it is clear that the hybridoma cells of the present invention are far more effective in antibody production.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

Tests for the secretion of immunoglobulin confirm that the myeloma cells produced only a small quantity of light chain. The fusions with the tonsil cells and blood lymphocytes produced clones that secreted IgG as well as IgM. One of the hybrids which was formed
5 with tonsil cells produces only light chains ($\lambda + \kappa$). Such diversity of Ig production suggests that the myeloma cell line is capable of forming hybridomas with most if not all the range of antibody producing cells. In fact the present inventor has found that the hybridomas that are formed with the myeloma cell line described herein are far more effective in antibody production than murine hybridomas (specifically, the hybridoma that
10 secreted antibodies against gp41 of HIV-1 produced 470 $\mu\text{g/ml}$ yield of IgG, and the hybridomas that were formed following fusion with blood lymphocytes produced 210 $\mu\text{g/ml}$ and 150 $\mu\text{g/ml}$ of IgG). It correlates with extensive rough endoplasmic reticulum (RER) which is present in the human hybridoma as compared to the sparse RER of the murine hybridoma.

15 Various modifications and variations of the described methods and system of the invention will be apparent to those skilled in the art without departing from the scope and spirit of the invention. Although the invention has been described in connection with specific preferred embodiments, it should be understood that the invention as claimed
20 should not be unduly limited to such specific embodiments. Indeed, various modifications of the described modes for carrying out the invention which are obvious to those skilled in chemistry or biology or related fields are intended to be covered by the present invention. All publications mentioned in the above specification are herein incorporated by reference.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

REFERENCES

1. Cotton, R.G.H. and Milstein, C. *Nature* **244**, 42-43 (1973).
2. Köhler, G. and Milstein, C. *Nature* **256**, 495-497 (1975).
- 5 3. Nilsson, K. *Int. J. Cancer* **7**, 380-396 (1971).
4. Roder, J.C., Cole, S.P.C. and Kozbor, D. *Meth Enzym.* **121**, 140-167 (1989).
5. Karpas, A., Fischer, P., Swirsky, D. *Science* **216**, 997-999 (1982).
6. Karpas, A., Fischer, P., Swirsky, D. *Lancet* **i**, 931-933 (1982).
7. Galfre, G. & Milstein, C. *Meth. Enzymology*, **7B**, 3-46 (1981)
- 10 8. Karpas, A., Gilson, W., Bevan, P.C., Oates, J.K. *Lancet* **ii**, 695-697 (1985).
9. Ellrodt, A. *et al. Lancet* **i**, 1383-1385 (1984)
10. Karpas, A. *Mole. Biol. Med.* **1**, 457-459 (1983).
11. Barré-Sinoussi, F. *et al. Science* **220**, 868-871 (1983).
12. Czepulkowski, B.H., Bhatt, B., Rooney, D.E. in *Human cytogenetics: A practical approach. Vol 2*, IRL Press, Oxford University Press (1992).
- 15 13. Winter, G. and Milstein, C. *Nature* **349**, 293-299 (1991).
14. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E. and Hoogenboom, H.R. *Annu. Rev. Immunol.* **12**, 433-455 (1994).
15. Bruggemann, M. and Neuberger, M.S. *Immunol. Today* **17**, 391-397 (1996).
- 20 16. Shulman *et al. Nature* **276**, 269-270 (1978).
17. Panova & Gustafsson, (1995) *Hybridoma* **14**, 3, 265-269

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

CLAIMS

1. A human myeloma cell line for use in a method for producing a human monoclonal antibody, which has been selected for growth advantage by multiple cycles of continuous *in vitro* culture.
5
2. A human myeloma cell line for use in a method for producing a human monoclonal antibody, which possesses one or more properties selected from the group consisting of
10
 - a) PEG-resistance;
 - b) HAT-sensitivity; and
 - c) Ouabain resistance.
3. A human myeloma cell line according to claim 2, which possesses each of the
15 properties a, b and c.
4. A myeloma cell line according to any preceding claim which has an increased chromosome number and/or one or more chromosomal abnormalities.
- 20 5. A myeloma cell line according to claim 4 which is near tetraploid.
6. A myeloma cell line according to claim 4 or 5, wherein one or more of chromosomes 2, 14 and 22 are diploid and free from chromosomal abnormalities.
- 25 7. A myeloma cell line according to any preceding claim, substantially as described herein, and known herein as Karpas 707, which is the same as, or derivable from, the sample deposited in Deposit No. ECACC 00071108.
8. A method for producing a human myeloma cell line, comprising the steps of:
30
 - a) isolating a primary human myeloma cell from a myeloma patient;
 - b) culturing and multiplying the cell *in vitro* by multiple cycles of *in vitro* culture so as to select for a growth advantage over primary myeloma cells;
 - c) exposing the cells to an agent which enables selection for one or more HAT-sensitive cells;

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

- d) optionally, exposing the cells to Ouabain and selecting one or more cells which are Ouabain-resistant; and
- e) exposing the cells to polyethylene glycol (PEG), and selecting one or more PEG-resistant cells;
- 5 wherein the above steps c-e may be performed individually or sequentially in any order.
9. A method according to claim 8, which includes the step
- 10 f) introducing into the cells a marker capable of conferring sensitivity or resistance to an agent other than HAT, Ouabain and PEG
- wherein step f) can occur at any point in the method after step a).
10. A method for production of a human hybridoma, which comprises the step of fusion of a human myeloma cell line according to any of claims 1 to 7 with a human
- 15 white blood cell.
11. A method according to claim 10, comprising the steps of:
- a) incubating a myeloma cell line according to any one of claims 1 to 7 with a human white blood cell, in the presence of polyethylene glycol (PEG), inactivated Sendai
- 20 virus, or under electrofusion conditions;
- b) selecting for hybrid cells.
12. A method according to claim 11, wherein step b) comprises
- i) continuing the incubation in the presence of HAT with or without Ouabain;
- 25 ii) selecting HAT-resistant, optionally Ouabain-resistant cells; and
- iii) culturing the HAT-resistant, optionally Ouabain-resistant cells and selecting individual hybridoma clones.
13. A method according to any one of claims 10 to 12, wherein the white blood cell is
- 30 an antibody-producing lymphocyte, a lymphoblast such as an EBV-immortalised lymphocyte, or a lymphokine-producing white blood cell.
14. A method according to any one of claims 10 to 13, wherein the white blood cell is freshly isolated from a human subject.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

15. A method according to any one of claims 10 to 12, wherein the human white blood cell is part of a population of lymphocytes showing varying degrees of antigen activation, and the human myeloma cell line preferentially fuses with antigen activated lymphocytes from the population.
16. A human hybridoma cell line produced by a method according to any of claims 10 to 15.
17. A human hybridoma cell line according to claim 16, having extensive rough endoplasmic reticulum.
18. A human monoclonal antibody produced by a hybridoma cell line according to claim 16 or 17.
19. A human monoclonal antibody according to claim 18, for use in a method for treating or preventing a disease.
20. A human monoclonal antibody according to claim 19, for use in conferring humoral immunity to a human subject.
21. A method of producing an antibody, which comprises the following steps:
(i) isolation of a lymphocyte from a human subject;
(ii) production of a human hybridoma by using the lymphocyte in a method according to any of claims 10 to 15; and
(iii) isolation of an antibody secreted by the hybridoma.
22. A method according to claim 21, wherein the antibody is capable of treating and/or preventing a disease.
23. A method according to claim 22, wherein the lymphocyte is a tumour-infiltrating lymphocyte, and the antibody is useful in the treatment or prevention of cancer.

WO 02/04607

PCT/GB01/03059

24. A method for identifying a disease-specific antigen which comprises the following steps:
- (i) production of a disease-specific antibody by a method according to claim 22 or 23; and
 - 5 (ii) deduction of the antigen which is specifically recognised by the antibody.
25. A method of monitoring an immune response in a human which comprises the following steps:
- (i) isolation of lymphocytes from a human subject at varying stages of the immune response;
 - 10 (ii) production of a human hybridomas by using the lymphocytes in a method according to any of claims 10-15;
 - (iii) isolation of an antibody secreted by each hybridoma.
- 15 26. A method for producing a human antibody which comprises the following steps:
- (i) transfection of a human myeloma cell line according to any of claim 1 to 7 with one or more antibody encoding gene(s);
 - (ii) production of the antibody by the transfected myeloma cell line.
- 20 27. A method for producing a humoral factor, which comprises the step of fusing a cell from a myeloma cell line according to any of claims 1 to 7 with a white blood cell which is capable of producing the humoral factor.
- 25 28. The use of a human hybridoma cell line according to claim 16, in a method for selecting a mutant that will lead to a hybrid hybridoma.

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Date of Application No. PCT/GB 01/03059
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 C12N5/08 C12N5/24 G07K16/00 G01N33/53 A61P35/00 C12N15/07 G01N33/577 //A61K39/395, A61P35/00		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Multilingual classification suggested (classification system followed by classification symbols) IPC 7 C12N G07K		
Documentation searched other than multilingual documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, MEDLINE, LIFESCIENCES, EMBASE, CHEM ABS Data, BIOSIS, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	GUO YONGJUN ET AL.: "Establishment of human myeloma cell line KM-2R and its preliminary application to human-human hybridoma research." CHIN MED SCI, vol. 6, no. 2, June 1991 (1991-06), pages 92-95, XP001021594 page 93	1-6, 8-14, 21-24, 26, 27
X	HISAYOSHI O'OKA ET AL.: "Establishment of Stable Cell Lines producing anti-Pseudomonas aeruginosa monoclonal antibodies and their protective effect for the infection in mice" MICROBIOL. IMMUNOL, vol. 36, no. 12, 1992, pages 1305-1316, XP001025835 page 1306	2, 3, 10-14, 21, 22, 24, 27
-/-		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		
<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "P" document relating to an oral disclosure, use, exhibition or other means "F" 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: its 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, each constituting a single document as a person skilled in the art "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
17 October 2001		05/11/2001
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P. B. 5516, Patentlaan 2 NL - 2200 HV Leidschendam Tel: (+31-70) 340-2040, Tx: 31 051 850 NL Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Wagner, R

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. nel Application No PCT/GB 01/03059
C (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	MILLETTE C M ET AL: "PRODUCTION OF A HUMAN MONOCLONAL ANTIBODY TO HLA BY HUMAN-HUMAN HYBRIDOMA TECHNOLOGY A PRELIMINARY REPORT" AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY, PHILADELPHIA, PA, US, vol. 121, no. 1, October 1985 (1985-10), pages 10-14, XP000971774 ISSN: 0002-9440 page 11	2,3,10, 14,21, 24,27
X	"HUMAN MYELOMA CELL LINE CARRYING A PHILADELPHIA CHROMOSOME" SCIENCE, AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE., US, vol. 216, no. 4549, 28 May 1992 (1992-05-28), pages 997-999, XP001018528 ISSN: 0036-8075 cited in the application abstract	7
X	KARPAS A ET AL: "HUMAN PLASMACYTOMA WITH AN UNUSUAL KARYOTYPE GROWING IN VITRO AND PRODUCING LIGHT-CHAIN IMMUNOGLOBULIN" LANCET THE, LANCET LIMITED, LONDON, GB, 24 April 1982 (1982-04-24), pages 931-935, XP001018518 ISSN: 0140-6736 cited in the application abstract	7
P, X	KARPAS ET AL: "A human myeloma cell line suitable for the generation of human monoclonal antibodies" FNAS, vol. 98, no. 4, 13 February 2001 (2001-02-13), pages 1799-1804, XP002179323 page 1799 -page 1804	2-14, 21-27
A	US 4 720 459 A (WINKELHAKE JEFFREY L) 19 January 1988 (1988-01-19) the whole document	2-14, 21-27
A	US 4 833 077 A (ABE TSUTOMU ET AL) 23 May 1989 (1989-05-23) the whole document	2-14, 21-27
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		Int. Application No. PCT/GB 01/03059
D. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	OLSSON L ET AL: "HUMAN-HUMAN HYBRIDOMAS PRODUCING MONOCLONAL ANTIBODIES OF PREDEFINED ANTIGENIC SPECIFICITY" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 77, no. 9, September 1980 (1980-09), pages 5429-5431, XP001021693 ISSN: 0027-8424 the whole document	2-14, 21-27
A	COLE S P C ET AL: "HUMAN MONOCLONAL ANTIBODIES" MOLECULAR AND CELLULAR BIOCHEMISTRY, NORWELL, MA, US, vol. 62, no. 2, June 1984 (1984-06), pages 109-120, XP001021694 ISSN: 0300-8177 the whole document	2-14, 21-27

INTERNATIONAL SEARCH REPORT				International Application No. PCT/GB 01/33059	
Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date		
US 4720459	A	19-01-1988	NONE		
US 4833077	A	23-05-1989	JP 59175896	A	04-10-1984
			JP 1756958	C	23-04-1993
			JP 4039999	B	01-07-1992
			JP 58216125	A	15-12-1983
			DE 3379055	D1	02-03-1989
			EP 0096839	A1	28-12-1983

Form: PCT/GB/2001 (parent family annex) (July 1995)

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 P 21/08	G 0 1 N 33/53	M
G 0 1 N 33/53	C 1 2 N 15/00	C
// A 6 1 K 39/395	C 1 2 N 5/00	B
	A 6 1 K 39/395	N

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

(72) 発明者 カーパス, エイブラハム

イギリス国、シービー 2 2 キューエイチ ケンブリッジ、ヒルズ・ロード、エムアールシー・センター、ケンブリッジ・セロロジカルズ・リミテッド

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA45 CA04 DA02 DA03 EA04 FA02 GA01
 4B064 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01
 4B065 AA93X AA93Y AB01 AB02 BA01 BA08 CA25 CA44 CA46
 4C085 AA14 BB01 CC02 CC23 DD63
 4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74

专利名称(译)	人骨髓瘤细胞系		
公开(公告)号	JP2004502454A	公开(公告)日	2004-01-29
申请号	JP2002509461	申请日	2001-07-09
[标]申请(专利权)人(译)	剑桥盐湖城爵士技术Vie的师祖有限公司		
申请(专利权)人(译)	剑桥盐湖城技术Savishizu有限公司		
[标]发明人	カーパスエイブラハム		
发明人	カーパス,エイブラハム		
IPC分类号	G01N33/53 A61K39/395 A61P35/00 C07K16/00 C07K16/18 C12N5/08 C12N5/10 C12N5/16 C12N5/24 C12N15/02 C12N15/07 C12N15/09 C12P21/08		
CPC分类号	C12N5/163 A61K2039/505 C07K16/00 C07K2317/21 C12N2510/02		
FI分类号	C12N15/00.A A61P35/00 C07K16/18 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/53.M C12N15/00.C C12N5/00.B A61K39/395.N		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/DA03 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA01 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA93X 4B065/AA93Y 4B065/AB01 4B065/AB02 4B065/BA01 4B065/BA08 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C085/AA14 4C085/BB01 4C085/CC02 4C085/CC23 4C085/DD63 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA72 4H045/FA74		
优先权	2000016824 2000-07-07 GB 2000017139 2000-07-12 GB 60/270588 2001-02-23 US		
其他公开文献	JP2004502454A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于产生人单克隆抗体的方法的人骨髓瘤细胞系。

		特表2004-502454 (P2004-502454A) (4) 公表日 平成16年1月29日 (2004.1.29)	
(5) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	A	4 B 0 2 4
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00		4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/18	C 0 7 K 16/18		4 B 0 6 5
C 1 2 N 5/10	C 1 2 P 21/08		4 C 0 8 5
C 1 2 N 15/02	G 0 1 N 33/53	D	4 H 0 4 5
	審査請求 未請求 予備審査請求 有	(全 51 頁)	最終頁に続く
(2) 出願番号	特願2002-509461 (P2002-509461)	(7) 出願人	501401489 ケンブリッジ・ユニヴァーシティ・テクニカル・サービス・リミテッド イギリス国、シービー2 1 エスビー ケンブリッジ、ミル・レイン 1 G
(8) (2) 出願日	平成13年7月9日 (2001.7.9)	(7) 代理人	10009623 弁理士 奥山 尚一
(8) 翻訳文提出日	平成15年1月7日 (2003.1.7)	(7) 代理人	100096769 弁理士 有原 幸一
(8) 国際出願番号	PCT/GB2001/003059	(7) 代理人	100107319 弁理士 松島 鉄男
(8) 国際公開番号	W02002/004607		
(8) 国際公開日	平成14年1月17日 (2002.1.17)		
(3) 優先権主張番号	0016824.5		
(3) 優先日	平成12年7月7日 (2000.7.7)		
(3) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(3) 優先権主張番号	0017139.7		
(3) 優先日	平成12年7月12日 (2000.7.12)		
(3) 優先権主張国	イギリス (GB)		
(3) 優先権主張番号	60/270,588		
(3) 優先日	平成13年2月23日 (2001.2.23)		
(3) 優先権主張国	米国 (US)		
最終頁に続く			
(5) 【発明の名称】 ヒト骨髓瘤細胞系			