

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4203080号  
(P4203080)

(45) 発行日 平成20年12月24日(2008.12.24)

(24) 登録日 平成20年10月17日(2008.10.17)

(51) Int.Cl.	F 1	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00	Z N A B
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	A
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	

請求項の数 7 (全 40 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2006-135870 (P2006-135870)	(73) 特許権者	398050098
(22) 出願日	平成18年5月15日(2006.5.15)		バイオジェン・アイデック・インコーポレイテッド
(62) 分割の表示	特願2000-126317 (P2000-126317) の分割		Biogen Idec Inc.
原出願日	平成5年11月12日(1993.11.12)		アメリカ合衆国02142マサチューセッツ州ケンブリッジ、ケンブリッジ・センター14番
(65) 公開番号	特開2006-262907 (P2006-262907A)	(74) 代理人	100077517
(43) 公開日	平成18年10月5日(2006.10.5)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成18年5月15日(2006.5.15)	(74) 代理人	100087871
(31) 優先権主張番号	07/978891		弁理士 福本 積
(32) 優先日	平成4年11月13日(1992.11.13)	(74) 代理人	100082898
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 西山 雅也
(31) 優先権主張番号	08/149099		
(32) 優先日	平成5年11月3日(1993.11.3)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B細胞リンパ腫の治療のためのヒトBリンパ球限定分化抗原に対するキメラ抗体と放射能標識抗体の療法利用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫学的に活性なキメラ抗 - CD20抗体の軽鎖及び重鎖をコードする核酸を含んでなる宿主細胞において、前記軽鎖をコードする核酸が、配列番号9に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基1~106をコードするヌクレオチド配列を含んでなり、そして前記重鎖をコードする核酸が、配列番号10に示されるアミノ酸配列のアミノ酸残基1~121をコードするヌクレオチド配列を含んでなる、宿主細胞。

【請求項 2】

前記軽鎖をコードする核酸が、ヒト 軽鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列を更に含んでなり、そして前記重鎖をコードする核酸が、ヒト 1重鎖定常領域をコードするヌクレオチド配列を更に含んでなる、請求項1に記載の宿主細胞。

【請求項 3】

免疫学的に活性なキメラ抗 - CD20抗体を生産することが出来る、請求項1又は2に記載の宿主細胞。

【請求項 4】

哺乳類細胞である、請求項1~3のいずれか1項に記載の宿主細胞。

【請求項 5】

チャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞である、請求項4に記載の宿主細胞。

【請求項 6】

SP2/O細胞である、請求項4に記載の宿主細胞。

## 【請求項7】

請求項1～6のいずれか1項に記載の宿主細胞中の核酸によりコードされる軽鎖及び重鎖を発現せしめ、そして当該細胞により生産された抗体を精製することを含んでなる、精製された抗体の製造方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

この文書を通して言及される参考文献は、単にこの文書の出願日より前にその中に記載された情報について説明するのであって、該参考文献が「先行技術」であるということや、前に提出された出願に基づいた優先権または先行発明者によって本発明者らがそのような記載よりも日時が先行する権利を与えられないということの明白なまたは暗黙の認可であると解釈してはならない。

10

本発明は、B細胞表面抗原Bp35("CD20")に対する放射能標識抗体およびキメラ抗体を使ったB細胞リンパ腫の治療に向けられる。

## 【背景技術】

## 【0002】

脊椎動物(例えば霊長類、例えばヒト、類人猿、サル等を含む)の免疫系は多数の器官および細胞種から成り、これは脊椎動物宿主を侵略する外来微生物(「抗原」)を正確且つ特異的に認識するもの;そのような外来微生物に特異的に結合するもの;およびそのような外来微生物を排除/破壊するものへと発展していった。中でもリンパ球は免疫系にとって重要である。リンパ球は胸腺、脾臓および骨髓(成人)中で生産され、そしてヒト(成人)の循環系中に存在する全白血球の約30%を占める。リンパ球には2つの主な小集団、即ちT細胞とB細胞がある。

20

## 【0003】

T細胞は細胞性免疫の原因であり、一方B細胞は抗体産生(体液性免疫)を引き起こす。しかしながら、T細胞とB細胞は相互依存であると見なすことができる。典型的免疫応答では、抗原提示細胞の表面上の主要組織適合複合体(「MHC」)糖タンパク質に結合している抗原の断片にT細胞レセプターが結合するとT細胞が活性化される。そのような活性化が生物学的媒介物質(「インターロイキン」)の放出を引き起こし、これが本質的にB細胞を刺激して分化させそして該抗原に対する抗体(「免疫グロブリン」)を生産させる。

30

## 【0004】

宿主中の各B細胞はその表面上に異なる抗体を発現する。よって、或るB細胞は或る抗原に特異的な抗体を発現し、別のB細胞は別の抗原に特異的な抗体を発現するだろう。従って、B細胞は非常に多様であり、この多様性が免疫系にとって重要である。ヒトでは、各B細胞が無数の抗体分子(即ち約 $10^7 \sim 10^8$ )を生産することができる。そのような抗体産生は、最も典型的には外来抗原が中和された時に停止する(または実質的に減少する)。しかし、時に、特定のB細胞の増殖が衰えずに続くことがある。そのような増殖は「B細胞リンパ腫」と呼ばれる癌を引き起こし得る。

## 【0005】

40

T細胞とB細胞は共に、識別と同定のための「マーカー」として利用することができる細胞表面タンパク質を含んで成る。1つのそのようなヒトB細胞マーカーは、「CD20」と呼ばれるヒトBリンパ球限定分化抗原Bp35である。CD20は初期プレB細胞発達の間に発現され、形質細胞分化まで残存する。特に、CD20分子は細胞周期開始と分化に必要とされる賦活過程の中の一段階を調節すると思われ、通常、新生物性(「腫瘍」)B細胞上に非常に高レベルで発現される。CD20は、定義上、「正常」B細胞と「悪性」B細胞(即ち衰えない増殖がB細胞リンパ腫を引き起こし得るB細胞)の両方の上に存在する。よって、CD20表面抗原はB細胞リンパ腫の「ターゲティング(標的指向)」の候補者として働く可能性を有する。

## 【0006】

50

本質的には、そのようなターゲティングは次のようにして発生させることができる：B細胞のCD20表面抗原に特異的な抗体を例えば患者に注射する。それらのCD20抗体は正常B細胞と悪性B細胞の両方（表向きは）のCD20表面抗原に特異的に結合する。CD20表面抗原に結合した抗CD20抗体は新生物性B細胞の破壊と涸渇を引き起こすことができる。その上、腫瘍を破壊する可能性を有する化学物質または放射能標識が例えば新生物性B細胞に特異的に送達されるように、そのような物質を抗CD20抗体に接合することができる。アプローチにかかわらず、主目標は腫瘍を破壊することである。特定のアプローチは使用する特定の抗CD20抗体により決定され得るので、従ってCD20抗原をターゲティングするための利用可能なアプローチは異なり得る。

【0007】

例えば、CD20表面抗原のターゲティングの試みが報告されている。報告によればネズミ（マウス）モノクローナル抗体 1F5（抗CD20抗体）を連続点滴静注によりB細胞リンパ腫患者に投与した。報告によれば循環している腫瘍細胞を涸渇させるのに非常に高レベル（>2グラム）の1F5が必要であり、結果は「一時的」であると記載された。Pressら、"Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Sero-therapy of Human B-Cell Lymphomas." *Blood* 69/2:584-591(1987)。

【0008】

このアプローチに伴う潜在的問題は、非ヒトモノクローナル抗体（例えばマウスモノクローナル抗体）が典型的にはヒトエフェクター機能を欠くこと、即ちそれらが特に補体依存性細胞溶解を媒介したり抗体依存性細胞障害もしくはFcレセプター媒介性食作用を通してヒト標的細胞を溶解したりできないことである。更に、非ヒトモノクローナル抗体はヒト宿主により外来タンパク質として認識され得る。従って、そのような外来抗原の反復注入は、有害な過敏性反応となる免疫応答を誘導し得る。マウス由来のモノクローナル抗体については、これはヒト抗マウス抗体応答または"HAMA"と呼ばれている。その上、それらの「外来」抗体は宿主の免疫系によって攻撃され、その結果それらが標的部位に到達する前に事実上中和されてしまうことがある。

【0009】

リンパ球およびリンパ腫細胞は、幾つかの理由で放射線療法に対して本質的に感受性である。放射能標識抗体のイオン化放射線の局所放出は、抗原に結合した抗体の極めて近位に標的抗原（例えばCD20）を有するまたは有しない細胞を殺すことができ；透過性放射線は嵩張ったまたは血管形成の乏しい腫瘍中の抗体への接近の制限という問題を除去することができ；そして、必要とされる抗体の総量を減らすことができる。放射性核種は、細胞修復機構が細胞を生存させておくことができない箇所に環状DNAに損傷を与えることができる放射性粒子を発生する。従って、標的が腫瘍ならば、放射能標識は腫瘍細胞を有利に殺傷する。放射能標識抗体は、定義によれば、患者（即ち可能な骨髄移植）と健全な提供者（即ち放射能で処理する時に高度の注意を払う必要性）の両方に対して用心する必要性がある放射性物質の使用を含む。

【0010】

従って、B細胞障害の治療に効果的であるマウスモノクローナル抗体の能力を改善するアプローチは、放射能標識または毒素が腫瘍部位に局在化されるように標識または毒素を抗体に接合させることであった。例えば、上述の1F5抗体はヨウ素131（ $^{131}\text{I}$ ）で「標識」され、そして伝えられるところによれば2人の患者で生体内分布について評価された。Eary, J.F.ら、"Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma" *J. Nuc. Med.* 31/8:1257-1268 (1990) を参照のこと。

【0011】

また Press, O.W.ら、"Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radio labeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody" *J. Clin. Onc.* 7/8:1027-1038 (1989) ( $^{131}\text{I}$  標識 IF-5で治療した1人の患者が「部分応答」を達成したことを指摘している)；Goldenberg, D.M.ら、"Targeting, Dosi-metry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody" *J. Clin. Onc.* 9/4:548-564 (1991) (

10

20

30

40

50

複数回注射を受けた 8 人の患者のうちの 3 人が HAMA 応答を発生したことを報告している) ; Appelbaum, F.R. "Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma" Hem./Onc. Clinics of N.A. 5/5:1013-1025 (1991) (総説文献) ; Press, O.W. ら, "Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support." New England Journal of Medicine 329/17:1219-1223 (1993) (ヨウ素131-標識抗CD20抗体IF5 およびB1) およびKaminski, M.G. ら "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with [<sup>131</sup>I] Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody" NEJM 329/7 (1993) (ヨウ素131-標識抗CD20抗体B1 ; 以後"Kaminski"と称する) も参照のこと。

#### 【0012】

毒素(即ち、ドキシソルピシンやミトマイシンCのような化学療法剤)も抗体に接合されている。例えば、PCT出願公開WO 92/07466 (1992年5月14日公開)を参照のこと。

「接合」抗体の代わりとして、「キメラ」抗体、即ち2以上の異なる種(例えばマウスとヒト)からの部分を含んで成る抗体が開発されている。例えば、Liu, A.Y. ら, "Production of a Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity" J. Immun. 139/10:3521-3526 (1987) は、CD20抗原に対して向けられたマウス/ヒトキメラ抗体を記載している。PCT公報第WO 88/04936 号も参照のこと。しかしながら、B細胞障害の治療のためのそのようなキメラ抗体の能力、効力または実用性に関する情報は該文献中に全く与えられていない。

#### 【0013】

試験管内機能分析(例えば補体依存性細胞溶解("CDC") ; 抗体依存性細胞障害("ADCC")等)は、特異抗原を発現している標的細胞を破壊または涸渇させるキメラ抗体の生体内能力を本質的に予測することはできないと言及されている。例えば、Robinson, R.D. ら, "Chimeric mouse-human anti-carcinoma antibodies that mediated different anti-tumor cell biological activities", Hum. Anti-bod. Hybridomas 2:84-93 (1991) (検出不可能なADCC活性を有するキメラマウス-ヒト抗体)を参照のこと。従って、キメラ抗体の治療効力は生体内実験によってのみ正しく評価することができる。

必要とされ且つ大きな技術進歩になると思われるものは、霊長類(ヒトを含むがそれに限定されない)におけるB細胞リンパ腫の治療のためにCD20抗原をターゲティングする治療法である。

#### 【発明の開示】

#### 【0014】

B細胞障害、特にB細胞リンパ腫の治療用に考案された治療法が本明細書中に開示される。それらのプロトコールは、リンパ腫に関係するB細胞を含む末梢血B細胞の涸渇のための免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の投与 ; 局在化されそして末梢B細胞に関係づけられた腫瘍をターゲティングするための放射能標識抗CD20抗体の投与 ; および協同的療法(組合せ療法)におけるキメラ抗CD20抗体と放射能標識抗CD20抗体の投与に基づく。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0015】

一般的に、抗体は2つの軽鎖分子と2つの重鎖分子から構成される。それらの鎖は通常「Y」字形を形成し、軽鎖と重鎖の両方がYのアーム部分を形成し、重鎖がYのつけ根部分を形成している。軽鎖と重鎖は構造的および機能的相同性の領域(ドメイン)に分けられる。軽鎖の可変領域(「V<sub>L</sub>」)と重鎖の可変領域(「V<sub>H</sub>」)は認識と特異性を決定する。軽鎖の定常領域(「C<sub>L</sub>」)と重鎖の定常領域(「C<sub>H</sub>」)は重要な生物学的性質、例えば抗体鎖会合、分泌、経胎盤移動性、Fcレセプター結合補体結合等を付与する。抗体産生細胞における免疫グロブリン遺伝子発現をもたらす一連の現象は複雑である。

#### 【0016】

可変領域遺伝子配列は、「V<sub>H</sub>」, 「D」および「J<sub>H</sub>」、または「V<sub>L</sub>」および「J<sub>L</sub>」と呼ばれる別々の生殖細胞系列遺伝子セグメントの中に位置している。それらの遺伝子セグメントがDNA再配列により連結して、それぞれ重鎖および軽鎖中に現れる完全なV領域を形成する。次いで、再配列され連結されたVセグメント(V<sub>L</sub>-J<sub>L</sub> および V<sub>H</sub>

10

20

30

40

50

- D - J<sub>H</sub> ) が、それぞれ軽鎖および重鎖の完全な可変領域または抗原結合領域をコードする。

【 0 0 1 7 】

抗CD20マウスモノクローナル抗体 (1F5 ) を使ったヒト B 細胞リンパ腫の血清療法は Press らにより記載されている (69 Blood 584, 1987, 前掲)。この報告された療法応答は不運にも一時的であった。更に、報告によれば、試験した患者の25%が該血清療法に対してヒト抗マウス抗体 (HAMA) 応答を発生した。Press らは、毒素または放射性同位体に接合したそれらの抗体が未接合抗体よりも長く持続する臨床的利益を付与するかもしれないことを示唆している。

【 0 0 1 8 】

B 細胞リンパ腫の消耗性作用と、この病気に実行可能な治療法を提供するごく現実的な必要性のために、我々はアプローチ間を共通に結び付けるものとして特定の抗体2B8 を有する様々なアプローチに着手した。1つのそのようなアプローチは、末梢血 B 細胞を容易に且つ効率的に再生させる哺乳動物系の能力を有利に活用する。このアプローチを使って、我々は本質的に B 細胞リンパ腫を除去する手段として末梢血およびリンパ系組織中の B 細胞を追放または涸渇させようと試みる。特に免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の使用によりこれを達成する。別のアプローチでは、放射性標識による破壊のため腫瘍細胞をターゲティング (標的指向) しようと試みる。

【 0 0 1 9 】

本明細書中で使用する時、用語「抗CD20抗体」は、典型的にはヒト B リンパ球限定分化抗原Bp35と命名された、一般的にCD20と呼ばれる35,000ダルトンの細胞表面非グリコシル化リントタンパク質を特異的に認識する抗体である。本明細書中で使用する時、抗CD20抗体に関して使用する時の用語「キメラ」は、最も好ましくは組換えデオキシリボ核酸技術を使って誘導され、ヒト (免疫学的「親類」種、例えばチンパンジーを含む) 成分と非ヒト成分の両方を含んで成る抗体を包含する。キメラ抗体の定常領域は、最も好ましくは天然ヒト抗体の定常領域と実質的に同じであり；キメラ抗体の可変領域は、最も好ましくは非ヒト源に由来し、CD20細胞表面抗原に対する所望の抗原性と特異性を有する。

【 0 0 2 0 】

非ヒト源は、ヒトCD20細胞表面抗原またはヒトCD20細胞表面抗原を含んで成る物質に対する抗体を産生させるのに使うことができる任意の脊椎動物源であることができる。そのような非ヒト源としては、齧歯類 (例えばウサギ、ラット、マウス等) および非ヒト霊長類 (例えば類人猿、サル等) が挙げられるがそれらに限定されない。最も好ましくは、非ヒト成分 (可変領域) はマウス源に由来する。本明細書中で使用する時、キメラ抗CD20抗体に関して使用する時の「免疫学的に活性な」という語は、ヒトC1q を結合し、ヒト B リンパ系細胞系の補体依存性細胞溶解 ("CDC") を媒介し、且つ抗体依存性細胞障害 ("ADCC") を通してヒト標的細胞を溶解するキメラ抗体を意味する。

【 0 0 2 1 】

本明細書中で使用する時、「間接標識」および「間接標識アプローチ」という用語は共に、キレート化剤が抗体に共有結合的に取り付けられ、そして該キレート化剤中に少なくとも1つの放射性核種が挿入されることを意味する。好ましいキレート化剤および放射性核種は Srivagtava, S.C. および Mease, R.C., "Progress in Research on Ligands, Nuclides and Techniques for Labeling Monoclonal Antibodies," Nucl. Med. Bio. 18/6: 589-603 (1991) ("Srivagtava") 中に記載されている。

【 0 0 2 2 】

これは参考として本明細書中に組み込まれる。特に好ましいキレート化剤は 1 - イソチオシアネートベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 ("MX-DTPA") であり；間接標識に特に好ましい放射性核種としてはインジウム [111] とイットリウム [90] が挙げられる。本明細書中で使用する時、「直接標識」および「直接標識アプローチ」という用語は、放射性各種が抗体に共有結合的に直接取り付けられる (典型的にはアミノ酸残基によって) ことを意味する。好ましい放射性核種は "Srivagtava" 中に与えられている。

10

20

30

40

50

直接標識に特に好ましい放射性核種は、チロシン残基によって共有結合的に取り付けられるヨウ素[131]である。間接標識アプローチが特に好ましい。

【0023】

本明細書中に開示される治療方法は、末梢血B細胞を迅速に回復または再生させる霊長類の免疫系の能力に基づいている。その上、霊長類の主要な免疫応答はT細胞により誘発されるので、免疫系が末梢血B細胞欠損を有する時は、「特別な」用心（例えば患者の隔離など）の必要はない。霊長類の免疫系のそれらおよび他の繊細さの結果として、我々のB細胞障害の治療方法は、免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体を使った末梢血B細胞の浄化（purging）を考慮に入れている。

【0024】

末梢血B細胞障害は、定義上、治療目的で血液に接近する必要性があることを示し得るので、免疫学的に活性な抗CD20抗体と放射能標識抗CD20抗体の投与経路は好ましくは非経口である。本明細書中で使用する時、「非経口」なる用語は静脈内、筋内、皮下、直腸、膈内または腹腔内投与を包含する。それらのうち静脈内投与が最も好ましい。

【0025】

免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体と放射能標識抗CD20抗体は、典型的には、標準技術により、医薬上許容される緩衝液、例えば無菌塩類溶液、無菌緩衝化水、プロピレングリコール、前記のものとの組合せ、等の中に提供されるだろう。非経口投与可能な薬剤の調製方法はPharmaceutical Carriers & Formulations, Martin, Remington's Pharmaceutical Sciences, 第15版 (Mack Pub. Co., Easton, PA 1975)に記載されている。これは参考として本明細書中に組み込まれる。任意の与えられた患者において独特の治療効果を生じさせるのに有用である免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の特定の治療的有効量は、当業者に公知の標準技術により決定することができる。

【0026】

免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の有効量（即ち治療的有効量）は、約0.001 ~ 約30 mg/kg体重、より好ましくは約0.01 ~ 約25mg/kg体重、最も好ましくは約0.4 ~ 約20.0mg/kg体重の範囲である。他の用量も実行できる。用量に影響を及ぼす因子としては、病気の重度；前の治療方法；患者の全体的健康；存在する他の病気等が挙げられるがそれらに限定されない。当業者は、特定の患者を評価しそして前記範囲内に入る適当な用量、または必要ならば範囲の外側の用量を容易に決定することができると思う。

【0027】

それらの用量範囲での免疫学的に活性な抗CD20抗体の導入は、1回治療または一連の治療として行うことができる。キメラ抗体に関しては、そのような導入が一連の治療として実施されるのが好ましい。この好ましいアプローチは、この病気に関係する治療方法論に基づいている。何ら特定の理論に結び付けようとしなくても、免疫学的に活性な抗CD20抗体は免疫学的に活性であり且つCD20に結合するため、個体への免疫学的に活性な抗CD20抗体の初回導入と同時に、末梢血B細胞涸渇が始まるだろう。我々は、点滴注入治療後約24時間以内にほぼ完全なB細胞涸渇を観察した。

【0028】

このため、患者への免疫学的に活性な抗CD20抗体（または放射能標識抗CD20抗体）のその後の導入は、a)残っている末梢血B細胞を浄化する；b)リンパ節からのB細胞涸渇を開始する；c)他の組織源、例えば骨髄、腫瘍等からのB細胞涸渇を開始すると推定される。繰り返し言うと、免疫学的に活性な抗CD20抗体の反復導入を使うことにより、一連の現象が起こる。我々は、これらの各現象を病気の有効治療に重要と見なした。第一の「現象」は、主に患者の末梢血B細胞を実質的に涸渇させることを指令するものとして見なすことができ；次の現象は主に、同時にもしくは連続的に系から残りのB細胞を浄化し、リンパ節B細胞を浄化しまたは他の組織B細胞を浄化することを指令するものとして見なすことができる。

【0029】

実際には、1回投薬は有利であって病気治療/管理に効果的に利用することができるけ

10

20

30

40

50

れども、好ましい治療過程は数段階に渡り起こり、約2～10週間に渡り、最も好ましくは約4週間に渡り、1週間に1回、約0.4～約20mg/kg体重の免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体が患者に投与される。

#### 【0030】

放射能標識抗CD20抗体に関しては、該抗体は非キメラであるのが好ましい。この好ましさは、マウス抗体と比較するとキメラ抗体の循環半減期が有意に長いことに基づいている（即ち、循環半減期が長ければ、放射性核種が長期間に渡り患者内に存在する）。しかしながら、マウス抗体と比べてより低いミリキュリー（"mCi"）線量でキメラ抗体と組み合わせ使用することにより、放射性キメラ抗体を有利に使用することができる。この筋書きは、治療的効用を維持しながら、許容できるレベルへの骨髄毒性の減少を考慮に入れている。

10

#### 【0031】

本発明には様々な放射性核種が適用でき、当業者は様々な状況下でどの放射性核種が最も適当であるかを容易に決定する能力を有すると思われる。例えば、ヨウ素[131]は標的免疫療法に使われる公知の放射性核種である。しかしながら、ヨウ素[131]の臨床的有用性は次に挙げる幾つかの因子により制限され得る：8日の物理的半減期；血液中と腫瘍部位の両方におけるヨウ素化抗体の脱ハロゲン化；および腫瘍中への局在化された用量沈着にとって次善となり得る発光性質（例えば多量の成分）。優れたキレート化剤の出現により、金属キレート化基をタンパク質に取り付ける機会が、インジウム[131]やイットリウム[90]といった他の放射性核種を利用する機会を増加させた。

20

#### 【0032】

イットリウム[90]は、放射性免疫療法応用への利用に幾つかの利点を提供する。イットリウム[90]の64時間という半減期は腫瘍による抗体蓄積を可能にするのに十分長く、そして例えばヨウ素[131]と異なり、イットリウム[90]は100～1000細胞直径の組織の範囲で、その崩壊の間に全く付随の放射を伴わない高エネルギーの純粋な発射体である。更に、透過する放射線の最小線量はイットリウム[90]標識抗体の外来患者投与を考慮に入れる。また、細胞致死に標識抗体の介在を必要とせず、そしてイオン化放射線の局所放出が標的抗原を欠く近隣の腫瘍細胞にも致死性であるだろう。

#### 【0033】

イットリウム[90]に対する1つの非療法的制限は、それを使った画像診断を難しくする有意な線の欠如に基づく。この問題を回避するために、イットリウム[90]標識抗CD20の治療線量の投与前に腫瘍の位置と相対的大きさを決定するのに「画像診断用」放射性核種、例えばインジウム[111]を使うことができる。インジウム[111]は診断用放射性核種として特に好ましい。何故なら、約1～約10mCiの間は検出可能な毒性を伴わずに安全に投与することができ；そして画像診断データは一般にその後のイットリウム[90]標識抗体の分布を予測する。

30

#### 【0034】

大部分の画像診断研究は5 mCi インジウム[111]標識抗体を利用する。というのは、この線量は安全であり且つ低線量に比較して増大された画像診断効率を有するからである。この場合、最適な画像診断は抗体投与後3～6日目に行う。例えば、Murray, J.L., 26 J. Nuc. Med. 3328 (1985) およびCarraguiillo, J.A. ら, 26 J. Nuc. Med. 67 (1985) を参照のこと。

40

#### 【0035】

イットリウム[90]標識抗C20抗体の1回治療有効量（即ち治療的有效量）は約5～約75 mCi、より好ましくは約10～約40 mCiの範囲である。ヨウ素[131]標識抗C20抗体の非骨髄剥離的1回治療有効量は約5～約70 mCi、より好ましくは約5～約40 mCiの範囲である。ヨウ素[131]標識抗C20抗体の剥離的1回治療有効量（即ち、自系骨髄移植を必要とし得る）は約30～約600 mCi、より好ましくは約50～約500 mCi未満の範囲である。キメラ抗C20抗体と組み合わせた場合、マウス抗体に比較してより長い循環半減期のため、ヨウ素[131]標識キメラ抗C20抗体の非骨髄剥離的1回治療有効量は、約5～約40 mCi、より

50

好ましくは約30 mCi未満の範囲である。例えばインジウム[111] 標識の画像診断基準は、典型的には約5 mCi 未満である。

【0036】

放射能標識抗CD20 抗体に関しては、それを使った療法は1回療法処置または複数回処置を利用して行うことができる。放射性核種成分のため、治療前に、放射線から生じる潜在的に致死的な骨髄毒性を経験している患者については末梢幹細胞("PSC") または骨髄("BM")を「収穫」することが好ましい。標準技術を使ってBMおよび/またはPSC を収穫し、次いでパージし、そして可能な再注入のために凍結しておく。また、治療前に診断用標識抗体(例えばインジウム[111] を使ったもの)を使って患者に診断的線量計測研究を行うことが最も好ましい。その目的は、治療用標識抗体(例えばイットリウム[90]を使ったもの)がいずれかの正常な器官または組織において不必要に「濃縮」されたりしないことを保証することである。

10

【0037】

キメラマウス/ヒト抗体は記載されている。例えば、Morrison, S.L.ら、PNAS 11:6851-6854 (1984年11月); 欧州特許公開第173494号; Boulianne, G.L. ら、Nature 312:642 (1984年12月); Neubeiger, M.S. ら、Nature 314:268 (1985年3月); 欧州特許公開第125023号; Tan ら、J. Immunol. 135:8564 (1985年11月); Sun, L.K. ら、Hybridoma 5/1:517 (1986); Sahagan ら、J. Immunol. 137:1066-1074 (1986)を参照のこと。一般的には、Muron, Nature 312:597 (1984年12月); Dickson, Genetic Engineering News 5/3 (1985年3月); Marx, Science 229, 445 (1985年8月); およびMorrison, Science 229:1202-1207 (1985年9月)を参照のこと。

20

【0038】

Robinsonらは、PCT 公開番号第WO 88/04936 号において、ヒト定常領域とマウス可変領域を有し、CD20のエピトープに対して特異性を有するキメラ抗体を記載している。Robinson参考文献のキメラ抗体のマウス部分は2H7 マウスモノクローナル抗体に由来する(2b, )。この参考文献は記載のキメラ抗体がB細胞障害の治療に向けての「第一候補者」であることを記載しているが、特にこの参考文献は治療効能の断定を支持するデータを欠いており、また重要なことに、霊長類またはヒトといったより高等の哺乳動物を使ったデータも欠いているため、この記述は、この提言がこの特定抗体に的確であるかどうかを決定するための当業者への提言に過ぎないと見なすことができる。

30

【0039】

キメラ抗体を作製する方法論は当業者に利用可能である。例えば、別々のプラスミド中の免疫グロブリン軽鎖と免疫グロブリン重鎖を使って、軽鎖と重鎖を別々に発現させることができる。次いでそれらを精製し、試験管内で完全な抗体に構築することができる。そのような構築を達成するための方法論は記載されている。例えば、Scharff, M., Harvey Lectures 69:125 (1974)を参照のこと。

【0040】

還元され単離された軽鎖と重鎖からIgG 抗体を形成させるための試験管内反応パラメーターも記載されている。例えば、Beychok, S., Cells of Immunoglobulin Synthesis, Academic Press, New York, p. 69, 1979を参照のこと。完全なH<sub>2</sub>L<sub>2</sub> IgG抗体への重鎖と軽鎖の細胞内会合および連鎖を達成するために同一細胞中での軽鎖と重鎖の同時発現も可能である。そのような同時発現は、同一宿主細胞中で同一プラスミドまたは異なるプラスミドのいずれかを使って達成することができる。

40

【0041】

別のアプローチ、即ちキメラ非ヒト/ヒト抗CD20抗体を作製するための我々の最も好ましいアプローチであるものは、ヒト起源の重鎖および軽鎖定常領域をコードするDNAを最初から含有する発現ベクターの利用に基づく。そのようなベクターは、様々な非ヒト抗CD20抗体を生成し、分泌しそして種々の特性(例えば結合特異性の型、エピトープ結合領域等)について分析することができるように、非ヒト可変領域をコードするDNAの挿入を考慮に入れる。その後で、好ましいかまたは所望の抗CD20抗体からの軽鎖および重鎖可

50

変領域をコードする c D N A を該ベクター中に組み込むことができる。本発明者らはそれらの型のベクターを縦列式キメラ抗体発現 ("TCAE") ベクターと呼ぶ。

【 0 0 4 2 】

リンパ腫の治療処置のための免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体を生産するのに使用した最も好ましいTCAEベクターはTCAE 8である。TCAE 8は、本特許文書の譲渡人が所有するベクター (TCAE 5.2と命名) の誘導體であり、TCAE 5.2では優性選択可能マーカ (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ、"NEO") の翻訳開始部位が共通Kozak 配列であり、TCAE 8ではこの領域が部分的に損傷された共通Kozak 配列であるという点異なる。タンパク質発現に対するTCAEベクター ("ANEX ベクター" とも呼称される) の優性選択可能マーカ (ネオマイシンホスホトランスフェラーゼ) の開始部位の影響に関する詳細は、本出願と一緒に出願された同時係属出願の中に詳細に開示されている。

10

【 0 0 4 3 】

TCAE 8は4つの転写カセットを含んで成り、それらは縦列に置かれ、即ち可変領域を欠くヒト免疫グロブリン軽鎖；可変領域を欠くヒト免疫グロブリン重鎖；DHFR；およびNEOの順に置かれる。各転写カセットはそれ自身の真核プロモーターとポリアデニル化領域を含有する (TCAE 8ベクターの略図である図1を参照のこと)。詳しくは、

1) 免疫グロブリン重鎖の前のCMVプロモーター/エンハンサーは、-350位のNheI部位から-16位のSstI部位まで、軽鎖の前のプロモーター/エンハンサーの先端が切り取られた変形である (41 Cell, 521, 1985を参照のこと)。

【 0 0 4 4 】

2) ヒト免疫グロブリン軽鎖定常領域は、PCR反応によるcDNAの増幅によって誘導された。TCAE 8では、これはヒト免疫グロブリン軽鎖 定常領域 [Kabat 番号付け法でアミノ酸108-214、アロタイプKm3 (Kabat, E.A. "Sequences of proteins of immunological interest," NIH Publication, 第5版, No.91-3242, 1991を参照のこと)] およびヒト免疫グロブリン重鎖 1定常領域 [Kabat 番号付け法でアミノ酸114-478、アロタイプGmla, Gmlz] であった。

20

【 0 0 4 5 】

軽鎖は正常ヒト血液 (IDEC Pharmaceuticals Corporation, La Jolla, CA) から単離され；そこから得たRNAを使ってcDNAを合成し、次いでPCR技術を使ってcDNAを増幅させた (Kabat からの共通配列に関してプライマーを誘導した)。ヒトIgG1ベクター (3 Prot. Eng. 531, 1990；ベクターpN<sub>1</sub>62) によりトランスフェクトされた細胞から誘導されたRNAから調製したcDNAから重鎖を単離した (PCR技術を使って)。Kabat からの共通アミノ酸配列と一致させるために、単離されたヒトIgG1中の2つのアミノ酸が変更され、即ち、アミノ酸225がバリンからアラニンに (GTT からGCA に) 変更され、そしてアミノ酸287がメチオニンからリジンに (ATG からAAG に) 変更された。

30

【 0 0 4 6 】

3) ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖カセットは、免疫グロブリン鎖の分泌のために合成シグナル配列を含有する。

4) ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖カセットは、転写解読枠を維持し且つ免疫グロブリン鎖の中に通常見つかるアミノ酸を変更しないような軽鎖および重鎖免疫グロブリン可変領域の挿入を考慮した特定のDNA制限部位を含有する。

40

【 0 0 4 7 】

5) DHFRカセットは、それ自身の真核プロモーター (マウス - グロビン主要プロモーター、"BETA") とポリアデニル化領域 (ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域、"BGH") を含んだ。

6) NEO カセットは、それ自身の真核プロモーター (BETA) とポリアデニル化領域 (SV40初期ポリアデニル化領域、"SV") を含んだ。

TCAE 8ベクターとNEO カセットに関しては、Kozak 領域は部分的に損傷された共通Kozak 配列 (上流のClaI部位を含む) であった：

【 0 0 4 8 】

50

## 【化1】

Cla I -3 +1

GGGAGCTTGG ATCGAT ccTct ATG Gtt

(TCAE 5.2ベクターでは、Cla I とATG 領域の間に変更がある、即ちccAcc )。

## 【0049】

TCAE 8の完全な配列表(4つの転写カセットの特定成分を含む)は図2~図11に与えられる(配列番号1)。

10

当業者により認識されるように、TCAEベクターは、免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体を生産させる上で実質的に時間を削減することを考慮に入れる。非ヒト軽鎖および重鎖可変領域の調製と単離、次いでそれらをヒト軽鎖定常転写カセットとヒト重鎖定常転写カセット中に組み込むことは、免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の生産に備える。

## 【0050】

本発明者らは、マウス源とハイブリドーマ技術を使って、CD20抗原に対する特異性を有する最も好ましい非ヒト可変領域を誘導した。ポリメラーゼ連鎖反応(「PCR」)技術を使って、マウス軽鎖および重鎖可変領域を直接TCAE 8ベクター中にクローニングした。これはTCAEベクター中への非ヒト可変領域の組み込みのための最も好ましいルートである。この好ましさは主として、PCR反応の効率と挿入の精度に基づいている。しかしながら、この作業を達成する他の同等の手順も利用可能である。例えば、TCAE 8(または同等のベクター)を使って、非ヒト抗CD20抗体の可変領域の配列を得、次いで該配列の一部、または適当ならば全配列のオリゴヌクレオチド合成を行い、その後で、該部分または全合成配列をベクター中の適当な位置に挿入することができる。当業者はこの作業を達成する能力を有すると思う。

20

## 【0051】

我々の最も好ましい免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体は、CD20に対するモノクローナル抗体から誘導したマウス可変領域を含むTCAE 8ベクターの使用により誘導した。この抗体(下記に詳細に記載する)は"2B8"と称する。TCAE 8中の2B8から得られた可変領域の完全配列("TCAE 8中の抗CD20")は図12~21に記載される(配列番号2)。

30

## 【0052】

タンパク質発現に使う宿主細胞系は、最も好ましくは哺乳動物起源のものである。当業者は其中で発現させようとする所望の遺伝子産物に最も適する特定の宿主細胞系を優先的に決定する能力を有すると思われる。典型的な宿主細胞系としては、DG44とDUXB11(チャイニーズハムスター卵巣細胞系、DHFR<sup>-</sup>)、HELA(ヒト頸部癌)、CV1(サル腎臓系)、COS(SV40T抗原を有するCV1の誘導体)、R1610(チャイニーズハムスター繊維芽細胞)、BALBC/3T3(マウス繊維芽細胞)、HAK(ハムスター腎臓系)、SP2/0(マウスミエローム)、P3x63-Ag3.653(マウスミエローム)、BFA-1c1BPT(ウシ内皮細胞)、RAJI(ヒトリンパ球)および293(ヒト腎臓)が挙げられるがそれらに限定されない。宿主細胞系は典型的には商業施設から、the American Tissue Culture Collectionからまたは発表された文献から入手することができる。

40

## 【0053】

好ましくは、宿主細胞系はDG44("CHO")かSP2/0のいずれかである。Urland, G.ら、"Effect of gamma rays and the dihydroforate reductase locus: deletions and inversions." Som. Cell & Mol.Gen. 12/6:555-566 (1986)およびSchulman, M.ら、"A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies." Nature 276:269 (1977)をそれぞれ参照のこと。最も好ましくは、宿主細胞系はDG44である。

## 【0054】

宿主細胞中へのプラスミドのトランスフェクションは、当業界で利用可能な任意の技術

50

を使って達成することができる。それらとしては、トランスフェクション（電気泳動およびエレクトロポレーションを含む）、エンベロープDNAを使った細胞融合、マイクロインジェクション、およびそのままのウイルスによる感染が挙げられるがそれに限定されない。Ridgway, A.A. G., "Mammalian Expression Vectors." 第24.2章, 470-472 頁, Vectors, RodriguesおよびDenhardt編 (Butterworths, Boston, MA1988) を参照のこと。最も好ましいのは、エレクトロポレーションによる宿主中へのプラスミド導入である。

【実施例】

【0055】

次の実施例は、本発明を限定するつもりではなく、また本発明を限定すると解釈してはならない。それらの実施例は、放射能標識抗CD20抗体 ("I2B8") ; 放射能標識抗CD20抗体 ("Y2B8") ; および特定ベクター ("TCAE 8") とマウス抗CD20モノクローナル抗体 ("2B8") 由来の可変領域を使って誘導された免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体 ("C2B8")、を使った用量イメージングを証明するつもりである。

10

【0056】

I . 放射能標識抗CD20抗体 2B8

A . 抗CD20モノクローナル抗体 (マウス) 産生 ("2B8")

BALB/Cマウスを3~4カ月の期間に渡る毎週の注射によりヒトリンパ芽球様細胞系SB (Adams, R.A. ら, "Direct implantation and serial transplantation of human acute lymphoblastic leukemia in hamsters, SB-2." Can. Res. 28:1121-1125 (1968) を参照のこと ; この細胞系はATCC受入れ番号ATCC CCL 120のもとにthe American Tissue Culture Collection, Rockville, MD. から入手可能である) で繰り返し免疫処置した。

20

【0057】

既知のCD20特異抗体の阻害により測定した時に抗CD20抗体 (使用した抗CD20抗体は、Leu 16, Beckton Dickinson, San Jose, CA, カタログNo.7670 ; およびB1, Coulter Corp., Hialeah, FL, カタログNo.6602201であった) の高血清力価を証明するマウスを同定した。次いでそのようなマウスの脾臓を切除した。Einfeld, D.A. ら (1988) EMBO 7:711に記載されたプロトコールに従って脾臓細胞をマウスミエローマSP2/0 と融合させた (SP2/0 はATCC受入れ番号ATCC CRL 8006 を有する)。

【0058】

CD20特異性についてのアッセイはラジオイムノアッセイにより行われた。簡単に言えば、Valentine, M.A. ら (1989) J. Biol. Chem. 264:11282 に記載されたようなヨードピーズ法により、精製した抗CD20 B1 を<sup>125</sup>I で放射能標識した。( <sup>125</sup>I - ヨウ化ナトリウム, ICN, Irvine, CA, カタログNo.28665H )。各々の融合ウエルからの培地0.05mlを、1% BSA, PBS (pH 7.4)中の<sup>125</sup>I 標識抗CD20 B1 (10 ng) 0.05mlおよび100,000 個のSB細胞を含む同緩衝液 0.05 mlと一緒にインキュベーションすることにより、ハイブリドーマをスクリーニングした。

30

【0059】

室温で1時間インキュベーションした後、96ウエルのタイタープレート (V&P Scientific, San Diego, CA) に移すことにより細胞を収集し、徹底的に洗浄した。未標識抗CD20 B1 を含有する複製ウエルと阻害抗体を全く含まないウエルを、それぞれ正の対照と負の対照として使用した。50%阻害以上を含有するウエルを増殖させ、クローニングした。クローニングした細胞系から最大阻害を示す抗体が誘導され、これを"2B8" と命名した。

40

【0060】

B . MX-DTPA 接合体の調製

i . MX-DTPA

<sup>14</sup>C で標識された1 - イソチオシアネートベンジル - 3 - メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸 (" <sup>14</sup>C 標識MX-DTPA") を2B8 への放射能標識の接合のためのキレート化剤として使用した。無金属条件を維持するためにMX-DTPA の操作を行った。即ち、無金属試薬を使用し、そして可能な時には、Alconox で洗浄しMilli-Q 水で濯いだポリプロピレン製プラスチック容器 (フラスコ、ビーカー、メスシリンダー、ピペットチップ) を同様に使

50

用した。MX-DTPA をOtto Gansow 博士 (National Institute of Health, Bethesda, MD) から乾燥固体形態として入手し、4 で乾燥保存した (遮光下で)。Milli-Q 水中に2 ~ 5 mMの濃度の原液を調製し、-70 で保存した。MX-DTPA は水中の二ナトリウム塩として Coulter Immunology (Hialeah, Florida) から得られ、これを -70 で保存した。

#### 【0061】

##### ii . 2B8 の調製

CENTRICON 30™ スピンドフィルター (30,000D, MWCO; Amicon) を使った繰り返し緩衝液交換を利用して、150mM NaClを含む無金属の50mMバイシン - NaOH, pH 8.6中に2B8 抗体を移すことにより、MX-DTPA との接合用の精製2B8 を調製した。一般に、該フィルター装置に50~200 µlのタンパク質 (10mg/ml) を加え、次いで2mlのバイシン緩衝液を加えた。Sorval SS-34ローター中で4 で該フィルターを遠心した (6,000 rpm, 45分)。滞留液容量は約50~100 µlであった。同フィルターを使ってこの工程を2回繰り返した。滞留液をポリプロピレン製1.5 mlスクリーキャップ付試験管に移し、タンパク質について分析し、10.0mg/mlに希釈し、使用まで4 で保存した。上述のプロトコールを使って同様に該タンパク質を150mM NaClと0.05%アジ化ナトリウムを含む50mMクエン酸ナトリウム, pH 5.5中に移した。

10

#### 【0062】

##### iii . 2B8 とMX-DTPA の接合

2B8 とMX-DTPA の接合は、周囲温度でポリプロピレン試験管中で実施した。凍結したMX-DTPA 原液を使用直前に解凍した。10mg/mlのタンパク質50~200 mlを、4 : 1のMX-DTPA A : 2B8 のモル比においてMX-DTPA と反応させた。MX-DTPA 原液を添加しそして穏やかに混合することにより反応を開始した。接合は周囲温度で一晩 (14~20時間) 進行させておいた。実施例 I . B . ii . において上述したような0.05%アジ化ナトリウムを含む無金属生理的食塩水 (0.9 %w/v) 中への透析または反復限外濾過により、接合体から未反応のMX-DTPA を除去した。タンパク質濃度を10mg/mlに調整し、放射能標識するまでポリプロピレン試験管中に4 で保存した。

20

#### 【0063】

##### iv . MX-DTPA 取り込みの測定

シンチレーションカウンティングしそして精製接合体を使って得られた値を炭素 [14] 標識MX-DTPA の比活性と比較することにより、MX-DTPA の取り込みを測定した。非放射性MX-DTPA (Coulter Immunology) を使用した幾つかの研究には、該接合体を既知濃度と既知比活性のイットリウム [90] の過剰の放射性担体溶液と共にインキュベートすることにより、MX-DTPA 取り込みを評価した。

30

#### 【0064】

既知濃度の塩化イットリウムの原液を無金属の0.05 N HCl中に調製し、そこに無担体のイットリウム [90] (塩化物塩) を加えた。この溶液のアリコート液体シンチレーションカウンティングにより分析し、この試薬の正確な比活性を決定した。抗体に結合させようとするキレートのモル数の3倍に等しい塩化イットリウム試薬の量 (典型的には2モル/モル抗体) をポリプロピレン試験管に加え、2 M酢酸ナトリウムでpHを4.0-4.5 に調整した。次いで接合抗体を加え、混合物を周囲温度で15~30分間インキュベートした。20mM EDTAを1 mMの最終濃度に加えることにより反応を失活させ、そして2 M酢酸ナトリウムを使って溶液のpHを約pH 6に調整した。

40

#### 【0065】

5分間のインキュベーション後、全容量を高性能サイズ排除クロマトグラフィー (後述) により精製した。溶出されたタンパク質含有画分を合わせ、タンパク質濃度を測定し、そしてアリコートを放射能についてアッセイした。塩化イットリウム [90] 調製物の比活性とタンパク質濃度を使ってキレートの取り込みを算出した。

#### 【0066】

##### v . 2B8-MX-DTPA の免疫反応性

全細胞ELISA を使って接合2B8 の免疫反応性を評価した。対数期中期のSB細胞を遠心に

50

より培養物から取得し、1 × HBSSで2回洗浄した。細胞をHBSS中1 ~ 2 × 10<sup>6</sup> 細胞/mlに希釈し、50,000 ~ 100,000 細胞/ウエルになるように96ウエルのポリスチレンマイクロタイタープレート中にアリコートに分けた。プレートを40 ~ 45 °Cにて2時間真空乾燥して細胞をプラスチックに固定させた。使用するまで該プレートを-20 °Cで保存した。アッセイ用に、使用直前にプレートを周囲温度に温め、次いで1% BSAを含有する1 × PBS, pH 7.2-7.4でブロックした(2時間)。アッセイ用試料を1 × PBS / 1% BSA中に希釈し、プレートに添加し、同緩衝液中に系列希釈(1 : 2)した。

【0067】

プレートを周囲温度で1時間インキュベートした後、1 × PBSで3回プレートを洗浄した。二次抗体(ヤギ抗マウスIgG1特異的HRP接合体、50 μl)をウエルに添加し(1 × PBS / 1% BSA中1 : 1500希釈液)、そして周囲温度で1時間インキュベートした。プレートを1 × PBSで4回洗浄した後、ABTS基質溶液(0.01% ATBSと0.001% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含有する50mMクエン酸ナトリウム、pH 4.5)を加えた。15 ~ 30分間インキュベーション後、プレートを405 nmで読んだ。非特異的結合をモニタリングするために抗原陰性HSB細胞をアッセイに含めた。吸光度値を各希釈率に対してプロットし、そして同一プレート上で試験した未変性抗体から得られた値(100%免疫反応性を意味する)と比較することにより、該接合体の免疫反応性を計算した。滴定プロファイルの直線部分上にある数個の値を比較し、平均値を決定した。

【0068】

vi. インジウム[111] 標識2B8-MX-DTPA ("I2B8")の調製

無担体インジウム[111]を使って接合体を放射能標識した。0.05M HCl中の同位体のアリコート(0.1 ~ 2 mCi / mg抗体)をポリプロピレン試験管に移し、約1/10容の無金属2M HClを加えた。5分間インキュベーション後、無金属2M酢酸ナトリウムを加え、該溶液をpH 4.0-4.4に調整した。生理的食塩水中、または0.05%アジ化ナトリウムを含む50mMクエン酸ナトリウム / 150mM NaCl中の10.0mg/ml DTPA原液から約0.5 mgの2B8-MX-DTPAを加え、次いで該溶液を即座に穏やかに混合した。pH試験紙で溶液のpHを調べ、4.0 ~ 4.5の値であることを確認し、該混合物を周囲温度で15 ~ 30分間インキュベートした。次いで、20mM EDTAを1 mMの最終濃度になるように加えることにより反応を失活させ、2M酢酸ナトリウムを使って反応混合物を約pH 6.0に調整した。

【0069】

5 ~ 10分間のインキュベーション後、結合しなかった放射性同位体をサイズ排除クロマトグラフィーにより除去した。HPLC装置は、それぞれWaters U6KまたはRheodyne 700注入弁を備えたWaters Model 6000またはTosoHaas Model TSK-6110 溶媒供給システムから成った。クロマトグラフィー分離は、ゲル浸透カラム(BioRad SEC-250; 7.5 × 300 mmまたは同等のTosoHaasカラム)とSEC-250 ガードカラム(7.5 × 100 mm)を使って実施した。このシステムに、フラクションコレクター(Pharmacia Frac200)および280 nmフィルターを取り付けたUVモニター(Pharmacia model UV-1)を装備した。試料を適用し、1 × PBS, pH 7.4を使って1.0 ml/分の流速で溶離させた。1/2 ml画分をガラス試験管中に収集し、それらのアリコートをカウンター中でカウントした。上下の窓をそれぞれ100 と500 KeVに設定した。

【0070】

溶出したタンパク質ピークに関連する放射能を加算し、そしてこの数をカラムから溶出された全放射能で割ることにより、放射能取り込みを算出した。次いでこの値を百分率(%)として表した(データは示してない)。或る場合には、即席薄層クロマトグラフィー("ITLC")を使って放射能取り込みを測定した。放射能標識接合体を1 × PBS中または1 × PBS / 1mM DTPA中に1:10または1:20希釈し、次いで1 μlをITLC SG紙の1 × 5 cm片の一端から1.5 cmのところスポットした。この紙をメタノール:水(1:1, v/v)中の10%酢酸アンモニウムを使った上昇クロマトグラフィーにより展開した。紙片を乾燥し、横に半分に切り、カウンティングにより各部分に結合した放射能を測定した。紙片の下半分に結合した放射能(タンパク質結合放射能)を、上半分と下半分の両方の値を加算するこ

10

20

30

40

50

とにより決定された全放射能の百分率として表した（データは示してない）。

【0071】

放射能標識接合体の適当なアリコートの放射能を測定することにより、比活性を決定した。この値をカウンター効率（典型的には75%）について補正し、280 nmでの吸光度により前に決定された該接合体のタンパク質濃度と関連させ、得られた値をmCi / mgタンパク質として表した。

ある実験では、上述のものと同様であるがHPLCによる精製を実施しないプロトコールに従って、2B8-MX-DTPA をインジウム[111] で放射能標識した。これを「ミックス&シュート」プロトコールと名付けた。

【0072】

vii . イットリウム[90] 標識2B8-MX-DTPA ("Y2B8") の調製

2 ng HClを使用しないこと以外、I2B8の調製について記載したのと同じプロトコールに従ってイットリウム[90] 標識2B8-MX-DTPA ("Y2B8")を調製した。イットリウム標識接合体の全調製物は上述のものと同じサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。

【0073】

C . 非ヒト動物実験

i . 放射能標識2B8-MX-DTPA の生体内分布

I2B8を6～8週齢のBALB/cマウスにおいて組織分布について評価した。上述の「ミックス&シュート」プロトコールに従って臨床用2B8-MX-DTPA を使って放射能標識接合体を調製した。該接合体の比活性は2.3 mCi / mgであり、該接合体を50mg / ml HSAを含むPBS, pH 7.4 中に配合した。

【0074】

マウスに100  $\mu$  l のI2B8（約21  $\mu$  Ci）を静注し、3匹のマウスのグループを0, 24, 48 および72時間目に頸部脱臼により犠牲にした。犠牲後、尾、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉および大腿を取り出し、洗浄し、重さを量った。分析のため血液試料も採取した。各標本に結合した放射能をガンマカウンティングにより測定し、次いで組織1 gあたりの%注入線量を決定した。個々の器官に付随する血液により与えられる活性寄与を割り引く試みは行わなかった。

【0075】

別のプロトコールでは、4 と30 で10週間インキュベートした2B8-MX-DTPA のアリコートを両調製物について2.1 mCi / mgの比活性になるようにインジウム[111] で放射能標識した。次いでそれらの接合体を上述と同じマウスでの生体内分布実験に使用した。

線量計測のため、2B8-MX-DTPA を2.3 mCi / mgの比活性になるようにインジウム[111] で放射能標識し、そして約1.1  $\mu$  Ciを20匹のBALB/cマウスの各々に注射した。次いで、各々5匹のマウスから成るグループを1, 24, 48 および72時間目に犠牲にし、それらの器官を取り出し、分析用に調製した。加えて、皮膚、筋肉および骨の一部を取り出し、分析用に処理し、尿と糞便も収集し、24～74時間の時点で分析した。

【0076】

同様のアプローチを使って2B8-MX-DTPA をイットリウム[90]でも放射能標識し、その生体内分布を72時間に渡りBALB/cマウスにおいて評価した。HPLCサイズ排除クロマトグラフィーによる精製の後、各々5匹のマウスから成るグループに臨床用に配合した約1  $\mu$  Ciの接合体（比活性：12.2 mCi / mg）を静注し、次いで1, 24, 48 および72時間目にマウスを犠牲にし、それらの器官と組織を上述の如く分析した。シンチレーションカウンターを使って制動放射エネルギーを測定することにより、各組織標本に結合した放射能を決定した。次いで活性値を%注入線量 / g 組織としてまたは%注入線量 / 器官として表した。器官または他の組織を繰り返すすいで血液を除去したが、器官に灌流は行わなかった。よって、内部に付随した血液により与えられる活性寄与について器官活性値を割り引かなかった。

【0077】

ii . I2B8の腫瘍局在化

放射能標識2B8-MX-DTPA の局在化は、ラモスB細胞腫を有する無胸腺症マウスにおいて測定した。6～8週齢の無胸腺症マウスに、無胸腺症マウス中での増殖用に前に順応させておいた $1.2 \times 10^7$ 個のラモスB細胞腫を含む0.1 mlのRPMI-1640を皮下注射（左後方側腹部）した。腫瘍は2週間以内に出現し、0.07～1.1グラムの重さに及んだ。マウスに100  $\mu$ lのインジウム[111] 標識2B8-MX-DTPA（16.7  $\mu$ Ci）を静注し、0、24、48および72時間目に頸部脱臼により3匹のマウスのグループを犠牲にした。犠牲後、尾、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、大腿および腫瘍を取り出し、洗浄し、重さを量った。分析用に血液試料も採取した。各標本に結合した放射能をカウンティングにより測定し、%注入線量/g組織を測定した。

【0078】

10

iii . 放射能標識2B8-MX-DTPA を使った生体内分布および腫瘍局在化実験

上述した予備的生体内分布実験（実施例I. B. viii. a.）に従って、接合2B8をインジウム[111]で2.3 mCi /mgの比活性に放射能標識し、およそ1.1  $\mu$ Ciを20匹のBALB/cマウスの各々に注射して放射能標識物質の生体内分布を調べた。続いて、各々5匹から成るグループを1、24、48および72時間目に犠牲にし、それらの器官と皮膚、筋肉および骨の一部を取り出し、分析用に処理した。加えて、尿と糞便も収集し、24～72時間の時点に渡り分析した。

【0079】

血液中の放射能レベルは、1時間目の40.3%の注入線量/gから72時間目には18.9%へと低下した（データは示していない）。心臓、腎臓、筋肉および脾臓の値は実験の間0.7～9.8%の範囲にとどまった。肺に検出される放射能のレベルは、1時間目の14.2%から72時間目に7.6%に減少し；同様に、それぞれの肺の注入線量/gの値は10.3%と9.9%であった。それらのデータは、後述する12B8の放射線吸収線量推定値を決定する際に使用した。

20

【0080】

12.2 mCi /mg抗体の比活性を有するイットリウム[90]標識抗体の生体内分布をBALB/cマウスにおいて評価した。>90%の放射能取り込みが得られ、放射能標識抗体をHPLCにより精製した。放射能の組織沈着を主要器官並びに皮膚、骨および尿と糞便において72時間に渡り評価し、そして%注入線量/g組織として表した。

【0081】

30

結果（示していない）は、血液に関係する放射能レベルが1時間目の約39.2%注入線量/gから72時間後はほぼ15.4%に低下し、一方で尾、心臓、肝臓、筋肉および脾臓に関係する放射能は実験の間10.2%またはそれ未満でまったく一定のままであった。重要なことには、骨に関係する放射能は1時間目の4.4%の注入線量/g骨から72時間目の3.2%までに及んだ。それらの結果を合わせると、該接合体に結合した遊離のイットリウムがほとんどなかったこと、そして遊離の放射性金属がほとんど実験の間に放出されなかったことを示唆する。それらのデータは、後述するY2B8の放射線吸収線量推定値を決定する際に使用した。

【0082】

40

腫瘍局在化実験のため、2B8-MX-DTPAを調製し、インジウム[111]で2.7 mCi/mgの比活性に放射能標識した。100  $\mu$ lの標識接合体（約24  $\mu$ Ci）を、ラモスB細胞腫を有する12匹の無胸腺症マウスの各々に注射した。腫瘍は0.1～1.0グラムの範囲であった。注射後0、24、48および72時間目の時点で眼窩後方穿刺により50  $\mu$ lの血液を採取し、そして尾、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓、筋肉、大腿および腫瘍を取り出した。組織を処理して重さを量った後、各組織標本に結合した放射能をカウンターにより測定し、gあたりの%注入線量として表した。

【0083】

結果（示していない）は、 $^{111}\text{In}$ -2B8-MX-DTPAの腫瘍濃度が実験の進行の間中一様に増加することを証明した。注入線量の13%が72時間後に腫瘍に蓄積された。対比して、血液レベルは、0時での30%から72時間目の13%へと実験の間に低下した。他の全ての組織（筋

50

肉を除く)は、実験の終了までに1.3 ~ 6.0 % 注入線量 / g 組織を含んだ。筋肉組織は約13% 注入線量 / g を含んだ。

【 0 0 8 4 】

#### D . ヒト実験

##### i . 2B8 と2B8-MX-DTPA : ヒト組織を使った免疫組織学的研究

アセトンで固定した32の異なるヒト組織のパネルを使ってマウスモノクローナル抗体 2B8の組織反応性を評価した。抗体2B8 は、非常に限定された組織分布パターンを有した抗CD20抗原と反応する。該抗原は、造血起源のものを含むリンパ系組織中の細胞のサブセットにおいてのみ観察される。

【 0 0 8 5 】

リンパ節では、免疫反応性は皮質性成熟Bリンパ球集団と、胚中心の増殖細胞において観察された。末梢血、扁桃のB細胞領域、脾臓の白色脾髄、および胸腺中に見つかる髄質リンパ球の40~70%で陽性の反応性が観察された。陽性の反応性は大腸の粘膜固有層のリンパ小節(パイアー斑)においても認められた。最後に、膀胱、乳房、頸、食道、肺、耳下腺、前立腺、小腸および胃を含む種々の器官の支質中の集合または散在リンパ系細胞も、抗体2B8 に陽性であった(データは示していない)。

【 0 0 8 6 】

全ての単純な上皮細胞、並びに種々の器官の重層上皮および上皮は、非反応性であることがわかった。同様に、大脳、脊髄および末梢神経中のものを含む神経外胚葉細胞では全く反応性が観察されなかった。間葉要素、例えば骨格筋および平滑筋細胞、繊維芽細胞、内皮細胞、並びに多形核炎症細胞も陰性であることがわかった(データは示していない)。

【 0 0 8 7 】

アセトンで固定されている16のヒト組織のパネルを使って2B8-MX-DTPA 接合体の組織反応性を評価した。未接合抗体を使って前に証明されたように(データは示していない)、2B8-MX-DTPA 接合体は、高度に限定された分布パターンを示しリンパ系起源の細胞のサブセットの上のみ見つかるCD20抗原を認識する。リンパ節では、B細胞集団に免疫反応性が観察された。脾臓の白色脾髄と胸腺の髄質リンパ球において強い反応性が観察された。膀胱、心臓、大腸、肝臓、肺および子宮中の散在リンパ球においても免疫反応性が観察され、これはそれらの組織中にある炎症細胞の存在に起因するものであった。未接合抗体と同様に、神経外胚葉細胞または間葉要素では全く反応性が観察されなかった(データは示していない)。

【 0 0 8 8 】

##### ii . 12B8 (画像診断) およびY2B8 (治療) の臨床分析

###### a . 第I / II相臨床実験 : 単一線量療法研究

12B8 (画像診断) の第I / II相臨床分析に続くY2B8の単一治療線量での処置を目下実施している。単一線量研究では、次のスキームに従う :

- 1 . 灌流による末梢幹細胞(PSC) または骨髄(BM)の取得 ;
  - 2 . 12B8画像診断 ;
  - 3 . Y2B8治療 ( 3つの線量レベル ) ; および
  - 4 . PSC または自己BM移植 ( 必要なら、連続3日間の500 / mm<sup>3</sup> 以下の絶体好中球数または20,000 / mm<sup>3</sup> 以下の血小板数に基づいて、骨髄検査に関する骨髄回収の証拠なしで )
- Y2B8の線量レベルは次の通りである :

【 0 0 8 9 】

10

20

30

40

【表 1】

表 1

線量レベル	線量 (mCi)
1	20
2	30
3	40

10

最大耐容線量 ("MTD") の決定のため上記線量レベルの各々で 3 人の患者を処置する。

## 【 0 0 9 0 】

画像診断 (線量計測) 実験を次の通り実施する: 各患者を、2 通りの I2B8 を使った生体内分布実験に含める。第一の実験では、2 mg の I2B8 (5mCi) を 1 時間に渡り点滴静注 (i.v.) として投与し、1 週間後に 2B8 (即ち未接合抗体) を 250 mg / 時間を越えない速度で i.v. により投与し、その後すぐに 2 mg の I2B8 (5 mCi) を 1 時間に渡り i.v. により投与した。両実験とも、I2B8 点滴静注後すぐに、各患者を画像診断し、画像診断を t = 14 ~ 18 時間 (指摘した場合); t = 24 時間; t = 72 時間; および t = 92 時間 (指摘した場合) の時点で繰り返した。インジウム [111] 標識についての全身平均保持時間を測定した。そのような測定を識別可能な器官または腫瘍病巣 (「着目領域」) についてもおこなった。

20

## 【 0 0 9 1 】

着目領域を該標識の全身濃度と比較する; この比較に基づいて、標準プロトコールを使って Y2B8 の局在化と濃度の推定値を決定することができる。Y2B8 の推定蓄積線量が推定全身線量の 8 倍より大きければ、または肝臓の推定蓄積線量が 1500 cGy を越えるならば、Y2B8 を使った治療は行うべきでない。

画像診断実験が許容できれば、0.0 または 1.0 mg / kg 患者体重の 2B8 を点滴静注により 250 mg / 時間を越えない速度で投与する。この後、Y2B8 (10, 20 または 40 mCi) を 20 mCi / 時間の点滴静注速度で投与する。

30

## 【 0 0 9 2 】

## b. 第 I / II 相臨床実験: 複数線量療法実験

Y2B8 の第 I / II 相臨床分析を現在実施している。複数線量研究の場合、次のスキームに従っている:

1. PSC または BM の取得;
2. I2B8 画像診断
3. 4 線量または 80 mCi の全蓄積線量での Y2B8 治療 (3 線量レベル); および
4. PSC または自己 BM 移植 (臨床医の決定に基づく)

Y2B8 の線量レベルは次の通りである:

40

## 【 0 0 9 3 】

## 【表 2】

表 2

線量レベル	線量 (mCi)
1	10
2	15
3	20

10

## 【 0 0 9 4 】

MTD の決定のため 3 人の患者を上記線量レベルの各々で処置する。

画像診断 (線量計測) 実験を次の通り実施する: 最初の 2 人の患者を使って未標識抗体 (即ち 2B8) の好ましい画像診断線量を決定する。最初の 2 人の患者に 250 cc の生理的食塩水中の 100 mg の未標識 2B8 を 4 時間に渡り投与し、次いで 0.5 mCi の 12B8 を投与する -- t = 0、t = 10 分、t = 120 分、t = 24 時間および t = 48 時間の時点で生体内分布データ用に血液をサンプリングする。t = 2 時間、t = 24 時間および t = 48 時間の時点で患者を多領域カメラ画像でスキャンする。t = 48 時間でスキャンした後、患者に上述と同様に 250 mg の 2B8 に次いで 4.5 mCi の 12B8 を投与する --- 次いで上述と同様に採血とスキャンニングを行う。

20

## 【 0 0 9 5 】

100 mg の 2B8 が良好な画像を生成したら、次の 2 人の患者に上述と同様に 50 mg の 2B8 を投与し、その後で 0.5 mCi の 12B8、その 48 時間後に 100 mg の 2B8、次いで 4.5 mCi の 12B8 を投与する。250 mg の 2B8 が良好な画像を生成したら、次の 2 人の患者に上述と同様に 250 mg の 2B8 を投与し、その後で 0.5 mCi の 12B8、その 48 時間後に 500 mg の 2B8、次いで 4.5 mCi の 12B8 を投与する。その次の患者は最適な画像を生成する 2B8 の最小量で処理する。最適な画像化は (1) 抗体が最も遅く消失する最も効率的な画像化; (2) 単一器官中の区画化を最小にする最良分布; および (3) 病変の最良の対象分解能 (腫瘍 / バックグラウンド対比) により定義されるだろう。

30

## 【 0 0 9 6 】

最初の 4 人の患者には、最終線量の 12B8 の 14 日後に、第一の治療線量の Y2B8 を開始する。その後の患者には、12B8 の 2 ~ 7 日後に第一の治療線量の Y2B8 を開始する。

Y2B8 での処置の前に、最初の 4 人を除く患者には、上述と同様に 2B8 を投与し、次いで 5 ~ 10 分間に渡り Y2B8 を点滴静注により投与する。t = 0、t = 10 分、t = 120 分、t = 24 時間および t = 48 時間の時点で生体内分布用に血液をサンプリングする。患者にほぼ 6 ~ 8 週間毎にそれぞれの線量の Y2B8 (第一の線量の場合と同じ線量を投与する) を 4 線量の最大値または 80 mCi の全蓄積線量になるように投与する。患者の WBC が 3,000 以上であり且つ AGC が 1000,000 以上となるまで、患者に次の線量の Y2B8 を投与しないことが最も好ましい。

40

3 線量レベル実験の完了の後、MTD の範囲を限定する。次いで追加の患者を実験に登録し、MTD を投与する。

## 【 0 0 9 7 】

## II . キメラ抗 CD20 抗体の産生 ("C2B8")

## A . キメラ抗 CD20 免疫グロブリン DNA 発現ベクターの作製

2B8 マウスハイブリドーマ細胞から RNA を単離し (Chomczynski, P. ら、"Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal. Biochem. 162:156-159 (1987) に記載された通りに)、そしてそれから c D

50

NAを調製した。5' 末端においてマウス軽鎖シグナル配列と相同性を有するDNAプライマーと3' 末端においてマウス軽鎖J領域と相同性を有するDNAプライマーのセットを使ったポリメラーゼ連鎖反応により、該cDNAからマウス免疫グロブリン軽鎖可変領域DNAを単離した。プライマー配列は次の通りであった：

## 【0098】

1. V<sub>L</sub> センス (配列番号3)

5' ATC AC AGATCT CTC ACC ATG GAT TTT CAG GTG CAG ATT ATC AGC TTC 3'

(下線を引いた部分はBgl II部位であり、上に線を引いた部分は開始コドンである)

2. V<sub>L</sub> アンチセンス (配列番号4)

5' TGC AGC ATC CGTACG TTT GAT TTC CAG CTT 3'

(下線を引いた部分はBsi WI部位である)

TCAE 8中の対応するBgl II部位とBsi WI部位については図1および図3を、そしてTCAE 8中の抗CD20中の対応する部位については図12~21を参照のこと。

## 【0099】

生成したそれらのDNA断片を、TCAE 8ベクター中にヒト軽鎖定常領域の前のところに直接クローニングし、配列決定した。マウス可変領域軽鎖について決定されたDNA配列を図22(配列番号5)に示す。図13のヌクレオチド978~1362も参照のこと。図22は更に、このマウス可変領域、CDRおよびフレームワーク領域のアミノ酸配列も提供する。2B8からのマウス軽鎖可変領域はマウスVIファミリーに属する。Kabat(前掲)を参照のこと。

## 【0100】

同様にマウス重鎖可変領域を単離し、ヒトIgG1定常領域の前にクローニングした。プライマーは次の通りであった：

1. V<sub>H</sub> センス (配列番号6)

5' GCG GCT CCC ACGCGT GTC CTG TCC CAG 3'

(下線を引いた部分はMlu I部位である)

2. V<sub>H</sub> アンチセンス (配列番号7)

5' GG(G/C) TGT TGT GCTAGC TG(A/C) (A/G)GA GAC (G/A)GT GA 3'

(下線を引いた部分はNhe I部位である)

## 【0101】

TCAE 8中の対応するMlu I部位とNhe I部位については図1および図4を、そしてTCAE 8中の抗CD20中の対応する部位については図12~21を参照のこと。

このマウス重鎖配列は図23(配列番号8)に示される。図14~15のヌクレオチド2401~2820も参照のこと。図23はこのマウス可変領域、CDRおよびフレームワーク領域のアミノ酸配列も提供する。2B8からのマウス重鎖可変領域はマウスVH 2Bファミリーに属する。

Kabat(前掲)を参照のこと。

## 【0102】

## B. キメラ抗CD20産生CHOおよびSP2/0トランスフェクターマの作製

チェーンズハムスター卵巣("CHO")細胞DG44はヒポキサンチンとチミジンを欠くSSFM II 培地(Gibco, Grand Island, NY, Form No.91-0456PK)中で増殖させ; SP2/0マウスミエローマ細胞は5%ウシ胎児血清と20ml/lのグルタミンが補足されたダルベッコ改良イーグル培地("DMEM")(Irvine Scientific, Santa Ana, Ca., カタログ No.9024)中で増殖させた。0.4mlの使い捨てキュベット中でBTX 600エレクトロポレーション装置(BTX, San Diego, CA)を使って、Not Iで制限された25μgのCHOまたは50μgのSP2/0プラスミドDNAを用いて400万個の細胞をエレクトロポレーションした。

## 【0103】

条件は、CHOの場合は210ボルトまたはSP2/0の場合は180ボルト、400マイクロファラデー、13オームであった。各エレクトロポレーション物を6枚の96ウエルプレート中に置いた(約7,000細胞/ウエル)。エレクトロポレーションの2日後とコロニーが形成す

10

20

30

40

50

るまでそれから2または3日後に、CHO の場合は 400  $\mu\text{g/ml}$  活性化化合物またはSP2/0 の場合は 800  $\mu\text{g/ml}$  においてG418 ( GENETICIN, Gibco, カタログNo. 860-1811 ) を含有する培地 ( 培地は更に50  $\mu\text{M}$  ヒポキサンチンと8  $\mu\text{M}$  チミジンを含有する ) をプレートに供給した。

#### 【 0 1 0 4 】

コロニーからの上清を、ヒト抗体に特異的なELISA によりキメラ免疫グロブリンの存在についてアッセイした。最大量の免疫グロブリンを生産するコロニーを増殖させ、メトトレキセート ( SP2/0 の場合は25 nM 、 CHO の場合は5 nM ) を含む培地を入れた96ウェルプレート中で平板培養し、2または3日毎に栄養補給した。上述の通り上清をアッセイし、最大量の免疫グロブリンを生産するコロニーを増殖させた。プロテインA アフィニティークロマトグラフィーを使って上清からキメラ抗CD20抗体を精製した。

10

#### 【 0 1 0 5 】

精製したキメラ抗CD20抗体をポリアクリルアミドゲル中での電気泳動により分析し、約95%より高い純度であると見積もった。2B8 を基準にしてキメラ抗体の親和性と特異性を測定した。直接および競合結合アッセイにおいて試験したキメラ抗CD20抗体は、マウス抗CD20モノクローナル抗体2B8 と比較すると、多数のCD20陽性B細胞系に対して同等の親和性と特異性を証明した ( データは示してない ) 。<sup>125</sup>I 放射能標識キメラ抗CD20の直接結合により該キメラ抗体の見かけの親和定数 ( "Kap" ) を決定し、Scatchard プロットにより放射能標識2B8 と比較した。推定Kap はCHO で生産されたキメラ抗CD20抗体については  $5.2 \times 10^{-9}\text{M}$  であり、SP2/0 で生産された抗体については  $7.4 \times 10^{-9}\text{M}$  であった。

20

#### 【 0 1 0 6 】

2B8 についての推定Kap は  $3.5 \times 10^{-9}\text{M}$  であった。ラジオイムノアッセイによる直接競合分析を使って、2B8 と効率的に競争する能力を比較することにより、該キメラ抗体の特異性と免疫反応性の保持の両方を確かめた。B細胞上のCD20抗原への結合を50%阻害するのに実質的に当量のキメラ抗CD20抗体と2B8 抗体が必要であった ( データは示してない ) 。即ち、おそらくキメラ化によるのであろう抗CD20抗体の阻害活性の損失は最少であった。

実施例II. B. の結果は、特に、キメラ抗CD20抗体がTCAE 8ベクターを使ってCHO およびSP2/0 トランスフェクターマから生産され、そしてそれらのキメラ抗体がマウス抗CD20モノクローナル抗体2B8 と実質的に同じ特異性と結合力を有したことを指摘している。

30

#### 【 0 1 0 7 】

##### C. キメラ抗CD20抗体の免疫学的活性の測定

##### i. ヒトC1q 分析

CHO とSP2/0 の両細胞系により生産されたキメラ抗CD20抗体を、フルオレセイン標識C1q ( C1q はQuidel, Mira Mesa, CA, Prod. No. A400 から得られ、そしてFITC標識はSigma, St. Louis MO, Prod. No. F-7250 から得られた ) を使ったフローサイトメトリーアッセイにおいてヒトC1q 結合について評価した。C1q のFITC標識は、Selected Methods In Cellular Immunology, Michell & Shiigi 編 ( W.H. Freeman & Co., San Francisco, CA, 1980, p.292 ) に記載されたプロトコールに従って行った。Becton Dickinson FACScan<sup>TM</sup> フローサイトメーターを使って分析結果を誘導した ( 515 ~ 545 nmの領域に渡ってフルオレセインを測定した ) 。

40

#### 【 0 1 0 8 】

当量のキメラ抗CD20抗体、ヒトIgG1、 ミエローマタンパク質 ( Binding Site, San Diego, Ca, Prod. No. BP078 ) および2B8 を当量数のCD20陽性SB細胞と共にインキュベートし、次いでFACS緩衝液 ( PBS 中 0.2% BSA, pH 7.4, 0.02% アジ化ナトリウム ) での洗浄段階により未結合抗体を除去し、次いでFITC標識C1q と共にインキュベートした。30~60分間のインキュベーション後、細胞を再び洗浄した。対照としてFITC標識C1q を含む3条件を、製造業者の取扱説明書に従ってFACScan<sup>TM</sup> 上で分析した。結果を図24に与える。

図24の結果として、キメラ抗CD20抗体条件についてのみ蛍光の有意な増加が観察された。即ち、付着性キメラ抗CD20抗体を有するSB細胞のみがC1q 陽性であり、一方他の条件は

50

対照と同じパターンを生じた。

【 0 1 0 9 】

ii . 補体依存性細胞溶解

キメラ抗CD20抗体をヒト血清（補体源）の存在下でリンパ腫細胞系を溶解する能力について分析した。100  $\mu$ Ciの $^{51}\text{Cr}$ と $1 \times 10^6$ 個のSB細胞を37 で1時間混合することにより、CD20陽性SB細胞を $^{51}\text{Cr}$ で標識した。次いで標識SB細胞を、当量のヒト補体と当量（0 ~ 50  $\mu$ g/ml）のキメラ抗CD20抗体または2B8 のいずれかの存在下で37 にて4時間インキュベートした（Brunner, K.T. ら、"Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on  $^{51}\text{Cr}$ -labeled allogeneic target cells in vitro." Immunology 14: 181-189 (1968)を参照のこと）。結果を図25に与える。

10

図25の結果は、特に、キメラ抗CD20抗体がそれらの条件下で有意な溶解（49%）をもたらすことを示す。

【 0 1 1 0 】

iii . 抗体依存性細胞障害エフェクターアッセイ

このアッセイには、CD20陽性細胞（SB）とCD20陰性細胞〔T細胞白血病系HSB; Adams, Richard, "Formal Discussion," Can. Res. 27:2479-2482 (1967)を参照のこと; ATCC寄託番号ATCC CCL 120.1〕を使用した。両者を $^{51}\text{Cr}$ で標識した。Brunner, K.T. ら、"Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on  $^{51}\text{Cr}$ -labeled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and drugs." Immunology 14:181-189 (1968)中に記載されたプロトコールに従って分析を行った。

20

【 0 1 1 1 】

37 で4時間のインキュベーションの終わりにCD20陽性SB標的細胞（ $^{51}\text{Cr}$ 標識したもの）の実質的なキメラ抗CD20抗体依存性細胞媒介性溶解を観察し、そしてこの作用をCHO とSP2/0により生産された抗体の両方について観察した（エフェクター細胞はヒト末梢リンパ球であり；エフェクター細胞：標的の比は100：1であった）。標的細胞の効率的溶解は3.9  $\mu$ g/mlにおいて観察された。これに対して、同一条件下で、マウス抗CD20モノクローナル抗体2B8は統計上有意でない作用を有し、そしてCD20陰性HSB細胞は溶解されなかった。結果を図26に与える。

実施例IIの結果は、特に、実施例Iのキメラ抗CD20抗体が免疫学的に活性であったことを示す。

30

【 0 1 1 2 】

III . キメラ抗CD20を使った生体内B細胞の涸渇

A . 非ヒト霊長類実験

3種類の別々の非ヒト霊長類実験を実施した。便宜上、それらを「キメラ抗CD20：CHO & SP2/0」、「キメラ抗CD20：CHO」および「高用量キメラ抗CD20」と名付ける。条件は次の通りであった。

キメラ抗CD20：CHO & SP2/0

【 0 1 1 3 】

4.5 ~ 7 kgの体重を有する6匹のマカクザル（White Sands Research Center, Alamogordo, NM）を各々2匹のサルの3グループに分けた。各グループの両方のサルに同用量の免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体を投与した。各グループの一方のサルにはCHOトランスフェクターにより生産された精製抗体を投与し、他方のサルにはSP2/0により生産された抗体を投与した。3つのグループには、連続4日間に渡りそれぞれ0.1 mg/kg、0.4 mg/kgおよび1.6 mg/kgに相当する抗体量を毎日投与した。免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体は、生理的食塩水と混合して点滴静注により投与した。各点滴静注の前に血液試料を採取した。最後の注入の24時間後（T = 0）に始まり、その後第1, 3, 7, 14および28日にも追加の血液試料を採取した。血液試料はその後、第90日に実験が終了するまで二週間間隔で採取した。

40

【 0 1 1 4 】

各動物からの約5 mlの全血を2000 RPMで5分間遠心分離した。可溶性キメラ抗CD20抗体

50

レベルのアッセイ用に血漿を除去した。ペレット（末梢血白血球と赤血球を含有する）は蛍光標識抗体分析用にウシ胎児血清中に再懸濁した（下記の「リンパ系細胞集団の蛍光抗体標識」を参照のこと）。

キメラ抗CD20：CHO

【0115】

4.5 ~ 6 kgの体重を有する6匹のマカクザル（White Sands）を各々2匹のサルの3グループに分けた。全動物にCHO トランスフェクターマにより生産された免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体（無菌の食塩水中）を投与した。3つのグループを次の通りに分けた：サブグループ1には4日間に渡り0.01mg/kgの抗体を毎日静注し；サブグループ2には4日間に渡り0.04mg/kgの抗体を毎日静注し；サブグループ3には6.4 mg/kgの抗体を1回

10

【0116】

3つのサブグループ全てについて、処置の開始前に血液試料を得、更に、上述のような最後の注射後のT = 0, 1, 3, 7, 14および28日目においても血液試料を採取した。それらの試料を蛍光標識抗体分析用に処理した（下記の「蛍光抗体標識」を参照のこと）。末梢血B細胞の定量に加えて、最後の注射後7, 14 および28日目にリンパ節生検試料を取り、そして単細胞集団をフローサイトメトリーによるリンパ球集団の定量用に染色した。

【0117】

高用量キメラ抗CD20

2匹のマカクザル（White Sands）に、CHO トランスフェクターマから生産された16.8 mg/kgの免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体（無菌の食塩水中）を連続4週間の期間に渡り毎週点滴注入した。処置の終わりに、骨髄切除のために両動物を麻酔した。リンパ節生検試料も取った。両方の組織セットを、Ling, N.R.ら、"B-cell and plasma cell antigens." Leucocyte Typing III White Cell Differentiation Antigens, A.J. McMichael 編（Oxford University Press, Oxford UK, 1987）, p.302に記載されたプロトコールに従って、Bリンパ球の存在下でフローサイトメトリーによりLeu 16で染色した。

20

【0118】

リンパ系細胞集団の蛍光抗体標識

血漿の除去後、白血球をハンクス平衡塩類溶液（"HBSS"）で2回洗浄し、血漿と同容量のウシ胎児血清（56 で30分間熱不活性化したもの）中に再懸濁する。この細胞調製物の0.1 ml容量を6本の15ml遠心管の各々に分配した。TおよびBリンパ球集団を同定するために、ヒトリンパ球表面マーカーCD2（AMAC, Westbrook, ME）、CD20（Becton Dickinson）およびヒトIgM（Binding Site, San Diego, CA）に対して特異性を有する蛍光標識モノクローナル抗体を3本の試験管に加えた。全ての試薬は対応するサルリンパ球抗原に陽性であることを前に試験しておいた。

30

【0119】

4本目の試験管において、フィコエリスリンと接合させたポリクローナルヤギ抗ヒトIgG（AMAC）を使って、サルB細胞表面CD20に結合したキメラ抗CD20抗体を測定した。この試薬は、サルIgに対する交差反応性を除去するためにサルIg - セファロースカラム上に予備吸着させてあり、よって細胞に結合したキメラ抗CD20抗体の特異的検出および定量が可能である。5本目の試験管は、二重染色B細胞集団のために抗IgMと抗ヒトIgG試薬の両方を含んだ。6本目の試験管は自己蛍光の測定のために全く試薬を含まなかった。

40

【0120】

細胞を蛍光抗体と共に30分間インキュベートし、洗浄し、そして0.5 mlの固定緩衝液（0.15M NaCl, 1%パラホルムアルデヒド, pH 7.4）で固定し、そしてBecton Dickinson FACSscan™装置上で分析した。未標識の白血球を使ったドットプロットビット地図において前方対直角光散乱器により最初にリンパ球集団が同定された。次いで他の全ての現象をゲート制御することにより、全リンパ球集団が単離された。その後の蛍光測定は、ゲート制御されたリンパ球特異的現象のみを反映した。

【0121】

50

### 末梢血 B リンパ球の涸渇

生体内の B 細胞を涸渇させることにおいて CHO と SP2/0 により生産された抗体の効力の間には何ら観察できる差は確認できなかったが、CHO トランスフェクターマから誘導されたキメラ抗CD20抗体を1.6 mg/kgと6.4 mg/kgの用量レベルで注射したサルと、SP2/0 により生産された抗体を0.4 mg/kgの用量レベルで注射したサルについては、第7日後に始まる B 細胞再生のわずかな増加が観察された。図27、図28および図29はキメラ抗CD20 : CHO & SP2/0実験から得られた結果を与え；図27は0.4 mg/kg用量レベルに向けられ；図28は1.6 mg/kg用量レベルに向けられ；そして図29は6.4 mg/kg用量レベルに向けられる。

#### 【 0 1 2 2 】

図27~29から明らかのように、全ての試験用量範囲に渡って治療処置後に末梢血 B 細胞レベルの大幅な減少 (>95%) が認められ、それらのレベルが注入後7日間まで維持された。この期間の後で B 細胞再生が始まり、そして再生開始の時期は用量レベルに無関係であった。

#### 【 0 1 2 3 】

キメラ抗C20:CHO 実験では、4回の毎日の注射(合計0.04mg/kg)に渡り1/10の抗体用量濃度(0.01mg/kg)を使用した。図30はこの実験の結果を与える。この用量は、抗表面IgM またはLeu 16抗体のいずれかを使って推定される正常レベルの約50%へ末梢血 B 細胞集団を涸渇させた。この結果は、免疫学的に活性なキメラ抗CD20を使って非ヒト霊長類に対してこの期間に渡りこの用量濃度で B リンパ球集団上のCD20抗原の飽和が達成されなかったことも示す。治療処置後最初の3日間の間は血液試料中に該抗体で覆われた B リンパ球が検出された。しかしながら、7日目までには、抗体で覆われた細胞は検出できなくなった。

#### 【 0 1 2 4 】

表3は、末梢血集団に対する免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の単一用量および複数用量の結果を要約する。単一用量条件は6.4 mg/kgであり；複数用量条件は連続4日間に渡る0.4 mg/kgであった(それらの結果は上述のサルから誘導された)。

#### 【 0 1 2 5 】

10

20

【表 3】

表 3

## C2B8 霊長類実験からの末梢血集団

サル	用量	日数	CD2	抗体 Hu IgG	
A	0.4 mg/kg (4回量)	出血前	81.5	—	10
		0	86.5	0.2	
		7	85.5	0.0	
		21	93.3	—	
		28	85.5	—	
B	0.4 mg/kg (4回量)	出血前	81.7	—	
		0	94.6	0.1	
		7	92.2	0.1	
		21	84.9	—	
		28	84.1	—	
C	6.4 mg/kg (1回量)	出血前	77.7	0.0	
		7	85.7	0.1	
		21	86.7	—	
		28	76.7	—	
D	6.4 mg/kg (1回量)	出血前	85.7	0.1	20
		7	94.7	0.1	
		21	85.2	—	
		28	85.9	—	
サル	抗 Hu IgG+ 抗 Hu IgM*	Leu-16	% B細胞潤濁		
A	—	9.4	0	30	
	0.3	0.0	97		
	0.1	1.2	99		
	—	2.1	78		
	—	4.1	66		
B	—	14.8	0	30	
	0.2	0.1	99		
	0.1	0.1	99		
	—	6.9	53		
	—	8.7	41		
C	0.2	17.0	0		
	0.1	0.0	99		
	—	14.7	15		
	—	8.1	62		
D	0.1	14.4	0	40	
	0.2	0.0	99		
	—	9.2	46		
	—	6.7	53		

\* キメラ抗 CD20 で覆われた B 細胞の程度を示す二重染色集団

## 【 0 1 2 6 】

表 3 に要約したデータは、抗体過剰の条件下での末梢血中の B 細胞の潤濁が単一または複数用量レベルにかかわらず迅速且つ効率的に起こったことを示す。更に、最後の注射後少なくとも 7 日間は潤濁が観察され、21 日目までに部分的な B 細胞再生が観察された。

表 4 は、表 3 の治療方法を使ったリンパ節の細胞集団に対する免疫学的に活性なキメラ抗 CD20 抗体の効果を要約する (0.4 mg/kg の 4 日分量 ; 6.4 mg/kg の 1 回量) ; 正常リンパ節 (対照サル、腋窩およびそ径部) および正常骨髄 (2 匹のサル) についての比較値も

提供する。

【 0 1 2 7 】

【 表 4 】

表 4

リンパ節の細胞集団

サル	用量	日数	CD2	抗体 Hu IgG	
A	0.4 mg/kg (4回量)	7	66.9	—	10
		14	76.9	19.6	
		28	61.6	19.7	
B	0.4 mg/kg (4回量)	7	59.4	—	
		14	83.2	9.9	
		28	84.1	15.7	
C	6.4 mg/kg (1回量)	7	75.5	—	
		14	74.1	17.9	
		28	66.9	23.1	
D	6.4 mg/kg (1回量)	7	83.8	—	20
		14	74.1	17.9	
		28	84.1	12.8	
サル	抗 Hu IgG+ 抗 Hu IgM*	Leu-16	%Bリンパ球潤濁		
A	7.4	40.1	1		
	0.8	22.6	44		
	—	26.0	36		
B	29.9	52.2	0		
	0.7	14.5	64		
	—	14.6	64		
C	22.3	35.2	13		30
	1.1	23.9	41		
	—	21.4	47		
D	12.5	19.7	51		
	0.2	8.7	78		
	—	12.9	68		
正常リンパ節					
対照 1					
腋窩	55.4	25.0	—	41.4	NA
そ径部	52.1	31.2	—	39.5	NA
正常骨髓					
対照 2	65.3	19.0	—	11.4	NA
対照 3	29.8	28.0	—	16.6	NA

【 0 1 2 8 】

表 4 の結果は、両治療方法について B リンパ球の効率的潤濁を証明する。表 4 は更に、非ヒト霊長類について免疫学的に活性なキメラ抗 CD20 抗体によるリンパ系組織中の B 細胞の完全な飽和が達成されなかったことも示す。その上、抗体で覆われた細胞が処置後 7 日目に観察され、次いで 14 日目にはリンパ節 B 細胞の著しい潤濁が観察された。

## 【 0 1 2 9 】

このデータに基づき、主に薬物学/毒物学測定の方に目を向けながら、上記に言及した単一高用量キメラ抗CD20実験を実施した。即ち、この実験はキメラ抗体の投与に関連する何らかの毒性、並びに末梢血リンパ節と骨髄からのB細胞涸渇の効力を評価するために実施した。更に、表4のデータは、その実験で、処置後7~14日目にリンパ節B細胞の大部分が涸渇され、毎週投薬法がより有効な結果を示すかもしれないことを指摘する。表5は高用量キメラ抗CD20実験の結果を要約する。

## 【 0 1 3 0 】

## 【表5】

10

表5

## リンパ節および骨髄の細胞集団

## リンパ球集団 (%)

サル	CD2	CD20 <sup>a</sup>	mIgM+抗C2B8 <sup>b</sup>	C2B8 <sup>c</sup>	日数 <sup>d</sup>
<u>そ径部リンパ節</u>					
E	90.0	5.3	4.8	6.5	22
F	91.0	6.3	5.6	6.3	22
G	89.9	5.0	3.7	5.8	36
H	85.4	12.3	1.7	1.8	36
<u>骨髄</u>					
E	46.3	4.3	2.6	2.8	22
F	41.8	3.0	2.1	2.2	22
G	35.3	0.8	1.4	1.4	36
H	25.6	4.4	4.3	4.4	36

20

<sup>a</sup> Leu 16 で染色された集団を示す。

<sup>b</sup> 表面IgM細胞とキメラ抗体で覆われた細胞に陽性である、二重染色集団を示す。

30

<sup>c</sup> 二重染色する表面IgM陽性細胞と単一染色する(表面IgM陰性)細胞を含む、キメラ抗体に染色する全集団を示す。

<sup>d</sup> 最後の16.8 mg/kg用量の注射後の日数。

## 【 0 1 3 1 】

両動物とも、対照リンパ節の場合の40% (上記表4参照) に比べて、治療停止後22日目に5%未満のB細胞を含むことを証明した。同様に、キメラ抗CD20抗体で治療した動物の骨髄では、正常動物の場合の11~15% (上記表4参照) に比べて、CD20陽性細胞のレベルが3%未満であった。治療停止後36日目に評価した動物では、そのうちの1匹(H)はリンパ節中に約12%のB細胞と骨髄中に4.4%のB細胞を有しており、別の動物(H)はリンパ節中に約5%のB細胞と骨髄中に0.8%のB細胞を有していた。このデータは有意なB細胞涸渇を示している。

40

## 【 0 1 3 2 】

実施例III.A.の結果は、特に、免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体が霊長類において長期の末梢血B細胞涸渇を引き起こすことを指摘する。該データはまた、該抗体の高用量を反復投与した時、末梢リンパ節と骨髄においてB細胞集団の有意な涸渇が達成されたこ

50

とも示す。試験動物に対して継続して行った追跡調査は、治療の第一週の間にもそのような末梢Bリンパ球の著しい涸渇があっても、何ら健康に悪影響が観察されなかったことも示した。更に、B細胞集団の再生が観察されたため、この治療によってそれらの霊長類の多能性幹細胞に悪影響はなかったという結論が引き出される。

【0133】

#### B. C2B8の臨床分析

##### i. C2B8の第I/II相臨床実験：単一用量療法研究

組織学的に実証されたB細胞リンパ腫を有する15人の患者を第I/II相臨床実験においてC2B8で処置した。用量増加実験において各患者に単一用量のC2B8を投与した；次の用量： $10\text{mg}/\text{m}^2$ ； $50\text{mg}/\text{m}^2$ ； $100\text{mg}/\text{m}^2$ ； $250\text{mg}/\text{m}^2$  および $500\text{mg}/\text{m}^2$  につき3人の患者を使用した。処置は、生理的食塩水中250 ccの最終容量または $1\text{mg}/\text{ml}$ の最大濃度に希釈されたC2B8を、0.22ミクロンの並列フィルターを通して点滴静注することにより行った。初期速度は最初の1時間の間50cc/時であった。全く毒性が観察されなければ、投与速度を最大200 cc/時まで上げることが可能であった。

【0134】

毒性（臨床医により指摘される）は「無し」、「軽度」、「中程度」（2人の患者）そして「重度」（1人の患者）に渡った。全患者が治療処置を完了した。特にT細胞とB細胞に対するC2B8の効果を測定するために、末梢血リンパ球を分析した。全患者に一貫して、C2B8の点滴注入後に末梢血Bリンパ球が涸渇され、そしてそのような涸渇は二週間を越えて維持された。

【0135】

1人の患者（ $100\text{mg}/\text{m}^2$  のC2B8を投与）は、C2B8処置に対して部分的応答（PR）（全ての測定可能な指標病巣の垂直直径の積の和に、4週間以上持続する50%以上の減少が観察され、その期間の間は全く新たな病巣が出現せず、現存する病巣はいずれも拡大しないであろう）を証明した。また、少なくとも1人の患者（ $500\text{mg}/\text{m}^2$  を投与）はC2B8処置に対してわずかな応答（MR）（全ての測定可能な指標病巣の2つの最長垂直直径の積の和に、少なくとも25%で且つ50%未満の減少が観察される）を証明した。表示効率について、PBLの結果を図34～35に与える；PRを示す患者のデータを図34に与え；MRを示す患者のデータを図35に与える。図34～35において次のものを適用する：

【0136】

【表6】

—■— = リンパ球； —□— =  $\text{CD}3^+$  細胞（T細胞）； —▲— =  $\text{CD}20^+$  細胞；  
 —●— =  $\text{CD}19^+$  細胞； —○— = カッパ； —△— = ラムダ；および  
 —◆— = C2B8。

【0137】

明らかのように、二週間以上の期間に渡りB細胞マーカー $\text{CD}20$ と $\text{CD}19$ 、カッパおよびラムダが涸渇された。T細胞数のわずかな初期減少があったが、それらは比較的早い時間枠においてほぼ基準線レベルに戻った。

【0138】

##### ii. C2B8の第I/II相臨床実験：複数用量療法研究

測定可能な進行性疾患を伴う組織学的に確証されたB細胞リンパ腫を有する患者は、2部に分けられるこの実験に適格である。第I相は、用量制限する毒性を特徴づけるための用量増加と生物学的に活性な耐容量レベルの決定から成り、この段階では3人の患者から成るグループに合計4回の点滴静注による毎週の点滴静注を行う。3レベルの各々における蓄積量は次の通りである： $500\text{mg}/\text{m}^2$ （ $125\text{mg}/\text{m}^2$  / 点滴注入）； $1000\text{mg}/\text{m}^2$ （

250 mg / m<sup>2</sup> / 点滴注入) ; 1500mg / m<sup>2</sup> ( 375 mg / m<sup>2</sup> / 点滴注入)。生物学的に活性な耐容用量は、耐容できる毒性と適度の活性の両方を有する最低用量として定義され、決定されるだろう。第II相では、C2B8の4回量の活性を決定することに重点をおいて、追加の患者に生物学的に活性な耐容用量を投与する。

【 0 1 3 9 】

VI . 組合せ療法 : C2B8とY2B8

B細胞リンパ芽球腫(ラモス腫瘍細胞)を使用するマウス異種移植モデル(nu/nuマウス、雌、約10週齢)において、C2B8とY2B8を使った組合せ療法アプローチを研究した。比較目的で、別のマウスもC2B8とY2B8で処置した。

【 0 1 4 0 】

ラモス腫瘍細胞(ATCC, CRL 1596)を、10%ウシ胎児血清とグルタミンが補足されたRPMI-1640を使って37°Cおよび5% CO<sub>2</sub>にて培養することにより維持した。25 gの針が付けられた1 ccの注射器を使って0.10mlの容量(HBSS)で1.7 × 10<sup>6</sup>個のラモス細胞を皮下注射することにより、7~10週齢の9匹の雌ヌードマウス中に腫瘍を発生させた。全ての動物は層状フローフードの中で処理し、そして籠、寝床、餌および水は全てオートクレーブ処理した。腫瘍を切除しそして40メッシュ網を通すことにより腫瘍細胞を濾過し、細胞を遠心分離(1300 RPM)により1 × HBSS(50ml)で洗浄し、1 × HBSS中に10 × 10<sup>6</sup>細胞/mlに再懸濁し、そして使用まで-70°Cで凍結保存した。

【 0 1 4 1 】

実験条件に向けて、幾つかの凍結ロットからの細胞を解凍し、遠心分離(1300 RPM)によりペレット化し、そして1 × HBSSで2回洗浄した。次いで細胞を約2.0 × 10<sup>6</sup>細胞/mlに再懸濁した。約9~12匹のマウスに、25 gの針が付けられた1 ccの注射器を使って該細胞懸濁液0.1 mlを注射(s.c.)した。注射は動物の左側のほぼ中央領域に行った。腫瘍は約2週間で発達した。腫瘍を切除し、上述の通り処理した。実験用マウスには上述と同様にして0.10mlのHBSS中の1.67 × 10<sup>6</sup>細胞を注射した。

【 0 1 4 2 】

予備的用量決定実験に基づいて、200 mgのC2B8と100 μCiのY2B8を実験に使用することを決定した。90匹の雌nu/nuマウス(約10週齢)に腫瘍細胞を注射した。約10日後、各グループにおいて同等の腫瘍サイズ分布(腫瘍の長さ×幅の積として表される平均腫瘍サイズは約80 mm<sup>2</sup>であった)を維持することを試みながら、24匹のマウスを4つの実験グループ(6匹のマウス/グループ)に割り当てた。25 gの針が付けられた100 μlハミルトン注射器を使った尾静脈注射により、次のグループを指示の通り処置した：

【 0 1 4 3 】

- A . 生理的食塩水
- B . Y2B8 (100 μCi)
- C . C2B8 (200 μg) および
- D . Y2B8 (100 μCi) + C2B8 (200 μg)

C2B8により試験したグループには、1回目の注射の7日後に2回目のC2B8注射(200 μg/マウス)を与えた。腫瘍測定はキャリパーを使って2または3日毎に行った。

処置材料の調製は次のプロトコールに従った：

【 0 1 4 4 】

A . Y2B8の調製

塩化イットリウム[90](60 mCi)をポリプロピレン試験管に移し、無金属2 M酢酸ナトリウムを使ってpH 4.1-4.4に調整した。2B8-MX-DTPA(生理的食塩水中0.3 mg; 2B8-MX-DTPAの調製については上記を参照のこと)を加え、渦動攪拌により穏やかに混合した。15分間のインキュベーション後、0.05 × 容の20mM EDTAと0.05 × 容の2 M酢酸ナトリウムを加えることにより反応を失活させた。この反応混合物5.0 μlを、75mg/ml HSAと1mM DTPAを含む2.5 mlの1 × PBS(「配合緩衝液」)中に希釈することにより放射能濃度を測定した。

【 0 1 4 5 】

10

20

30

40

50

計測は10.0  $\mu$  l を20mlのEcolume™シンチレーションカクテルに添加することによって行った。反応混合物の残りを3.0 mlの配合緩衝液に加え、滅菌濾過し、使用まで2～8で保存した。反応混合物に添加した抗体の量に基づいて算出されたタンパク質濃度と放射能濃度とを使って比活性（注射の時点で14 mCi / mg）を算出した。タンパク質に関する放射能は即席薄層クロマトグラフィーを使って測定した。放射能取り込みは95%であった。Y2B8は使用直前に配合緩衝液中に希釈し、滅菌濾過した（最終放射能濃度は1.0mCi / mlであった）。

【0146】

#### B. C2B8の調製

上記と同様にしてC2B8を調製した。C2B8は生理的食塩水中の無菌試薬として5.0 mg / mlで供給した。注射前に生理的食塩水中に2.0 mg / mlに希釈し、次いで滅菌濾過した。

10

#### C. 結果

処置後、腫瘍サイズを長さ×幅の積として表し、そして図31（Y2B8対食塩水）；図32（C2B8対食塩水）および図34（Y2B8 + C2B8対食塩水）に指摘した日に測定値をとった。標準誤差も決定した。

図34に示されるように、Y2B8とC2B8の組合せは、Y2B8またはC2B8のいずれかにより得られる効果と同等の殺腫瘍性効果を示した。

【0147】

#### V. 別の治療方法

前の実施例を考慮して認められる別の治療方法は明らかである。1つのそのような方策は、C2B8の治療用量の後で約一週間以内に2B8 と放射能標識2B8（例えばY2B8）；または2B8, C2B8 およびY2B8；またはC2B8と例えばY2B8のいずれかの組合せを使用する。他の方策は放射能標識C2B8の使用である--- そのような方策はC2B8の免疫学的活性部分の利益に加えて放射能標識に関する利益の利用を考慮したものである。好ましい放射能標識としては、マウス抗体2B8 に比較して大きなC2B8の循環半減期を仮定すればイットリウム90が挙げられる。

20

【0148】

B細胞を涸渇させるC2B8の能力と、放射能標識の使用から誘導されるであろう利益のため、好ましい別の方策は、全部ではないにしても大部分のB細胞が涸渇されてしまうように患者をC2B8で治療することである（単一用量または複数用量のいずれかで）。次いでこの後で放射能標識2B8を使用する。末梢B細胞の涸渇のため、放射能標識2B8が腫瘍細胞をターゲティングする見込みがかなりある。この標識に関して文献中に報告された結果の型（Kaminski参照）を仮定すれば、ヨウ素[131]標識2B8が好ましく使用される。別の選択は、腫瘍の透過性を増加させようとして最初に放射能標識2B8（またはC2B8）を使用し、次いでC2B8による1回または複数回処置を行うことを含む。

30

【0149】

この方策の意図は、腫瘍塊の内側と外側の両方に届くC2B8の機会を増加させることである。他の方策はC2B8と組み合わせた化学療法剤の使用を含む。それらの方策としては、いわゆる「互い違い」処置、即ち化学療法剤での処置の後でC2B8での処置、次いでこのプロトコルの反復、が挙げられる。あるいは、単一用量または複数用量のC2B8での最初の処置、その後で化学療法処置が有効である。好ましい化学療法剤としては、シクロホスファミド；ドキシソルピシン；ピンクリスチン；およびプレドニソンが挙げられるがそれらに限定されない。Armitage, J.O.ら、Cancer 50:1695 (1982)を参照のこと。これは本明細書中に参考として組み込まれる。

40

上記の別の治療方法は限定のつもりでなくむしろ例示として与えられる。

【0150】

#### VI. 寄託物情報

特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブタペスト条約（「ブタペスト条約」）の規定のもとに、TCAE 8中の抗CD20（寄託の目的でE. コリ中に形質転換せしめたもの）をアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション（ATCC）, 12301 Parklawn Drive

50

、Rockville, Maryland, 20852に寄託した。該微生物は1992年11月9日にATCCにより試験され、そしてその日に生存可能であると決定された。ATCCはこの微生物に次のATCC寄託番号を付与した：ATCC 69119 (TCAE 8中の抗CD20)。ブタペスト条約の規定のもとに1993年6月22日にハイブリドーマ2B8をATCCに寄託した。該培養物の生存可能性は1993年6月25日に決定され、ATCCはこのハイブリドーマに次のATCC寄託番号を付与した：HB 11388。

【図面の簡単な説明】

【0151】

【図1】図1は、免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の生産に有用な縦列式キメラ抗体発現ベクター ("TCAE 8") の略図である。

【図2】図2は、図1のベクターの核酸配列である。

【図3】図3は、図1のベクターの核酸配列である。

【図4】図4は、図1のベクターの核酸配列である。

【図5】図5は、図1のベクターの核酸配列である。

【図6】図6は、図1のベクターの核酸配列である。

【図7】図7は、図1のベクターの核酸配列である。

【図8】図8は、図1のベクターの核酸配列である。

【図9】図9は、図1のベクターの核酸配列である。

【図10】図10は、図1のベクターの核酸配列である。

【図11】図11は、図1のベクターの核酸配列である。

【図12】図12は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【0152】

【図13】図13は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図14】図14は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図15】図15は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図16】図16は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図17】図17は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図18】図18は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図19】図19は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図20】図20は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図21】図21は、マウス軽鎖および重鎖可変領域を更に含んで成る図1のベクター ("TCAE 8中の抗CD20") の核酸配列である。

【図22】図22は、マウス抗CD20モノクローナル抗体2B8由来のマウス可変領域軽鎖の核酸配列とアミノ酸配列 (CDR とフレームワーク領域を含む) である。

【図23】図23は、マウス抗CD20モノクローナル抗体2B8由来のマウス可変領域重鎖の核酸配列とアミノ酸配列 (CDR とフレームワーク領域を含む) である。

【図24】図24は、対照として標識C1q；標識C1qとマウス抗CD20モノクローナル抗体2B8；および標識C1qとヒトIgG1,kを含む、キメラ抗CD20抗体への蛍光標識ヒトC1qの結合を証明するフローサイトメトリー結果である。

【0153】

【図25】図25は、キメラ抗CD20抗体とマウス抗CD20モノクローナル抗体2B8を比較する補体依存性連細胞溶解の結果を示す。

10

20

30

40

50

【図26】図26は、キメラ抗CD20抗体と2B8 を比較する生体内ヒトエフェクター細胞による抗体媒介性細胞障害の結果を示す。

【図27】図27は、0.4 mg/kgの免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の点滴注入後の非ヒト霊長類末梢血Bリンパ球涸渇の結果を与える。

【図28】図28は、1.6 mg/kgの免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の点滴注入後の非ヒト霊長類末梢血Bリンパ球涸渇の結果を与える。

【図29】図29は、6.4 mg/kgの免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の点滴注入後の非ヒト霊長類末梢血Bリンパ球涸渇の結果を与える。

【図30】図30は、特に、0.01mg/kgの免疫学的に活性なキメラ抗CD20抗体の点滴注入後の非ヒト霊長類末梢血Bリンパ球涸渇の結果を与える。

【図31】図31は、B細胞リンパ芽球腫を使ったマウス異種移植モデルにおけるY2B8の殺腫瘍性攻撃の結果を与える。

【図32】図32は、B細胞リンパ芽球腫を使ったマウス異種移植モデルにおけるC2B8の殺腫瘍性攻撃の結果を与える。

【図33】図33は、B細胞リンパ芽球腫を使ったマウス異種移植モデルにおけるY2B8とC2B8の組合せの殺腫瘍性攻撃の結果を与える。

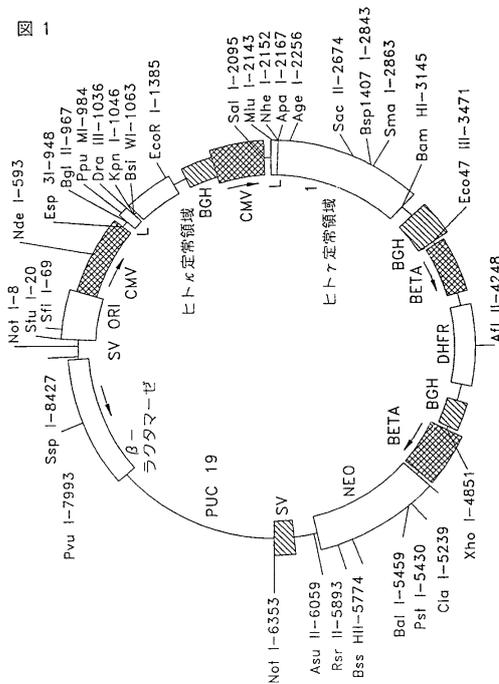
【図34】図34は、病気の部分緩解を証明する患者について或る期間に渡るB細胞集団涸渇の証拠となるC2B8の第I/II相臨床分析からの結果を与える。

【図35】図35は、病気の微緩解を証明する患者について或る期間に渡るB細胞集団涸渇の証拠となるC2B8の第I/II相臨床分析からの結果を与える。

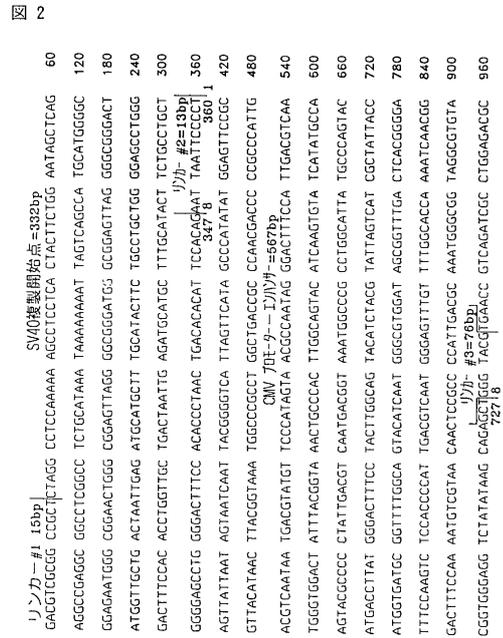
10

20

【図1】



【図2】



【 3 】

3

Bgl II  
 CATCAACAGT CTCTCAACCAT GAGGGTCCCG CCTCAAGCTCC TGGGGCTCCT GCTGCTCTGG 1020  
 978 19 1101 102  
 CTCGCCAGTG CACAGTGTGA TGGTCTCAG GTGGAATATCA AAGCTACGGT GGCTGCACCA 1080  
 1038 9 102 5 351 11  
 TCTGTETCA TCTTCCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAAT CTGGAACCTG CTCTGTTG 1140  
 TCCCTCTGA ATAACTTCTA TCCGACAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAMGT GGATAAGGCC 1200  
 ヒト定常領域 324bp 107 アミノ酸 & 終結コード  
 CTCCAATCG GTAACTCCCA GGGAGAGTTC ACAGAGCAG ACAGCAAGGA CAGCACCTAC 1260  
 AGCCTAEGA GCACCTGAC GCTGAGCAA GGAAGTACG AGAAGACAGA AGTCTAGGCC 1320  
 TCCGATCA CCACTACGG CCTGAGTGG CCGCTGCAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1380  
 整頓  
 終結  
 TCTTCAATTC AGATCCGTTA ACGGTTACCA ACTACTTACA CTGGATTGCT GAGACATGC 1440  
 1360 7  
 GGGCTGATA TCACTGATG ATGAGCTCG AGTGTGCTT CTAGTTGCCA GGCATCTGTT 1500  
 147 12  
 GTTGTCCCT CCCCCTGCC TCCCTGACC CTGGAGGTG CCACCTCCAC TGTCCTTTCC 1560  
 TAATAAATG AGGAATTCG ATGGCATTG CTGAGTAGT GTCATTCTAT TCTGGGGGGT 1620  
 BGI 序リ A=231bp  
 GGGTGGGG ASGACAGCAA GGGGAGGAT TGGGAGACA ATAGCAGGCA TCTTGGGGAT 1680  
 リンカー #5=18bp  
 GGGTGGGCT CTATGGAACC AGTGGGGCT CCACTCTAT GCCAAGTAGG CCCCCTATTG 1740  
 1702 3 171 16

【 5 】

5

CGTGTGTTCA GGTCTCTGAC GGTCTGAC CAGGACTGG TGAATGGCAA GGAATACAAG 2760  
 TGAAGGCTT CCAACAHAGC CTTCCAGCC CCATCGAGA AAACCATCTC CAAAGCCAAA 2820  
 GGGGAGCCGC GAGAACCAKA GGTGTACACC CTGGCCCAT CCGGGATGA GCTGACCCAG 2880  
 AAACGAGTCA GCTGACCTG CTTGGTCAA GGTCTTATC CCAGCCACAT CCGCTGGAG 2940  
 TGGGAGACA ATGGGAGCC GGAGAACAC TACAAGACA GGCCTCCCTG GTEGACTCC 3000  
 GACGGTCT TCTTCTCTA CACAAAGTC ACCGTGACA AGAGCAGGTG GCAGAGGGG 3060  
 AACGTCTCT CATGCTCGT GATEGATG GCTCTGACA ACCACTACAC GAGAGAGAC 3120  
 CTCCTCCCTG TCTCGGTTAA AGCGATCC GTTAAAGCTT ACCACTACC TAGACTGGAT 3180  
 Bam HI  
 3142  
 TCGTGAAC ATGGGGCGT GATATCTAG TATGATACC CTGCACTGTG CCTCTAGT 3240  
 3259 6  
 GCGAGCAT TGTGTTTGG CCTCCCGG TCCCTTCTT GACCCGTGAA GGTGCCACT 3300  
 ヌシ成長ホルモンポリペプチド 291bp  
 CCACTGTCT TCTTAATAA AATGAGGAA TTGATCGCA TTGTCTGAGT AGGTGCTAT 3360  
 CTATCTGG GGTGGGGT GGGCAGACA GAAAGGGGA GAAITGGGAA GACAATAGA 3420  
 リンカー #8=34bp  
 GGCATGCTG GATCGGGT GGCCTATGG AACCACTGG GCGCTGACAG CCTTGGATCT 3480  
 3466 7  
 CCGATCCG ACCTTCTCT CTCATTTCT TATTTGCATA ATGAGAAA AAGGAAAA 3540  
 3480  
 AATTTTACA CCAATTCAGT AGTTGATTG GCAATTCGT TCCCAAAAG GATCTTTAG 3600  
 マウスβ-グロブリン主鎖プロモーター=366bp  
 AGACAGTGT CTCTGCACAG ATAAGGACAA ACATTAATCA GAGGAGTAC CCAAGACTGA 3660

【 4 】

4

AGGTCAATGA CGTAAATGG CCGCCTGGC ATTATGCCA GTACATGACC TTATGGGACT 1800  
 TTCTACTTG GCAGTACATC TAGTATTAG TCATCCCTAT TACCATGGT ATGGGGTTTT 1860  
 GGCAGTACAT CAATGGCGCT GGATAGCCGT TTGACTCACC GGGATTTCCA AGTCTCCAC 1920  
 DMV 701-9-1(1/1)片=334bp  
 CCATTGAGCT CAATGGGAGT TTGTTTGGC ACCAAATCA ACCGGACTTT CCAAAATGC 1980  
 CCATTGAGCT CAATGGGAGT TTGTTTGGC ACCAAATCA ACCGGACTTT CCAAAATGC 1980  
 GTANCACT GCGCCCATG ACCAAATCA GTATGACGA CTGAACACAG ACCGTGGAC 2040  
 TANGAGACT 701 #8=20bp  
 205 12 205 19  
 リンカー #5=51bp  
 205 12 205 19  
 AGTGGTGGCA GGCCTACTT GCTCTCTTT GTCCTGTTG CTAGCTGCTC GGTGGACC 2100  
 Sal I  
 2100  
 重鎖開始  
 AAGGGCCCAT CGGTCTTCCC CCGTCCAGA GCACCTCTGG GGGCAGCGC 2220  
 GGGCTGGGCT GCGTGGTCAA GGAATCTC CCGCAACCGG TGACGGTGTG GTGGAACTCA 2280  
 GGGGCCCTCA CCAGGCGCGT GGCAGCTTC CCGGCTGTC TACAGTCCIC AGGACTTAC 2340  
 ヒト1定常領域  
 TCCCTCAGA GCGTGGTAC GGTGCTCTC AGAGCTTGG GCACCCAGAG CTACATCTGC 2400  
 983bp=330 アミノ酸 & 終結コード  
 AAGGTGAATC ACAGCCCAAG CACCCACAG GTGGCAAGA AAGCAGAGCC CAATCTTGT 2460  
 GACAAACTC ACACATGCC ACCGTGCCA GCACCTGAA CCGTGGGGG ACCGTGATC 2520  
 TTCCTTTCC CCCCAAAACC CAAAGACAC CTGATGATC CCGGACCCC TGAGGTACA 2580  
 TGGGTGGTGG TGGAGTGG CCAGAAAGC CCTGAGGTCA AGTTCAACTG GTACGTGGAC 2640  
 GGGCTGGAGG TGCATTAATG CAGACAAAG CCGGGGAGG ASGAGTACA CAGCAGTAC 2700

【 6 】

6

GACTCTAAG CCAAGTAGTG GCACAGGAT CTAGGAGAA ATATGCTTGT CATACCGAA 3720  
 GCGTGAATCC GTAGAGCCAC ACCTTGGTAA GGGCCAACTC GCTCACACAG GATAGAGG 3780  
 GCAGGAGCCA GGGCAGAGCA TATAAGTGA GGTAGGATCA GTTGTCTTC ACATTTGCT 3840  
 CTGACATAGT TGTGTGGGA GCTTGGATG CTTGACAGC TCAGGGCTGC GATTTGCC 3900  
 リンカー #9=19bp  
 3856 7  
 DIFR開始  
 CAAACTGAC GGCATCTCA GGTGAAGGC TGTAGGATT TTATCCCGC TGCCATGAT 3960  
 3957 10  
 GTTGCACCAT TGAAGTGCAT GGTGGCGTG TCCAAATA TGGGGATTGG CAAGACGGA 4020  
 GACTACCTT GCGCTCGGT CAGGAACGAG TTCAGTACT TCCAAAGAT GACCACAACC 4080  
 TCTTCAGTGG AAGGTAAACA GAATCTGGT ATTAGGTA GGAACCTG GTTCTCAAT 4140  
 マウス DIFR=564bp=187 アミノ酸 & 終結コード  
 CCTGAGAGA ATCGACCTT AAAGACAGA ATTAATATG TTCTAGTAG AAGACTCAA 4200  
 GAACACAG CAGGAGCTA TTTCTTCC AAAGTTTGG ATGATGCTT AAGACTTAT 4260  
 GAACAACGG AATTGGCAAG TAAGTAGAC ATGGTTTGA TAGTGGGAG CAGTCTGTT 4320  
 TACCAGGAG CATTGAATCA ACCAGCCAC CTTAGACTCT TTGTGACAA GATCATGCA 4380  
 GAATTTGAAA GTGACAGCT TTTCCAGAA ATTAGTTGG GGAATATAA ACTTCTCCA 4440  
 GAATACCCAG GCGTCTCTC TGAGTCCAG GAGGAAGAG GCATCAGTA TAAGTTTGA 4500  
 DIFR終結  
 4521 2  
 GTCTACGAGA AGAAGAGACTA CAGGAGAT GCTTTCAAGT TCTTCTCTC CCTCTAAG 4560

【 7 】

7

3' 未翻訳 OHRF=82bp  
 TCATGCATTT TTATAAGACC ATGGGACTTT TGCTGGCTTT AGACTAGACT CGACTGTGCC 4620  
 4603<sup>4</sup> 4618<sup>4</sup>  
 TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGGCC GTCCCGCGTG CTTCTCTTGA CCCTGGGAGG 4680  
 4700  
 TTCCACTCC ACTGTCTTT CCTATATAAA TGGGGAAAT GCATGCCATT GCTGTAGTAG 4740  
 4800  
 GTGTCTTCT ATTCTGGGG GTGGGTGGG GCAGCCAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA 4800  
 4844<sup>5</sup>  
 CAATAGCAGC CATGCTGGG ATCGGTGGG CTCTATGGAA CCACCTGGGG CTTCGACTAC 4860  
 4920  
 TAGCTTTGCT TCTCAATTC TTATTGGAT AATGAGAAA AAGGAAAAA TAATTTTAA 4920  
 4980  
 ACCAATCAG TAGTGAATG AGCAATGGG TCCCAAAAA GGATGCTTTA GAGACAGTGT 4980  
 マウズβ-プロピリン主要プロモーター=806bp  
 TCTCTGACA GATRAGGACA AACATTTATC AGGGGAGTA CCGAGAGTG AGACTCCTAA 5040  
 GCCAGTGAAT GGCACAGAT TCTAGGAGA AATATGCTTG TCATCACCGA AGCCTGATC 5100  
 5160  
 GTAGAGCCA CACCTTGGTA AGGGCCAATC TCTCACACA GGATAGAGA GCCAAGGCC 5160  
 5220  
 AGGGCAGC ATATAAGTG AGTAGGATC AGTTGCTCT CACATTTGCT TCTGACATAG 5220  
 TTTGTTGGG AGCTTGGATC GATCCTCTAT GATTGAMCAA GATGGATTGC ACCGAGTTC 5280  
 5340  
 TCCGGCCGT TGGGTGGAGA GGCCTATCGG CTATGACTGG GCACAACAGA CAATGGCGTG 5340  
 5400  
 CTCTGATGC GCCGTGTCC GCGTGTGACG GGAGGGGCC CCGGTTCTTT TTGTCAAGC 5400  
 ネオマインホスホトランスフェラーゼ  
 CGACTGTCC GGTCCCTGA ATGAACTGCA GGACGAGCA GCGCGCTAT COTGGCTGCC 5460

【 8 】

8

795bp=204 アミノ酸と終結コドン  
 CAGCAGCGG GTTCTCTGGC CAGCTGTCT CGAGTGTG ACTGAAGCGG GAAGGGACTG 5520  
 5580  
 GCTGCTATTG GCGCAAGTGC CCGGGGAGA TCTCTGTCA TCTCACCTTG CTCTGGCCA 5580  
 5640  
 GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGGG GGGCTGCAAT AGCCTTGTATC CGGCTACCTG 5640  
 5700  
 CECATTGCAC CACCAAGGCA AACATCGCAT CGAGCGAGCA CCTACTCGGA TGGAAAGCCG 5700  
 5760  
 TCTGTGAT CAGGATGATC TGGAGAGA GCATCAGGG CTEGGCCAC CCAACTGT 5760  
 5820  
 CCCCAGGTC AAGCGCCGA TGGCCGACGG CGAGGATCTC GTGTGACCC ATGGCGATC 5820  
 5880  
 CTGCTTCCG AATATCATGG TGGAAAAATGG CCGCTTTTCT GGTATCATCG ACTGTGGCCG 5880  
 5940  
 GCTGGGTGTG CCGACCCCTC ATCAGGCAT AGCCTTGGCT ACCCGGATA TTGCTGAAGA 5940  
 6000  
 GCTTGGCGG GAATGGGCTC ACCGCTTCTC COTGCTTAC GGTATCGCCG CTCCCGATTG 6000  
 NEO 終結  
 GCAGCCGATC CCGCTTATC GCCTTCTTGA CGAGTCTTC TGGCGGGAC TCTGGGTTT 6060  
 6120  
 GAAATGACC ACCAAAGCAC GCCCAACTG CCATCACGAG ATTTCGATC CACCGCCGC 6120  
 3' 未翻訳 NEO=173bp  
 TTCTATGAAA GGTGGGCTT CCGAATGCTT TTCCGGAGC CCGGCTGGAT GATCTCCAG 6180  
 6240  
 CCGGGGATC TCATCTGGA GTTCTGGC CAGCCGACT TGTATTTC AGCTTAA 6240  
 6300  
 GGTTCAAAAT AAGCAATAG CATCAAAAT TTCACAAAAT AACATTTT TTCACCTCAT 6300  
 SV40ポリA初期=133bp  
 TCTAGTTGT GTTTGCCAA ACTCATCAAT CTATCTTATC ATGTCTGGAT CCGCGCCGC 6360  
 6399<sup>10</sup>

【 9 】

9

ATCCGCTGA GAGCTGGG TAATCATGGT CATASCTGT TCCGTGTGA AATTGTTATC 6420  
 6388<sup>9</sup>  
 CCGTCAAAAT TCCACAAAC ATACGAGCCG GAAGCATAA GTGTAAAGCC TGGGGTGGCT 6480  
 6540  
 AATGAGTAG CTAAGTACA TTAATTGGT TGGGCTCACT GCGCGCTTC CAGTCGGGAA 6540  
 6600  
 ACCGTGTGTG CCAGCTCAT TAATGAATCG CCCAACCGCG GGGGAGGCG GGTTCGCTA 6600  
 6660  
 TTGGCGCTC TTCCCTTC TGGCTCACTG ACTCGCTGGG CTCGGTCTG CCGCTGCGGC 6660  
 6720  
 GAGCGTATC ACCTACCTA AAGCGGTA TAGGTTATC CACAGAACTA GGGGATAAGC 6720  
 6780  
 CAGGAAAGA CATGTGACA AAGCGCAGC AAGAGGCGAG CAGCGTAA AAGCGCGCTG 6780  
 6840  
 TGTGGGCTG TTTCCATAGG CTCCGCGCG CTACGAGCA TCACAAAAA CGACGCTAA  
 679=複製開始点  
 GTCAGAGTG GCGAAACCCG ACAGACTAT AAGATACCA GCGCTTCCC CCTGGAAGCT 6900  
 6960  
 CCGCTGGG CTCTCTGT CCGACCTCG DCGTTACCG ATACCTGTC CCGCTTCTCC 6960  
 7020  
 CTTCGGAG CGTGGCGCT TCTAAATGCT CAGCGTGTAG GTATCTCAGT TGGGTGAGG 7020  
 7080  
 TCGTTCCGTC CAAGCTGGC TGTGTGACG AAGCCCGCT TCAGCCCGAC CCGTGGCGCT 7080  
 7140  
 TATCCGGTAA CTATGTGCTT GAGTCCAAAC CGGTAGACA CCACTTATCG CCACCTGGCAG 7140  
 7200  
 CAGCCACTGG TAACAGGAT AGCAGAGCA GGTATGTAGG CCGTGTACA GAGTCTTGA 7200  
 7260  
 ATCTGTGGC TAACTAGGC TACACTAGA GGCAGTATT TGGTATCTGC GCTCTGCTGA 7260  
 7320  
 AGCCAGTTAC CTTGGGAAA AGAGTTGGTA GCTCTGATC CCGCAACAA ACCACCGCTG 7320  
 7380  
 GTAGCGTGG TTTTTTTGT TGCAGCAGC AGATTACCG CAGAAAAAA GGATCTCAAG 7380

【 10 】

10

AAGATCCTTT GATCTTTCT ACGGGTGTG ACGCTCAGTG GACCGAAAC TCAGTTAAG 7440  
 7500  
 GGATTTGGT CATGAGATA TCAAAAGA TCTTCACTA GATCTTTTA AATTAAAA 7500  
 7560  
 GAAATTTAA ATCAATCTAA AGTATATG AGTAACTTG GTTGACACT TTTCAATGCT 7560  
 7580  
 TAATAGTGA GGCACCTATC TCAGGATCT GTCATTTGG TTCATCCATA GTTCCCTGAC 7620  
 7680  
 TCCCGTGT GTAGATACT AGCATACGG AGGCTTACC ATCTGGCCC AGTCTGGCA 7680  
 7740  
 TGATACCGG AGACCCAGC TCACCGGCTC CAGATTTATC AGCAATAAC CAGCCAGCCG 7740  
 7800  
 GAAGGGCGA GCGCAGAAGT GGTCTGGAA CTTTATGCG CCTCCATCCAG TCTATTAA 7800  
 208 アミノ酸と終結コドン  
 GTTGGCGGA AGCTAGAGTA AGTATGCG CAGTTAATAG TTGGCAAC GTTGTGGCA 7860  
 7920  
 TTGCTACAG CATCGTGTG TCAGCTGTG GGTTTGGTAT GGCCTTATC AGCTCGGTT 7920  
 7980  
 CCCACAGT AAGCGAGT ACATGATCC CCATGTTG CAAAAGCG GTTAGCTCT 7980  
 8040  
 TCGCTTCC GATGTTGT AAGATGATG TGGCGGAGT GTTATCACTC ATGTTATGG 8040  
 8100  
 CAGCATGCA TAATCTCT ACTGTATCG CATCCGTAAG ATGCTTTTCT GTGACTGGT 8100  
 8160  
 AGTACTCAAC CAAGTATTC TGAAATAGT GTATCGCGG ACCGAGTGC TCTTCCCGG 8160  
 8220  
 CGTCAATAG GGATAACC GCGCACATA CGAGACTT AAAAGTCTC ATCATGGAA 8220  
 8280  
 AAGCTTCTC GGGCGAAA CTCTAAGGA TCTTACGGCT GTGAGATCC AGTTCAGT 8280  
 8340  
 ACCCACTGG TGCACCAAC TGATCTTCAAG CATCTTTAC TTTCACCAG GTTCTGGGT 8340

【 1 1 】

11

CGACAAAAC AGGAAGGCAA AATCCGCCAA AAAAGGGGAAAT AAGGGCCACA CGGAAATGTT 8400  
 GAATACTACTACTCTCTCTTTTCATATTTATTGAGCATTTATCAGGGT TATTGTCTCA 8450  
 TGAGGGGATA CATATTGAA TGTATTTAGA AAAATAAACA AATAGGGGTT CCGGGGCAT 8520  
 TTCCCGAAA AGTCCCACT

【 1 3 】

13

Bl. 2 1 整頓開始 天然のL-シ-96bp  
 CATCACAGAT CTCTCACAT GATATTTTCAG GTGCAGATTA TGAGTTCCT GCTAAATCAGT 1020  
 GCCTTCAGTCA TAAATGTCAG AGGACAAATTT GTTCTCTCCC AGTCCACAGC AATCCCTGTCT 1080  
 1044 51  
 GCATCTCCAG GGGAGAAGGT CACAATGACT TCGAGGGCCA GCTGAAGTGT AAGTTACATC 1140  
 CACTGGTTC AGCAGAGGCC AGGATCTCC CCCAAACCTT GGTATTTATGC CACATCCACG 1200  
 CTGGTCTTC GAGTCCCTGT TCGCTTCAGT GGCAGTGGT CTGGGCATTC TTACTCTCTC 1260  
 ACCATCAGCA GAGTGGAGGC TGAAGATGCT GCCACTTAT ACTGCCAGCA GTGGACTAGT 1320  
 AACCCACCA CTTTCGGAGG GGGGACCCAG CTGGAAATCA AATATCCCGT GGTCCACCA 1380  
 1382 3  
 TCTGTCTCA TCTTCCGCC ATCTGATGAG CAGTTGAAT CTGGAACTGC CTCGTGTG 1440  
 TGCCTGCTCA ATAACITCTA TCCAGAGAG GCCAAAGTAC AGTGGAAAGT GGATAAGGCC 1500  
 CTCCAATCCG GTACCTCCA GAGAGGTGC ACAGAGGAG ACAGCAHGA CAGCACCTAC 1560  
 AGCCTCAGCA GCACCCCTGAC GCTGAGCAAA GGAGACTAG AGAAACACAA AGTCTACGCC 1620  
 TCGAAGTCA CCAATCCAGG CCTGAGCTGG CCCGTACAA AGAGCTTCAA CAGGGGAGAG 1680  
 1682 3  
 整頓 1771 12  
 終結 Bl. 2 1 整頓開始 天然のL-シ-96bp  
 TGTTCGAAATTC AGATCCGTTA AGGGTTACCA ACTACTAGA CTGGATTCGT CACAACATCC 1740  
 1846 7  
 GGCCCTGATA TCTACCTATG ATCAGCCCTG AATGTGCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT 1800

【 1 2 】

12

リンカン-#1=18bp  
 GAGCTCCGG CCCGCTCAGG CCTCCAAA AGCCTCTCA CTACTTCTGG AATAGCTCAG 60  
 18 6  
 AGGCCGAGGC GGCCTCGGCC TCTGTGATA TAAAAAAAT TAGTCAAGCA TGCATGGGC 120  
 SV40複製開始点=332bp  
 GGAGAATGG CGGAACCTGG CCGAATTAGG GCGGGATGG GCGGAGTAG GGGCGGACT 180  
 ATGTTGCTG ACTAATTGAG ATGCATCTT TGCATCTTC TGCCTGCTGG GGAGCCTGG 240  
 GACTTCCAC ACCGTGTTCC TCACTAATG AGATGATGG TTGGCATCT TETGCCTGT 300  
 GGGGAGCCTG GGCATTTCC ACACCTAAC TGACAGACAT TCCACAGAT TAAATTECC 360  
 177 12=18bp  
 347 8  
 AGTTATTAAT AGTAATCAAT TACGGGGTCA TTAGTTCATA GCCCATATAT GAGTTCCGC 420  
 GTTACATAAC TTACGGTAAA TGGCCCGCT GGTGACCCGC CCAAGCACC CGGCCCATG 480  
 ACGTCAATAA TGACGTATGT TCCCATAGTA AGCCCAATAG GGACTTTCCA TTGACGTCAA 540  
 CVM 70E-9-1707H-567bp  
 TGGGTGGACT ATTTAGGGTA AACTGCCAC TTGGCAGTAC ATCAAGTGTG TCATATGCA 600  
 AGTACGCCGC CATTGACGT CAATGACGGT AAATGCCCG CCTGGCATTA TGCCAGTAC 660  
 ATGACCTAT GGGACTTTC TACTTGGCAG TACATCTAGC TATTAGTCAT CCGTATTACC 720  
 ATGGTACGC GGTTTTGGCA GTACATCAAT GGGCTGGAT ACGGTTTGA CTCACGGGA 780  
 TTCCAAATC TCCACCCCAT TGAGCTCAAT GGGAGTTTGT TTTGCCACCA AAATCAAGCG 840  
 GACTTTCCAA AATGTGCTAA CAATCCGCC CCATTGACGC AAATGGCCG TAGCCGTGT 900  
 177 12=18bp  
 927 8  
 CCGTGGAGG TCTATATAAG CAGAGCTGGG TACGTTGACCC GTCCAGTECC CTGGAGAGC 960

【 1 4 】

14

Bl. 2 1 整頓開始 天然のL-シ-96bp  
 GTTTCCTCC CCCCCTGCC TTCTTGACC CTGGAGGTC CCATCCCA TGTCTTTC 1860  
 TAAATAATG AGGAATTC ATCCGATGT CTGATAGGT GTCACTTCT TCTGGGGGGT 1920  
 21 成基本山主ンボリフニル化糖=231bp  
 GGGGTGGGC AGCACACA GGGGGAGGAT TCGGAAGACA ATGCAAGCA TGTGGGGAT 1980  
 177 12=18bp  
 2002 3  
 GCGTGGGT CTATGGAGC AGTGGGGCT CCGATCAT GCCAGTACG CCCCCTATTG 2040  
 AGCTAATGA CGGTAAATGG CCCCCTGGC ATATGCCCC ATACTGACC TTATGGACT 2100  
 TTCTACTTC GGAGTATC TAGCTATTAG TCACTGCTAT TACCATGGTG ATGGGGTTT 2160  
 CVM 70E-9-1707H-594bp  
 GGCAGTACAT CAATGGGGT GGTAGCCGT TTACTCAG GGGATTCCA AGTCTCCACC 2220  
 CCATTGACGT CAATGGGAGT TTGTITGGC ACCAAAATCA ACGGGACTTT CCAAATGTC 2280  
 GTAAACACT CGCCCATG AGCAAAATGG GCGGTAGGG TGTACGGTG GAGGTCTATA 2340  
 177 12=18bp  
 TAAAGCAGC TGGTACCTC CTCACATCA GTGATCAGCA CTGAAACAG ACCCGTCCAC 2400  
 2550 9  
 1 整頓開始 合成 & 天然 L-シ-96bp  
 ATGGTTTGA GCCTCATCT GTCCCTGTTG CTAGCGCTG CCTGTCAG 2460  
 2401  
 177 12=18bp  
 2550 9  
 GTACACTC AGCAGCCTG GGTGAGCTG GTGAGCCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTC 2520  
 TGAAGACT CTGGCTACAC AATTACCAT TACAATATG ACTGGGTAAA ACAGACACT 2580  
 重鎖可変領域=393bp=121アミノ酸  
 GGTCCGGCC TGGAAATGAT TGGACTATT TATCCGGAA ATGGTATAC TTCTACAT 2640  
 CAGAAGTCA AAGGCAAGGC CAGATTGACT GGAGCAAA CTCCAGCAGC AGCCTACAT 2700  
 CAGCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACTCT GGGTCTATT ACTGTGCCAAG ATGCACTTAC 2760

【 15 】

15

TAGGGGGT ACTGTACT CAATGTCTGG GGGGAGGGA CACGGTCA CCGTCTGCA 2820  
 NYL1  
 GCYHACCA AGGGCCATC GGTTCCTCCC GTGGACCCCT CTECAAGAG CACCTCTGG 2880  
 GGCAGCGG CCTTGGCTG CCTGGTCAAG GACTACTCC CGAAACCGGT GACGGTGTCC 2940  
 TGGAACTAG GCGCCCTGAC CAGCGCGTG CACACCTTC CCGTGTGCT ACAGTCTCA 3000  
 330 アミノ酸と終結コード  
 GGACTTACT CCTCAGCAG CGTGTGACC GTGCCCTCA GAGCTTGG CACCCAGACC 3060  
 TACATCTGA ACGTGAATCA CAGGCCAGC AACACCAAGG TGGACAACA AGCAGAGGCC 3120  
 AATCTTGG ACAAACCTCA CACATGCCA CCGTCCAC CACCTGAAC CCTGGGGGA 3180  
 CCGTCAGT TCTCTTCCC CCCAAACCC AMGGACACC TCATGATC CCGGACCCCT 3240  
 GAGTTCACAT GCGTGTGGT GGACTGAC CAGAGACC CTGAGGTCAA GTTCACTGG 3300  
 TACGTGACG GGTGGAGT GCATAATGCC AAGACAAGC CCGGGGAGA GCAATACAC 3360  
 ACCAGTACC GTGTGTGAG GTCCTCAC GTCCTGACC AGGACTGCT GAATGGCAAG 3420  
 GAGTACAGT GGAAGTCT CAACAAGCC CTCACAGCC CCATGGAGA AACCATCTC 3480  
 AAGCCMAA GGGAGCCCG AGAACACAG GTGTACACC TGCCCCCATC CCGGATGAG 3540  
 CTGACCAAG ACCAGTGC CTTGACTG GGTGTCAA GCTTCTATCC CAGCGACATC 3600  
 GCGTGGAG GGGAGAGGAA TGGGGAGCC GAGAACAAC ACAAGACCAC GCCTCCCGT 3660  
 CTGGACTCC AGCGCTCTT CTTCCTCTAC AGCAAGCTCA CCGTGGACAA GAGCAGTGG 3720

【 16 】

16

CAGCAGGGA ACGTCTTCT ATGCTGCTG ATGCAIDAGG CTCTGCACAA CCACTACAG 3780  
 CAGAAGACC TCTCCCTGT TCCGGTAAA TTAGGATCCG リンカー #7=81bp  
 AGACTGGATT CGTGACAACA TGGCGCCGT ATATCTAGT ATGATCAGC TCGACTGTGC 3840  
 3813 4  
 CTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTGGC CTCGCCGT GCCTCTCTG ACCCTGGAG 3900  
 3884 5  
 GTGCCATCC CACTGTCTT TCCATAAATA ATGAGGAAAT TGCATGGCAT TGTCTGAGTA 4020  
 マウスβ-グロブリン主鎖プロモーター=231bp  
 GGTGTCTTC TATTCTGGG GGTGGGTGG GGCAGACAG CAAGGGGAG GATGGGAAG 4080  
 リンカー #8=24bp  
 ACAATAGCAG GCATGCTGG GATGGGTGG GCTCTATGGA ACCACTGGG GCTCGAC 4140  
 4125 6  
 GCTGGATCT CCGATCCCA GCTTTGTTT TCAATTCTT ATTGGATCAA TGAGAAAAA 4200  
 AGAAAAATA ATTITTAAC CAATTCAGTA GTTGATTGAG CAATGGCTT GCCAAAAAG 4260  
 マウスβ-グロブリン主鎖プロモーター=368bp  
 ATGCTTTAGA GACAGTGGT CTCTGCAGA TAAGGACAAA CATTATTCAG AGGAGTACC 4320  
 CAGAGCTGAG ACTCTAAGC CAGTGAAGC CAGGACATC TAGGGAGAAA TATGCTTGT 4380  
 ATCACGAAG CCGTATGCG TAGAGCCACA CCTTGGTAG GGCCAATCTG CTCACACAG 4440  
 ATAGAGAGG CAGGAGCCAG GGCAGCCAT ATAAGGTGAG GTAGGATCAG TTGCTCTCA 4500  
 リンカー #9=19bp  
 CATTGCTTC TGACATAGT GATTTGGAG CTGGAGACC TCGTCAAGT DHFR=82bp  
 4525 6  
 ATTTCCGCC AACACTGAC GAACTCTAG CCGAAGGCT GGTAGGATT TATCCCCGT 4620

【 17 】

17

DHFR開始  
 GCCATGCG TTGGACCAT GAATGTCATC GTCCCGCTG CCCAAATAT GGGGATTGG 4680  
 4626 7  
 AAGAACGGAG ACCTACCCTG CCTCCGCTC AGAACGAGT TCAGTACT CCAAGAATG 4740  
 ACCACACCT CTTAGTGGG AAGTAAACAG AATCTGGTA TTAGGGTAG GAAACCTGG 4800  
 DHFR=564bp=187 アミノ酸と終結コード  
 TTCTCATTC CTGAGAAGAA TGACCTTTA AAGCACAGAA TTAATATAG TCTCAGTAGA 4860  
 GACTCAAG AACACACCGA AGGAGCTAT TTCTTCCCA AAGTTTGGG TGATGCCCTA 4920  
 AGACTTATG ACCAACCGA ATTGGCAGT AAGTAGACA TGGTTGGAT ACTCGGAGG 4980  
 AGTTCTGTT ACCAGGAGC CATGAATCAA CCAGCCACC TTAGACTTT TGTGACAGG 5040  
 ATCATGAGG AATTITNAAG TGACAGGTTT TTCCAGAAA TTGATTTGGG GAAATATAA 5100  
 CTCTCCAG AATACCAGG CCGTCTCTC GAGTCCAGG AGGAAAAG CATDAAGTAT 5160  
 DHFR終結  
 AAGTTGAG TCTAGAGAA GAAGACTGAG CAGGAAGATG CTTCAAGT CTCTGCTCC 5220  
 3' 未翻訳 DHFR=82bp  
 CTCTAAGC TATGCTATT TATMGACCA TGGGACTTTT GCTGGCTTTA GATCAGCTC 5280  
 5140 1  
 GACTGTGCT TATAGTGGC AGCCATCTGT TGTTTGGCC TCCCGCTGC CTTCTTGGC 5340  
 5272 3  
 CTGGAAGT GCCACTCECA CTGTCTTTC CTAATAAAT GAGGAAATG CATGCCATTG 5400  
 ワシ成長ホルモンプロモーターニル化領域=281bp  
 TCTGAGTAG TGTCAITCTA TTCTGGGGGG TGGGGTGGG CAGGACACA AGGGGGAGGA 5460  
 リンカー #11  
 TTGGGAAGC AATAGCAGC ATGCTGGGA TCGGTGGCC TCTATGAAAC CACTGGGGC 5520  
 =17bp  
 TCGACTACT AGCTTTGCT CTAATTCTT TATTTCGATA ATGAGAAAAA AAGGAAAAAT 5580  
 5530 4

【 18 】

18

AATTTTACA CCAATTCAGT AGTTGATGA GCAATGGT TGGCAAAAAG GATGCTTTAG 5640  
 マウスβ-グロブリン主鎖プロモーター=368bp  
 AGACAGTGT CTCTGACAG ATAAGGACAA CTAGGAGAAA ATATGCTGT CATAACGAA 5700  
 GACTCTAAG CCAAGTGAAG GCACAGCATT CTAGGGAGAA ATATGCTGT CATAACGAA 5760  
 GCTGATCC STAGAGCCAG ACCTTGGTAA GGGCCAACT CCTCACACAG GATAGAGG 5820  
 GCAGAGCCA GGGCAGAGCA TATAGGTGA GGTAGATCA GTTGCTCTC ACAATTGCTT 5880  
 リンカー #12=21bp  
 CTGACATAG TGTCTTGGG CTTGGATGG AITCTGAGG GTTGAACAAG ATGGAATGA 5940  
 5896 12  
 CCGAGTCT CCGGCCGCTT GGTGGAGAG GCTATTCGG TATGACTGG CACACAGAC 6000  
 AATCGCTGC TCTGATGCG CCGTGTGCG GCTCTGACC CAGGGGGCC GGGTTTCTT 6060  
 ネオマインホスホトランスフェラーゼ=795bp=264アミノ酸と終結コード  
 TGTCHAGGC GACTGTGCG GTGCCCTGAA TGAATCCAG GAGGAGCAG CCGGCTATC 6120  
 GTGGCTGCC AGCAGGGGG TTCTTGGCC AGCTGTGCTC GAGGTTGCTA CTGAAGCCG 6180  
 AAGGGACTG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGCCAGGAT CTTCTGTCT CACACCTGC 6240  
 TCTTCCGAG AAGATATCCA TCAATGCTGA TGAATGCG GCGCTGCATA CCGTTGATC 6300  
 GGCACCTGC CCATTCGAC ACACAGCAA ACATCCATC GAGCAGCAC GACTCGGAT 6360  
 GGAAGCCGT CTTGTGATC AAGATGAT GGCAGGAAG CATCAGGGCC TGGGGCCAGC 6420  
 CCAACTGTC GCCAGGCTA AGGGGGCAT GCCCGAGCC GAGGATCTCG TGTGACCCA 6480  
 TTGGCAATG TCGTTGGCA ATATCATGT GGRAMATGG CCGTTTTCTG GATTCATGA 6540  
 CTGTGGCCG CTGGGTGG CCGACCCTA TCAGACATA GCGTTGGCTA CCCGTATAT 6600

【 19 】

19

TGCTGAAGAG CTGGGGGCG AATGGGCTGA CCGTTCCTC GTGCTTTACG GTATGGCCGC 6660  
 TCCCGATTGG CAGCGGATGG CCTTCTATCG CCTCTTGAC GAGTCTCTCTCGAGCGGGACT 6720  
 CTGGGGTTGG AAATGACCGA CCAAGCGAGC CCAACCTGC CATCADGAGA TTTCCGATTC 6780  
 ACCGCCCTCT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTT TCGGGACGC CGGCTGGATG 6840  
 ATCTCCAGC CGGGGATCT CATGTGGAG TCTTGGGCC ACSCDPACTT GTTTATGCA 6900  
 GCTTATATG GTTACAAATA AAGCAATAGC ATCAAAAT TCACAAATAA AGCATTTTT 6960  
 TCACTGCAAT CTAGTTGTGG TTGTGCAAAA CTCAATAC TAICTTATCA TGTCTGGGATC 7020  
 GGCGCCGGA TCCGCTCAG 7080  
 リンカー<sup>418=19bp</sup>  
 SV40初期ポリマーニル化領域=133bp  
 PUC<sub>19</sub>  
 ATTTTATCC GCTCACAATT CCACACAACA TAGGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAAGCTC 7140  
 GGGTGCCTA ATGATGAGCG TAACCTACAT TAATGGCTT GCGCTCACTG CCGGTTTCC 7200  
 AGTGGGAAA CCTGTGTGCG CAGCTGGATT AATGAATCGG CCAAGCGGCG GGGAGAGCG 7260  
 GTTTGGGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCCT CGCTCACTGA CTGGCTGCGC TCGGTCTTC 7320  
 GCGTGGGCG AGCGGATACA GTCACACTCA AAGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATAG 7380  
 GGGATAAAG AGCAAAAGAG ATGTGAGCAA AAGCCGACGA AAAGCCGACG AACCGTAAA 7440  
 AAGCCGCGTT CACTGATAGC TCCGCTCAGC TCCGCGCGCG TGACGAGCAT CACAAAATC 7500

【 20 】

20

GAGCGTCAAG TCAGAGGTGG CGAAAGCCGA CAGGACTATA AAGTACCAG CCGTTTCCCC 7560  
 CTGGAAGCTC CCTGGTGGCG TCTCCTGTTT CGACCTGCGC GCTTACCGGA TACCTGTGCG 7620  
 CCTTTCTCCC TTGGGGAAGC GTGGGGTCTT CTCATGCTC ACGCTGAGG TATCTCAGT 7680  
 CGGTGTAGT CCGTTCGCTC AAGCTGGGCT GTGTGCAGCA ACCCCCGTT CAGCCCGACC 7740  
 GCTGGCGTT ATCCGTTAAC TATCGCTTGG AGTCAACCC GGTAGACAC GACTTATCGC 7800  
 CACTGGCAGC AGCCACTGTT AACAGGATTA GCAGAGCGAG GTATGTAGCG GGTGCTACAG 7860  
 AGTCTTGAAG GTGCTGGCTT AACCTACGGT ACAGTAGAAG GACAGTATTT GGTATCTCGG 7920  
 CTCTGTGAA CCCAGTACC TTGGGAAAA GAGTGTGTAG CTCCTGATCC GGCACAAAA 7980  
 CCACCGTGG TAGCGTGTGTTTTTTGTTT GCAAGGACCA GATTACGCGC AGAAAAAG 8040  
 GATCTCAAGA AGATCGTTTG ATGTTTTCTA CCGGGTCTGA GCGTCACTGG AACGAAACT 8100  
 CAGCTTAAGG GATTTTGTCT ATGAGATTAI CAAAAAGGAT GTTCCACCTAG ATCCTTTTAA 8160  
 ATTAATAATG AAGTTTTTAA TCAATCAAAA GTATATATGA GTAAACTTGG TCTGACACTG 8220  
 TCAACTGTTT AACTCAGTGG GCACTATCT CAGCGATCTG TCTATTTCTG TCACTCCATG 8280  
 TTGCTGACT CCCCCTGCTG TAGATACTA CGATACGGA GCGCTTACCA TCTGGCCCA 8340  
 GTGCTGCAAT GATACCGCA GACCCAGCT CACCGCTCC AGATTATCA GCAATAACC 8400  
 ACCCACCGCG AAGGCGCAG CCGAAGTGG GTCTGCAAC TTATTCGCG TCACTCCACT 8460  
 CTATTAATTG TTGCGGGAAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC AGTTAATAGT TTGCGCAGG 8520

【 21 】

21

TTGTCCCAT TGCTACAGGC ATGTGGTGT CACGCTGTC GTTTGGTATG GCTTCAITCA 8560  
 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AAGCGAGTTA CATGATCCC CATGTTGTGC AAAAAGCGG 8640  
 TTAGCTCCTT CCGTCTCCCG ATGCTTGTCA GAAGTAAATG GCGCCAGTGG TTATCACTCA 8700  
 TGGTATGGC AGCACTGGAT AATTCCTTA CTGTCAAGC ATCCGTAAGA TCGTTTTCTG 8760  
 TGACTGGTGA GTACTACACC AAGTCACTCT GAGATAGTG TATGGGCGCA CCGATTTGCT 8820  
 CTTCGCCGCG GTCAATACGG GATAATACCG CCGCAGATAG CAGAGCTTTA AAGTGTCTCA 8880  
 TCAITGGAAA ACGTTCCTCG GCGGCAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940  
 GGTGATGTA ACCCACTGT GCACCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACAGCG 9000  
 TTTCGGGTG AGCAAAACA GGAAGCAAA ATCCCGCAA AAAGGGAATA AGGCGALAC 9060  
 GGAATGTTG AATACTCTA CTTCTCTTT TTCAATATA TTGAAGCATI TATCAGGTT 9120  
 ATTCTCAT GAGCGGATAC ATAITGAAT GTATTIAGAA AAATAAACAA ATAGGGTTC 9180  
 CCGCCACATT TCCCGGAAA GTGCCCT

【 22 】

22

リ-ジ-

20 23 24 27 29 30 34  
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Val Ser Ile Ser Ala Ser Val  
 CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGG AGG GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATC CAC  
 1095 1104 1113 1122 1131 1140  
 25 PR2 40 45 49 50 CDB2  
 Trp Phe Glu Glu Lys Pro Gly Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn  
 TGG TTC CAG CAG AAG CCA GCA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC  
 1152 1161 1170 1179 1188 1197  
 55 56 57 60 FR3 65 70  
 Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser  
 CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT  
 1209 1218 1227 1236 1245 1254  
 75  
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Tyr Cys Glu Trp  
 CTC ACC ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TCC CAG CAG TGG  
 1266 1275 1284 1293 1302 1311  
 CDB3 95 97 98 100 FR4 105 107  
 Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 ACT AGT AAC CCA CCC ACC TTC CGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA  
 1323 1332 1341 1350 1359

【 21 】

21

TTGTCCCAT TGCTACAGGC ATGTGGTGT CACGCTGTC GTTTGGTATG GCTTCAITCA 8560  
 GCTCCGGTTC CCAACGATCA AAGCGAGTTA CATGATCCC CATGTTGTGC AAAAAGCGG 8640  
 TTAGCTCCTT CCGTCTCCCG ATGCTTGTCA GAAGTAAATG GCGCCAGTGG TTATCACTCA 8700  
 TGGTATGGC AGCACTGGAT AATTCCTTA CTGTCAAGC ATCCGTAAGA TCGTTTTCTG 8760  
 TGACTGGTGA GTACTACACC AAGTCACTCT GAGATAGTG TATGGGCGCA CCGATTTGCT 8820  
 CTTCGCCGCG GTCAATACGG GATAATACCG CCGCAGATAG CAGAGCTTTA AAGTGTCTCA 8880  
 TCAITGGAAA ACGTTCCTCG GCGGCAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA 8940  
 GGTGATGTA ACCCACTGT GCACCAACT GATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACAGCG 9000  
 TTTCGGGTG AGCAAAACA GGAAGCAAA ATCCCGCAA AAAGGGAATA AGGCGALAC 9060  
 GGAATGTTG AATACTCTA CTTCTCTTT TTCAATATA TTGAAGCATI TATCAGGTT 9120  
 ATTCTCAT GAGCGGATAC ATAITGAAT GTATTIAGAA AAATAAACAA ATAGGGTTC 9180  
 CCGCCACATT TCCCGGAAA GTGCCCT

【 22 】

22

リ-ジ-

20 23 24 27 29 30 34  
 Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Val Ser Ile Ser Ala Ser Val  
 CCA GGG GAG AAG GTC ACA ATG ACT TGG AGG GCC AGC TCA AGT GTA AGT TAC ATC CAC  
 1095 1104 1113 1122 1131 1140  
 25 PR2 40 45 49 50 CDB2  
 Trp Phe Glu Glu Lys Pro Gly Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn  
 TGG TTC CAG CAG AAG CCA GCA TCC TCC CCC AAA CCC TGG ATT TAT GCC ACA TCC AAC  
 1152 1161 1170 1179 1188 1197  
 55 56 57 60 FR3 65 70  
 Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser  
 CTG GCT TCT GGA GTC CCT GTT CGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACT TCT TAC TCT  
 1209 1218 1227 1236 1245 1254  
 75  
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Tyr Cys Glu Trp  
 CTC ACC ATC AGC AGA GTG GAG GCT GAA GAT GCT GCC ACT TAT TAC TCC CAG CAG TGG  
 1266 1275 1284 1293 1302 1311  
 CDB3 95 97 98 100 FR4 105 107  
 Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 ACT AGT AAC CCA CCC ACC TTC CGA GGG GGG ACC AAG CTG GAA ATC AAA  
 1323 1332 1341 1350 1359

【 図 2 3 】

図 23 リーダー

```

-19          -15          -10          -5
フレーム 1 Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg Val
             ATG GGT TGG AGC CTC ATC TTG CTC TTC CTT GTC GCT GTT GCT ACG CGT GTC
             2409          2418          2427          2436          2445

-11 +1          FR1          10          15
Leu Ser| Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
CTG TCC| CAG GTA CAA CTG CAG CAG CCT GGG GCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA
             2460          2469          2478          2487          2496          2505

20          25          30 31 CDR1          35 36
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACA TTT ACC AGT TAC AAT ATG CAC TGG
             2517          2526          2536          2544          2553          2562

40 FR2          45          49 50          52 52A 53 54
Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr Pro Gly Asn
GTA AAA CAG ACA CCT GGT CGG GGC CTG GAA TGG ATT GGA GCT ATT TAT CCC GGA AAT
             2574          2583          2592          2601          2610          2619

55          CDR2          60          65 66 FR3          70
Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys
GGT GAT ACT TCC TAC AAT CAG AAG TTC AAA GGC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA
             2631          2640          2649          2658          2667          2676

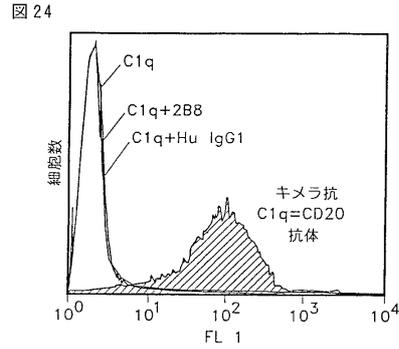
75          80          82 82A 82B 82C 83          85
Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC
             2688          2697          2706          2715          2724          2733

90          94 95          CDR3          100 100A 100B 100C 100D 101 102 103
Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly
TAT TAC TGT GCA AGA TCG ACT TAC TAC GGC GGT GAC TGG TAC TTC AAT GTC TGG GGC
             2745          2754          2763          2772          2781          2790

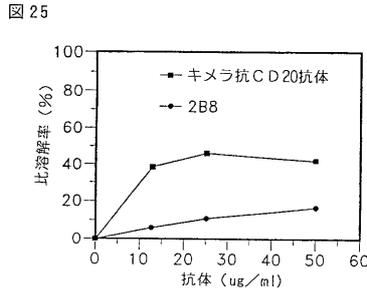
105 FR4          110          113
Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ala
GCA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCT GCA
             2802          2811          2820

```

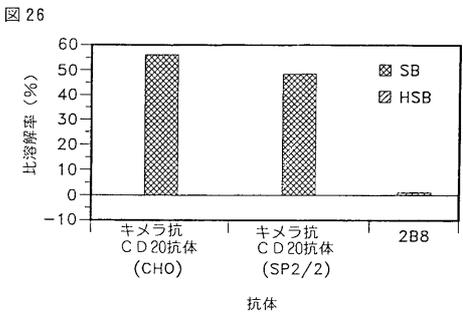
【 図 2 4 】



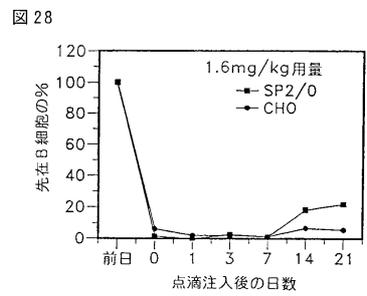
【 図 2 5 】



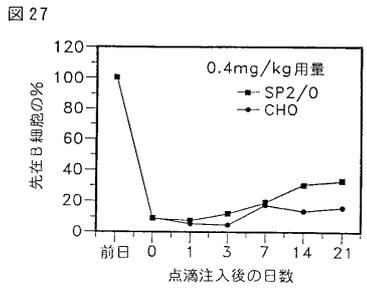
【 図 2 6 】



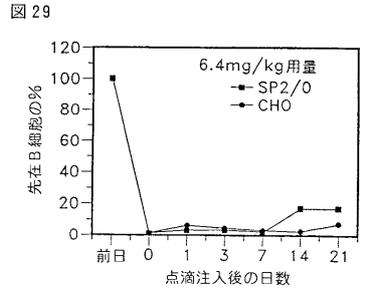
【 図 2 8 】



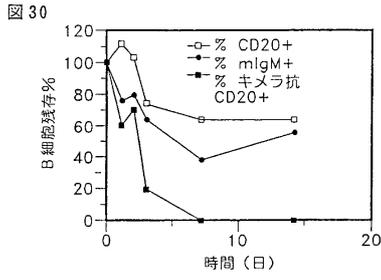
【 図 2 7 】



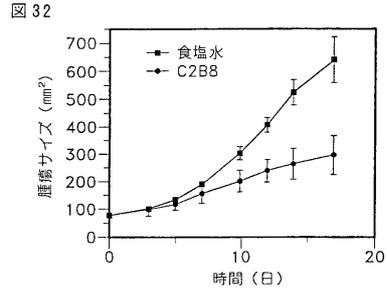
【 図 2 9 】



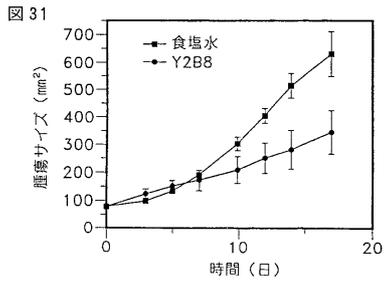
【 図 3 0 】



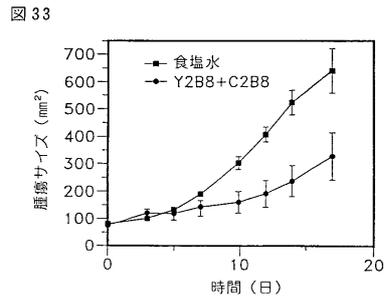
【 図 3 2 】



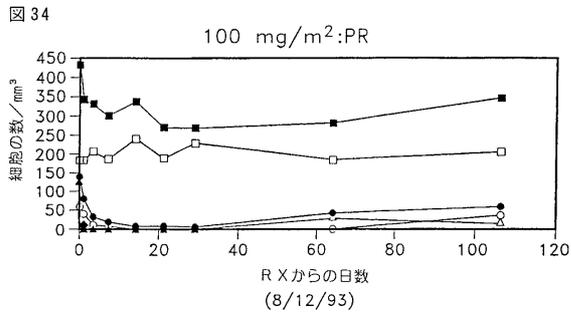
【 図 3 1 】



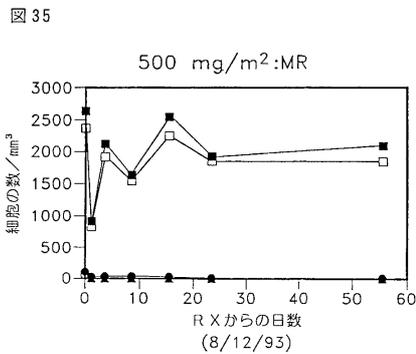
【 図 3 3 】



【 図 3 4 】



【 図 3 5 】



【配列表】

0004203080000001.app

## フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I  
A 6 1 K 39/395 (2006.01) A 6 1 K 39/395 G
- (72)発明者 アンダーソン, ダレル アール.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 2 9, エスコンディドー, ナバト プレイス 1 8 5 1
- (72)発明者 ラステッター, ウィリアム エイチ.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 6 7, ランチョ サンタ フェ, ピュエルタ デル ソ  
ル, 1 6 0 6 7
- (72)発明者 ハンナ, ネイビル  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 2 4, オリベンハイン, フォーチュナ ランチ ロード  
3 2 5 5
- (72)発明者 レナード, ジョン イー.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 0 2 4, エンシニタス, アベニダ ジョアキン 1 9 6 0
- (72)発明者 ニューマン, ローランド エー.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 2, サンディエゴ, ロビンス ストリート 4 3 1 1  
1
- (72)発明者 レフ, ミッチェル イー.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 1 2 2, サンディエゴ, コーム ウェイ 4 1 6 6

審査官 森井 隆信

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 5 / 1 0  
C 1 2 P 2 1 / 0 8  
C 0 7 K 1 6 / 0 0  
BIOSIS / MEDLINE / WPIDS (STN)  
GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq  
UniProt / GeneSeq  
PubMed

专利名称(译)	嵌合抗体和放射性标记抗体对人B淋巴细胞特异性分化抗原治疗B细胞淋巴瘤的临床应用		
公开(公告)号	<a href="#">JP4203080B2</a>	公开(公告)日	2008-12-24
申请号	JP2006135870	申请日	2006-05-15
[标]申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司公司 拜奥根有限公司		
申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司公司		
当前申请(专利权)人(译)	Biogen Idec公司公司		
[标]发明人	アンダーソンダレルアール ラステッターウィリアムエイチ ハンナネイビル レナードジョンイー ニューマンローランドエー レフミッチェルイー		
发明人	アンダーソン,ダレル アール. ラステッター,ウィリアム エイチ. ハンナ,ネイビル レナード,ジョン イー. ニューマン,ローランド エー. レフ,ミッチェル イー.		
IPC分类号	C12N5/10 C12P21/08 C12N15/09 C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395 C12N15/02 A61K31/375 A61K31/573 A61K31/664 A61K31/704 A61K38/00 A61K45/00 A61K47/48 A61K51/00 A61K51/08 A61K51/10 A61P35/00 C12N1/21 C12N5/02 C12P21/02 C12R1/91 G01N33/53		
CPC分类号	A61K38/00 A61K47/6849 A61K51/1027 A61K51/1093 A61K2039/505 A61P35/00 C07K16/2887 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/732 C07K2319/00 C12N2799/028 Y10S424/80 Y10S424/801 Y10S530/808 Y10S530/809 Y10S530/867		
FI分类号	C12N5/00.ZNA.B C12P21/08 C12N15/00.A C07K16/28 C07K16/46 A61K39/395.G C12N5/00.BZN.A C12N5/00.102 C12N5/10		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/FA02 4B024/GA11 4B024 /HA01 4B024/HA03 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CC24 4B064/DA01 4B065/AA91X 4B065/AA94Y 4B065/AB00 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4C085/AA16 4C085/BB01 4C085 /BB50 4C085/CC05 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/DD88 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA42 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	07/978891 1992-11-13 US 08/149099 1993-11-03 US		
其他公开文献	JP2006262907A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		
摘要(译)			

要解决的问题：提供一种新的抗体，其诱导抗CD20抗体依赖性细胞介导的细胞裂解成CD20 + 细胞及其用途。一种嵌合抗体，其诱导针对CD20 + 细胞的抗CD20抗体依赖性细胞介导的细胞溶解，并且其基本上由具有ATCC保藏号69119的转染瘤产生，一种嵌合抗CD20抗体，具有相同的B细胞耗竭活性。【选择图】无

線量レベル	線量 (mCi)
1	20
2	30
3	40