



PCT

(10) 国際公開番号

WO 2006/106959 A1

(43) 国際公開日

2006 年 10 月 12 日 (12.10.2006)

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)
A61P 7/00 (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)
A61P 7/06 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2006/306925

(22) 国際出願日: 2006 年3 月31 日 (31.03.2006)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
 特願2005-103093 2005 年3 月31 日 (31.03.2005) JP
 特願 2005-378466
 2005 年12 月28 日 (28.12.2005) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): バイオメディクス株式会社 (BIOMEDICS INC.) [JP/JP]; 〒1120004 東京都文京区後楽一丁目1 番1 0号 Tokyo (JP).

(72) 発明者; および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 沼崎 正徳 (NUMAZAKI, Masanori) [JP/JP]; 〒1120004 東京都文京区後楽一丁目1 番1 0号 バイオメディクス株式会社内 Tokyo (JP). 中村 徹雄 (NAKAMURA, Tetsuo) [JP/JP]; 〒1120004 東京都文京区後楽一丁目1 番1 0号 バイオメディクス株式会社内 Tokyo (JP). 臼田 定和 (USUDA, Sadakazu) [JP/JP]; 〒1120004 東京都文京区後楽一丁目1 番1 0号 バイオメディクス株式会社内 Tokyo (JP). パドラン, エドアルド エー. (PADLAN, Eduardo A.) [US/US]; 20895 メリーランド州ケンジントン, シンムス ドライブ 4 0 0 6 Maryland (US).

(74) 代理人: 川口 嘉之, 外(KAWAGUCHI, Yoshiyuki et al.); 〒1030004 東京都中央区東日本橋3 丁目4 番1 0号 アクロポリス2 1ビル6階 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MG, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:
 — 国際調査報告書
 — 補正書
 — 電子形式により別個に公開された明細書の配列表部分、請求に基づき国際事務局から入手可能

2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: ANTI-CD-20 MONOCLONAL ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗CD20モノクローナル抗体

Human CD20 5' primer ((配列番号13) AA
hCD20-S-GK-Not aatgcggccgccaccatgacaacaccagaaattc
Human CD20 3' primer ((配列番号14) BB
hCD20-E-Xba gctctagattaaggagagctgtcattttc

AA SEQ ID NO:13

BB SEQ ID NO:14

(57) Abstract: Disclosed is a monoclonal antibody capable of inducing a specific biological reaction through the binding of the monoclonal antibody to a CD-20 antigen on the surface of a cell. A monoclonal antibody having a high binding affinity to an extracellular epitope of a CD-20 antigen and also having biological activities including a cell growth inhibitory activity is cloned. The monoclonal antibody is chimerized or humanized to develop a therapeutic agent for a disease in which B cells are involved.

(57) 要約: 細胞表面のCD20抗原に結合することにより特異的な生物学的反応を誘導するモノクローナル抗体を提供する。CD20抗原の細胞外エピトープに対して強い結合親和性を有し且つ細胞増殖阻害活性等の生物学的活性を有するモノクローナル抗体をクローニングする。さらにそのモノクローナル抗体をキメラ化又はヒト化することによりB細胞が関与する疾患に対する治療薬を開発する。

明 細 書

抗CD20モノクローナル抗体

技術分野

- [0001] 本発明は、ヒトCD20抗原に対するモノクローナル抗体に関し、さらには遺伝子組換によるキメラ抗CD20モノクローナル抗体及びヒト化抗CD20モノクローナル抗体、又はこのいずれかを有効成分とするB細胞性腫瘍または免疫疾患に対する治療薬に関する。

背景技術

- [0002] CD20抗原を認識するモノクローナル抗体としては、B1, 2B8(キメラ抗体名はrituximab)、1F5、2H7などが知られている。なかでも、米国IDEC Pharmaceuticals Corporationにより開発されたキメラ抗CD20モノクローナル抗体であるrituximabは低悪性度非ホジキンリンパ腫(NHL)の標準治療薬として確立している他、B細胞が関与する多くの免疫疾患に対して治療効果があることが明らかにされている。例えば、慢性リンパ性白血病などの悪性腫瘍のほかに自己免疫溶血性貧血症、特発性血小板減少症、紫斑病などの病原性自己抗体が関与していると考えられる自己免疫疾患、慢性関節リウマチや多発性硬化症といった炎症性疾患に対して効果的とされる(非特許文献14～17)。
- [0003] CD20はBリンパ細胞表面に発現している分子であり、末梢血、脾臓、扁桃、骨髄中の正常B細胞などの他ほとんどの悪性腫瘍B細胞に発現がみられる。この分子は297アミノ酸よりなり、細胞膜を4回貫通しC末端、N末端の両方を細胞内に有し、3回目と4回目膜貫通ドメイン間に糖鎖不含の43アミノ酸残基よりなる唯一の細胞外に露出したループをもつ(非特許文献1、9)。CD20分子は通常4量体として存在し、さらに他のマイナーな成分とヘテロな複合体を形成しているものと考えられている(非特許文献18)。CD20タンパクは、細胞外への分泌や切断が無いのに加え、抗体結合による細胞内への取り込みがほとんど無いことから、抗体による標的細胞に対する細胞傷害性メカニズムが効果的に働くことが期待できる(非特許文献1～3)。
- [0004] 分子サイズが小さいにも拘わらず、CD20は細胞外における複合体としての発現形

態の影響もありエピトープは多様性を有し、それに結合する抗体はさまざまに異なる生物学的応答を介在する。例えば、B細胞レセプターのダウンレギュレーション、MHCクラスII抗原や接着分子の発現増加、hyper-cross-linking下でのCa²⁺放出活性化、リンパ細胞の機能関連のantigen 1非依存性同型接着の阻害、アポトーシス誘導またはその逆の細胞増殖促進などの活性が大きく異なっている(非特許文献4～13)。代表的抗CD20抗体であるrituximab、B1、1F5、2H7においても、その特性及び生物学的機能は異なっており、CD20に結合するモノクローナル抗体というだけではその生物学的性質を特定し得ない。

[0005] CD20の細胞外ドメインを構成する分子は不溶性である。細胞溶解物由来又は遺伝子組換タンパクとしてのCD20分子は界面活性剤又は強アルカリを用いて可溶化し得るが、このような処理条件下では自然の立体構造を維持することは困難である。このため、抗体を得るための免疫原としてCD20陽性B細胞株が用いられるが、免疫刺激性は弱く成熟した抗体産生細胞クローンを得ることは容易ではない。

[0006] 2005年現在、治療薬として認可されている抗CD20モノクローナル抗体はマウス/ヒトのキメラであるrituximabだけである。異種動物とのキメラ分子は抗原性を有するため治療薬として一般には好まれないが、抗CD20抗体は正常細胞を含む全てのB細胞を標的し除去する性質を有するため抗原性がほとんど無いとされている。しかしながら、数パーセントではあるが治療期間中に中和抗体を誘起する事例が報告されており投与する量や期間によってはさらにその可能性が高まることから、よりヒトに近い配列を有するヒト化抗体またはヒト抗体の開発が望まれる。キメラ抗体のもう一つの不利な点は血中半減期が短いことであり、 β 半減期は3～4日に過ぎない。Rituximabの再発低悪性度NHLに対する米国での臨床試験の奏効率は単独投与で50%弱であったことが報告されており、rituximabが効かないかまたは効きの悪い患者が50%以上いることを示している。中悪性度NHLの場合の奏効率はさらに低く30%程度に過ぎない(非特許文献14)。このため、患者により反応が異なる原因・背景の追究が必要であると同時により優れた効果を有する抗体の開発が望まれる。

非特許文献1:Leukocyte Fact Book 2nd Edition, Academic Press

非特許文献2:Stashenko P et al., J Immunol 1980; 125:1678-85

- 非特許文献3:Anderson KC et al., Blood 1984; 63:1424-33
- 非特許文献4:Shan D et al., Blood 1998; 91:1644-52
- 非特許文献5:Flieger D et al., Cell Immunol 2000; 204:55-63
- 非特許文献6:Mathas S et al., Cancer Res 2000; 60:7170-6
- 非特許文献7:Cardarelli PM et al., Cancer Immunol Immunother 2002; 51:15-24
- 非特許文献8:Pedersen IM et al., Blood 2002; 99:1314-9
- 非特許文献9:Deans JP et al., Immunol 2002; 107:176-82
- 非特許文献10:Golay JT et al., J Immunol 1992; 149:300-8
- 非特許文献11:Bourger I et al., Eur J Immunol 1993; 23:768-71
- 非特許文献12:White MW et al., J Immunol 1991; 146:846-53
- 非特許文献13:Shan D et al., Cancer Immunol Immunother 2000; 48:673-83
- 非特許文献14:Coiffier B et al., Blood 1998; 92:1927-32
- 非特許文献15:Edward JC et al., Rheumatology (Oxford) 2001; 40:205-11
- 非特許文献16:Zaja F et al., Haematologica 2002; 87:189-95
- 非特許文献17:Perrotta S et al., Br J Haematol 2002; 116:465-7
- 非特許文献18:Polyak MJ et al., Blood 2002; 99:3256-62

発明の開示

- [0007] 本発明の課題は、従来の抗CD20モノクローナル抗体治療薬よりも優れた生物学的機能を有するモノクローナル抗体を提供することである。
- [0008] 本発明者らは、複数のCD20抗原陽性B細胞株、遺伝子工学的にヒトCD20抗原を細胞膜上に発現させた哺乳動物細胞、及びGST (glutathione S-transferase)タンパクを融合させたヒトCD20タンパクを免疫原として任意に組み合わせて用いることによりヒトCD20抗原に対して特異的に結合するマウス由来抗CD20モノクローナル抗体を得た。このうちいくつかはエフェクター細胞非存在下のin vitro CD20発現細胞培養においてアポトーシスを含む直接的な細胞増殖阻害活性を有していた。また、アポトーシスなどの細胞増殖阻害活性の有無に拘わらず、他の選択されたマウス由来抗CD20モノクローナル抗体も含め、キメラ化により効果的な補体又は抗体依存性の細胞障害性を有した。これらの中から最も望ましい生物学的活性を有すると判断された抗体

のアミノ酸配列をヒト化することにより治療薬として使用できる抗CD20モノクローナル抗体が作製された。これにより、本発明は完成された。

[0009] 本発明は、以下のものを提供する。

(1) エフェクター細胞非存在下でのヒトCD20抗原発現細胞培養において該CD20抗原発現細胞に対してアポトーシスを含む増殖阻害活性を有するマウス由来抗CD20モノクローナル抗体。

(2) H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号1及び7、配列番号2及び8、又は配列番号15及び17である(1)の抗CD20モノクローナル抗体。

(3) (1)又は(2)の抗CD20モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。

(4) (2)の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域アミノ酸配列とヒトイムノグロブリン定常域アミノ酸配列を融合させたキメラ抗CD20モノクローナル抗体。

(5) (2)の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域CDRのアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてヒト化された抗CD20モノクローナル抗体。

(6) H鎖可変領域アミノ酸配列のL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号19及び23、配列番号19及び24、配列番号19及び25、配列番号19及び26、配列番号20及び23、配列番号20及び24、配列番号20及び25、配列番号20及び26、配列番号21及び23、配列番号21及び24、配列番号21及び25、配列番号21及び26、配列番号22及び23、配列番号22及び24、配列番号22及び25、又は配列番号22及び26である(5)のヒト化抗CD20モノクローナル抗体。

(7) ヒト補体存在下でCD20抗原発現細胞に対して細胞障害性を有する(4)～(6)のいずれか1項の抗CD20モノクローナル抗体。

(8) (4)～(7)のいずれか1項の抗CD20モノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を組み込んだ哺乳動物細胞。

(9) CHO細胞である(8)の哺乳動物細胞。

(10) H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号3及び9、配列番号4及び10、配列番号5及び11、配列番号6及び12、又は配列番号16及び18であるマウス由来抗CD20モノクローナル抗体。

- (11) (10)の抗CD20モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
- (12) (10)の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域アミノ酸配列とヒトイムノグロブリン定常域アミノ酸配列を融合させたキメラ抗CD20モノクローナル抗体。
- (13) (10)の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域CDRのアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてヒト化された抗CD20モノクローナル抗体。
- (14) ヒト補体存在下でCD20抗原発現細胞に対して細胞障害性を有する(12)または(13)の抗CD20モノクローナル抗体。
- (15) (12)～(14)のいずれか1項の抗CD20モノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を組み込んだ哺乳動物細胞。
- (16) CHO細胞である(15)の哺乳動物細胞。
- (17) (2)、(4)～(7)、(10)及び(12)～(14)のいずれかの抗CD20モノクローナル抗体を有効成分とする診断薬。
- (18) (4)～(7)及び(12)～(14)のいずれかの抗CD20モノクローナル抗体を有効成分とする治療薬。

[0010] なお、これらに規定されるモノクローナル抗体のアミノ酸配列はその二次構造及びその生物学的性質を有意に変更しないかぎり他のアミノ酸で置換しても良く、そうしたアミノ酸配列を置換したモノクローナル抗体もこの本出願の請求の範囲に含まれる。

図面の簡単な説明

- [0011] [図1]組換え抗体発現用ベクターpNOW-Abの構造を示す。
- [図2]タンパク発現用ベクターpNOW-Agの構造を示す。
- [図3]ヒトCD20遺伝子クローニング用プライマー配列を示す。
- [図4]マウス由来抗CD20モノクローナル抗体可変領域H鎖及びL鎖のアミノ酸配列を示す。
- [図5]マウス由来抗CD20モノクローナル抗体のアポトーシス試験結果を示す。
- [図6]マウス由来抗CD20モノクローナル抗体による細胞増殖阻害試験結果を示す。
- [図7]キメラ抗CD20モノクローナル抗体による補体依存性細胞障害性試験結果を示す。
- [図8A]ヒト化抗CD20モノクローナル抗体可変領域H鎖及びL鎖のアミノ酸配列、及び

それらに対応する塩基配列を示す。

[図8B]ヒト化抗CD20モノクローナル抗体可変領域H鎖及びL鎖のアミノ酸配列、及びそれらに対応する塩基配列を示す。

[図9]ヒト化抗CD20モノクローナル抗体による細胞増殖阻害試験結果を示す。

発明を実施するための最良の形態

- [0012] 本発明において、「抗体」という用語は、抗体全般及びそれを構成するH鎖及びL鎖、及びそれらのフラグメントを包含する意味で用いる。
- [0013] 本発明は、細胞膜上のヒトCD20抗原に結合し、治療効果を誘導するのに望ましい生物学的活性を有する抗CD20モノクローナル抗体に関する。
- [0014] 本発明の第1の態様の抗体は、細胞膜上のヒトCD20抗原に対して特異的に結合するモノクローナル抗体であって、エフェクター細胞の助けを借りることなくヒトCD20抗原発現細胞培養において該ヒトCD20抗原発現細胞に対してアポトーシスを含む増殖阻害活性を有する抗体である。これはオリジナルにはマウス由来抗CD20モノクローナル抗体であり、さらにはこれらをキメラ化又はヒト化した抗CD20モノクローナル抗体をも含む。これらの抗体は、エフェクター細胞の助けを借りることなくin vitroヒトCD20抗原発現細胞培養において該CD20抗原発現細胞に対してアポトーシスを含む直接的な増殖阻害活性を有する。これらのキメラ化又はヒト化した抗CD20モノクローナル抗体は、補体依存性及び／又は抗体依存性の細胞障害性を有する。
- [0015] 細胞膜上のCD20抗原への結合性は、SB細胞やRaji細胞などのCD20発現細胞をプレートに付着させ被検体であるモノクローナル抗体を反応させるCell ELISAにより調べることが出来る。しかしながら、それらの細胞のCD20抗原の発現量が充分ではないことから反応性は鋭敏でない。このため、本発明では遺伝子組換えによりCD20を多量に発現させたCHO細胞(CD20/CHO細胞)をプレートに付着させ、被検体であるモノクローナル抗体を反応させる方式のCell ELISAが開発された。本発明中の予備試験において、CD20/CHO細胞を用いたCell ELISAはモノクローナル抗体の反応性試験においてSB細胞又はRaji細胞を用いたCell ELISAと同様のパターンを示し、且つ鋭敏であることが確認されている(実施例:CD20/CHO Cell ELISAスクリーニング法の確立、表1を参照)。

- [0016] エフェクター細胞非存在下でのin vitroヒトCD20抗原発現細胞培養における直接的な細胞増殖阻害活性の測定は一般的方法により測定できる(Miyamoto T et al. Avian Dis. Vol 46(1), 10-16)。また、アポトーシス誘導能はフローサイトメトリー(Annexin V / PI staining)を用いた試験により測定が可能である。
- [0017] 第1の態様の抗体の事例には、H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号1及び7、配列番号2及び8、又は配列番号15及び17で規定されるマウス抗CD20モノクローナル抗体、さらにはこれらをキメラ化又はヒト化した抗CD20モノクローナル抗体が含まれる。これらの抗体は、エフェクター細胞の助けを借りることなくin vitroヒトCD20抗原発現細胞培養において該CD20抗原発現細胞に対してアポトーシスを含む直接的な増殖阻害活性を有する。これらは又補体依存性及び／又は抗体依存性の細胞障害性をも有する。本発明には、マウス由来抗体を産生するハイブリドーマ、及びキメラ抗体又はヒト化抗体のアミノ酸配列に対応する塩基配列を組み込んだ哺乳動物細胞、(実施例ではCHO細胞)も含まれる。
- [0018] キメラ化は、マウス由来モノクローナル抗体のH鎖可変領域アミノ酸配列とヒトイムノグロブリンH鎖定常領域アミノ酸配列、L鎖可変領域アミノ酸配列とヒトイムノグロブリンL鎖定常領域アミノ酸配列を融合させることにより行われ(Ishida T et al. Nippon Rinsho Vol 60, No 3, 439-444)、ヒト化は、マウス由来モノクローナル抗体の可変領域CDRアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてデザインされる。治療薬として好ましいヒト化抗CD20モノクローナル抗体はさまざまにデザインされた抗体の特性を比較することにより選択される(Padlan EA, Mol Immunol Vol 28, No 4/5, 489-498; Wu TT and Kabat EA, Mol Immunol Vol 29, No 9, 1141-1146; Padlan EA et al., FASEB J Vol 9, 133-139)。
- [0019] キメラ化又はヒト化した抗CD20モノクローナル抗体は、さらに補体依存性細胞障害性(CDC)及びエフェクター細胞存在下で抗体依存性細胞障害性(ADCC)を有する。これらのCDC及びADCCに関する試験方法については一般的に使用されている方法を参照することができる(Manches O et al., Blood 2003; 101(3):949-54; Idusogie E E et al., J Immunol 2000; 164: 4178-4184)。

- [0020] 具体的なヒト化抗CD20モノクローナル抗体の事例は、H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号19及び23、配列番号19及び24、配列番号19及び25、配列番号19及び26、配列番号20及び23、配列番号20及び24、配列番号20及び25、配列番号20及び26、配列番号21及び23、配列番号21及び24、配列番号21及び25、配列番号21及び26、配列番号22及び23、配列番号22及び24、配列番号22及び25、又は配列番号22及び26で示される。
- [0021] 本発明の第2の態様の抗体は、細胞膜上のヒトCD20抗原に対して特異的に結合するマウス由来のモノクローナル抗体であるが、アポトーシスを含む増殖阻害活性を示さないかもしくはその活性がそれほど高くないものである。しかしながら、これらのマウス由来抗体は、キメラ化又はヒト化することによってCDC又はADCC活性を獲得することが可能である。これらの細胞障害性活性も重要な生物学的活性であり、それ故に第2の態様の抗CD20モノクローナル抗体も治療薬としての有望な候補になり得る。
- [0022] 第2の態様の抗体の事例には、H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号3及び9、配列番号4及び10、配列番号5及び11、配列番号6及び12、又は配列番号16及び18であるマウス由来抗CD20モノクローナル抗体、さらにはこれらをキメラ化又はヒト化した抗CD20モノクローナル抗体が含まれる。本発明には、該マウス由来抗体を産生するハイブリドーマ、及び該キメラ抗体及び該ヒト化抗体のアミノ酸配列に対応する塩基配列を組み込んだ哺乳動物細胞、(実施例ではCHO細胞)も含まれる。
- [0023] 細胞膜上のCD20抗原への結合性の判定法、増殖阻害、アポトーシス、ADCC、CD Cなど各種試験法、及びキメラ又はヒト化抗体の作製法は第1の態様の抗体の場合と同様の方法による。
- [0024] 第1の態様及び第2の態様の抗体として記載するキメラ抗CD20モノクローナル抗体又はヒト化抗CD20モノクローナル抗体は、共にB細胞性悪性腫瘍およびB細胞又はB細胞が産生する抗体が関与する免疫疾患に対する治療薬として優れた効果をもつことが期待でき、本発明はキメラ又はヒト化した抗CD20モノクローナル抗体のいずれか、望ましくはヒト化抗CD20モノクローナル抗体を有効成分とする治療薬の開発に供す

ることを目的とする。対象疾患としては、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、急性リンパ性白血病、慢性関節リウマチ、自己免疫溶血性貧血症、特発性血小板減少症紫斑病、全身性エリテマトーデス、抗リン脂質抗体症候群、シェーグレン症候群、クローン病、強皮症、多発性硬化症、I型糖尿病などが挙げられる。

[0025] 本発明のマウス由来モノクローナル抗体は以下の方法で作製することができる。

[0026] 感作免疫抗原として、ヒトCD20抗原を発現する細胞株であるSB細胞、Raji細胞又はヒトCD20抗原を発現させたCHO細胞を組み合わせて用いることができる。また、GSTを融合させたヒトCD20タンパク(GST-CD20)を補完的な感作抗原として用いることもある。

[0027] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製は、(1)被免疫動物である動物(マウス)への免疫、(2)免疫された動物からのリンパ球の調製、(3)親細胞の調製、(4)リンパ球と親細胞の細胞融合、(5)スクリーニング、及び(6)クローニングという一連の手続きにより行うことができる(Ailsa M. Campbell (著), 大沢 利昭 (訳) 生化学実験法;モノクローナル抗体、東京化学同人、1989年)。細胞表面のCD20抗原に特異的に結合する抗CD20モノクローナル抗体のクローニングは、CD20/CHO細胞をプレートに固定したCell ELISAに被検体であるモノクローナル抗体を反応させることにより行うことができる。発現ベクターは市販のものでも可であるが、CHO細胞上にCD20抗原を高密度に発現させる必要があることから哺乳動物細胞高発現ベクターpNOW (特許第3582965号公報)を使用してもよい。モノクローナル抗体の選択基準は、陽性コントロールとの比較において同程度以上の反応性を示すものとする。

[0028] キメラ化及びヒト化抗体の作製は通常の遺伝子組換え法に拠ればよい。例えば、発現ベクターは抗体産生用に2セットのマルチクローニングサイトをタンデムに並べ、且つヒトのH鎖及びL鎖の定常域遺伝子が予め組み込まれたpNOW-Abを用いることができる(図1)。

実施例 1

[0029] CD20抗原に対するモノクローナル抗体の作製、キメラ化及びヒト化、さらに得られた抗体の特性に関する試験を、実施例に基づいて説明する。

[0030] (1)マウス感作用免疫抗原の作製

ヒトCD20全分子をコードする遺伝子に特異的な配列番号13に記載の5'プライマー及び配列番号14に記載の3'プライマーを用いてcDNAライブラリーからヒトCD20遺伝子を切り出した(Multiple Choice cDNA human spleen, Origene Technologies, Inc. 6 Taft Court, Suite 100, Rockville, MD 20850)。具体的には図3に記載のプライマーを用いた。CD20遺伝子は哺乳動物細胞用高発現ベクターであるpNOW-Ag(図2)に組み込まれた後、宿主細胞であるCHO細胞にトランスフェクトされた。FACS分析により、細胞表面にCD20分子を高発現している組換えCHO細胞(CD20/CHO細胞)を樹立した。なお、FITC標識抗CD20モノクローナル抗体で染色した場合にSB細胞に比べて蛍光強度が5倍以上のものを高発現しているものとした。補完的な免疫原のGST-CD20は、pGEX-4T2ベクターを用いてCD20細胞外ドメインの43アミノ酸のN末にGSTを融合させることにより作製した(G et al. AM, Electrophoresis Vol 20(2):344-348)。

[0031] (2)免疫原の調製

SB細胞またはRaji細胞は10%FCS添加RPMI1640培地を用いて培養を行った。CD20/CHO細胞は、G418を800 μ g/ml添加したCHO-S-SFM II培地(GIBCO、Cat. No. 12052-098)を用いて培養を行った。これらの培養液を遠心分離(1100rpm、5分)した後、細胞にDulbecco's PBS(-)を加えて懸濁させ再度遠心分離した。この洗浄操作をもう一度繰り返し、細胞に生理食塩水を加えて調製した懸濁液(1ml当たりの細胞数は $1\sim 3\times 10^7$ である)を免疫に用いた。GST-CD20が組み込まれたpGEX-4T2はE. coliコンピテントセルに導入された。該コンピテントセルは培養の後溶解され、GST-CD20は溶解細胞から粗精製した後0.1 N苛性ソーダを加えて可溶化された。

[0032] (3)免疫及び細胞融合

被免疫動物には7～11週令のBalb/c系雌性マウスを使用した。SB細胞、Raji細胞及びCD20/CHO細胞のうちいずれかの細胞をさまざまな日数間隔で2～3回繰り返して投与した後、それとは異なった細胞抗原(SB細胞、Raji細胞又はCD20/CHO細胞)を選び最終免疫に使用した。投与した細胞数はいずれもマウス1匹当たり $1\sim 3\times 10^7$ 個であった。また、一部のマウスの事例ではGST-CD20を用いて補完的な免疫を行った。最終免疫の3日後にマウスの脾臓細胞を取り出し、RPMI培地中で懸濁した後、PEG

-1500の存在下でマウスミエローマ(NS-1)との融合反応を行なった(Oi,V.T. et. Herzenberg, 1980, in:Selected Methods in Cellular Immunology;Mishell B et al (Freeman and Co.San Francisco, CA) p.351.)。

[0033] (4)CD20/CHO Cell ELISAスクリーニング法の確立

SB細胞、Raji細胞、CD20/CHO細胞及びCD20のCHO親株をそれぞれ付着させた96ウェルプレートを用いて、幾つかのマウス由来抗CD20モノクローナル抗体と2B8を反応させた。これらのCell ELISAは抗体濃度に対して同様の傾向を示すことが確認され、抗体間及びコントロールとの相対比較も可能であることが判明した。CD20 CHO細胞ELISAはプレートに付着させた細胞表面の抗原密度が高いことから、被検抗体サンプルが比較的低濃度であっても十分に検出可能なレベルの吸光度を示し、鋭敏な測定系であることが判明した。具体的な測定結果を表1に示す。

[0034] [表1]

表1 SB Cell ELISA、Raji Cell ELISA及びCD20/CHO Cell ELISAの比較

抗体	Raji Cell ELISA (A492)						SB Cell ELISA (A492)					
	抗体濃度 ng/ml						抗体濃度 ng/ml					
	1000	320	100	32	10	3	1000	320	100	32	10	3
1K1228	1.683	1.170	0.678	0.326	0.148	nt	1.265	0.931	0.452	0.192	0.082	nt
1K1257	1.775	1.263	0.782	0.445	0.177	0.096	1.509	1.143	0.570	0.276	0.119	0.055
1K1402	1.228	0.525	0.214	0.102	0.061	0.049	0.763	0.400	0.152	0.095	0.066	0.057
1K1422	0.748	0.277	0.121	0.057	0.046	0.049	0.403	0.147	0.071	0.039	0.036	0.051
1K1428	1.196	0.514	0.222	0.104	0.067	0.057	1.111	0.509	0.252	0.108	0.058	0.061
1K1436A	0.887	0.376	0.191	0.105	0.058	0.058	0.959	0.445	0.264	0.120	0.067	0.065
2B8	0.329	0.121	0.055	0.038	0.034	0.046	0.337	0.091	0.045	0.038	0.037	0.053
NC	0.035						0.028					

抗体	CD20/CHO Cell ELISA (A492)						CHO Cell ELISA (親株) (A492)					
	抗体濃度 ng/ml						抗体濃度 ng/ml					
	1000	320	100	32	10	3	1000	320	100	32	10	3
1K1228	3.056	2.704	2.091	1.275	0.572	0.265	0.081	0.040	0.038	0.034	0.038	nt
1K1257	3.184	2.576	1.924	1.223	0.604	0.271	0.095	0.053	0.038	0.039	0.037	0.029
1K1402	1.877	1.574	1.486	0.824	0.389	0.174	0.385	0.170	0.085	0.063	0.070	0.065
1K1422	2.230	1.327	0.842	0.238	0.105	0.068	0.164	0.068	0.046	0.047	0.035	0.067
1K1428	2.544	2.448	2.190	0.967	0.463	0.283	0.564	0.213	0.091	0.056	0.050	0.060
1K1436A	2.432	2.369	2.278	1.101	0.559	0.286	0.375	0.153	0.072	0.043	0.043	0.060
2B8	2.293	1.664	1.090	0.561	0.174	0.089	0.056	0.040	0.045	0.035	0.044	0.060
NC	0.070						0.029					

[0035] (5) Cell ELISAによるスクリーニング

CD20/CHO細胞またはCHO細胞(CD20親株)を付着させた96ウェルプレートを用いてCell ELISAを行い、CD20に特異的に反応する抗体を産生しているウェルを選択した。陽性コントロールには2B8を用い、陰性コントロールにはヒトCD3抗原に対するマウスモノクローナル抗体(BD PharMingen社)を用いた。具体的には、Poly-L-Lysineコート96ウェルプレート(旭テクノグラス、Cat.No.11-023-018)に付着させたCD20/C

HO細胞またはCHO細胞(親株)をCell ELISAに用いた。その各ウェルにブロッキング液(0.2%-Gelatine, 0.5%-BSAのPBS溶液)を150 μ l入れて37°Cで1時間静置した。150 mM-NaCl, 0.05%-Tween20水溶液を用いてプレートを5回洗浄した後、サンプル(培養上清の希釈液)を各ウェルに100 μ l入れて1次反応を37°Cで1時間行なった。洗浄後、標識抗体の希釈液[HRP標識抗マウスIgG(H+L) ウサギ抗体(Jackson Lab. Code No. 315-035-003)、またはHRP標識抗マウスIgG(Fc γ) ウサギ抗体(Jackson Lab. Code No. 315-035-008)]を各ウェルに100 μ l入れて2次反応を37°Cで1時間行なった。1次、2次の反応液の調製には、ブロッキング液と同じものを用いた。洗浄後、発色液(OPD)を各ウェルに100 μ l入れ30分後に4N-H₂SO₄を50 μ l加えて反応を停止し、A492を測定した。結果、2B8と同程度ないし有意に高い反応性を示したウェルを選択した。

[0036] (6)クローニング

限界希釈法で行った。細胞を96ウェルプレートに撒いて培養後、1コロニーのウェルの培養上清についてCD20/CHO細胞Cell ELISAを行い、特異抗体の産生クローンを選択した。

[0037] (7)精製抗体の調製

特異抗体の産生クローンを10%FCS添加RPMI1640培地で培養し、細胞密度が 5×10^5 /ml前後になった時点で無血清培地ASF-104N(味の素)に培地を交換して培養を行った。その2~4日後に培養液を遠心分離して培養上清を回収したあと、プロテインGカラムを用いて精製を行い、溶出されたモノクローナル抗体溶液を150mM-NaClに対して透析した。0.2 μ mのフィルターでろ過滅菌を行ない、試験抗体(抗ヒトCD20マウスモノクローナル抗体)とした。

[0038] CD20/CHO Cell ELISA法を用いて陽性コントロールに匹敵する結合親和性を有するモノクローナル抗体クローンを選別した。それらの抗体の可変領域について遺伝子配列の決定を行い、その結果としてアミノ酸配列を決定した。代表的な抗体のH鎖V領域及びL鎖V領域の配列を、配列番号1及び7、配列番号2及び8、配列番号3及び9、配列番号4及び10、配列番号5及び11、配列番号6及び12、配列番号15及び17、配列番号16及び18に示す(図4)。さらにそれらのクローンについて生物学的

特性が調べられた。

[0039] 生物学的特性試験(1)アポトーシス誘導試験

フローサイトメトリー(Annexin V/ PI staining)を用いて試験抗体のアポトーシス誘導能を測定した。陽性コントロールには2B8、陰性コントロールにはヒトCD3に対するマウスモノクローナル抗体(BD PharMingen社)]を用いた。操作手順は次のとおりである。

[0040] MEBCYTOApoptosis Kit (MBL, Cat.No.4700, Lot.20)を用いて行った。

Raji細胞を遠心後、10% FCS(非動化済)(ICN, Cat.No.2916754, Lot.8005C)を含む新鮮なRPMI1640培地(Sigma, Cat.No.R8758, Lot.44K2416)で懸濁し、12ウェルプレートに各ウェルに 5×10^5 細胞/mlの密度で1mlを入れた。各抗体あたり12ウェルを用い、各抗体を終濃度 $2 \mu\text{g/ml}$ 又は $4 \mu\text{g/ml}$ になるよう添加した。(3ウェル $\times$ 2種濃度 $\times$ 2時点、計12ウェル)

[0041] 培養開始1日後及び2日後に、 2×10^5 個程度分の細胞を含む培養液を回収し、遠心後PBSで1回洗浄した。次に $85 \mu\text{l}$ Binding bufferを加え懸濁した。さらに、Annexin V-FITC $10 \mu\text{l}$ とPI $5 \mu\text{l}$ を加えてよく混和した後、遮光、室温で15分間反応させた。フローサイトメトリー(FACS Calibur, Becton Dickinson)を用いて測定し、CellQuest (Becton Dickinson)で解析を行った。

[0042] 代表的な8種類のマウス由来抗CD20モノクローナル抗体と陽性コントロール(2B8)、陰性コントロール(抗CD3抗体)の測定結果を図5に示した。一般に2B8のアポトーシスの誘導能は高いとされるが、H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域がそれぞれ配列番号2及び8のアミノ酸配列を有するクローン(1K1791)はそれとの比較においても際立って高いアポトーシス誘導が観察された。H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域がそれぞれ配列番号1及び7(1K1422)、又は配列番号15及び17(1K0924)のクローンにおいても明らかなアポトーシスによる細胞死が観察された。

[0043] 生物学的特性試験(2)細胞増殖阻害試験

5×10^4 個/mlのRaji細胞懸濁液を10%FCS添加RPMI1640培地で調製して96ウェルプレートに $100 \mu\text{l}$ /ウェルずつ入れて培養した。24時間後、抗体濃度がそれぞれ $0.01 \mu\text{g/ml}$, $0.1 \mu\text{g/ml}$ 及び $1 \mu\text{g/ml}$ になるように各抗体溶液を $50 \mu\text{l}$ /ウェル添加して培養を継続した。抗体添加72時間後に発色色素Cell Counting Kit-8(同仁化学 Cat.No.34

3-07623, Lot. SG076)を10 μ l/ウェル加え、さらに4時間培養した後で波長492nmにおける吸光度を測定した。図6に代表的な8つのマウス由来抗CD20モノクローナル抗体と陽性コントロール(2B8)の生細胞数測定値を、陰性コントロール(100%)に対する割合として示す。細胞増殖阻害効果は、陰性コントロールとの比較において減少した生細胞数の割合により推定することが可能である。1K0924, 1K1422, 1K1791及び陽性コントロールである2B8において明らかな細胞増殖阻害が観察され、特に1K1791において顕著であった。この傾向は、アポトーシス誘導試験の結果とも一致する。

[0044] キメラ抗体の作製

それぞれのマウス由来抗体のH鎖およびL鎖の可変領域遺伝子を、ヒトイムノグロブリンH鎖およびL鎖(κ)定常域遺伝子をカセットとして予め有するCHO細胞用高発現ベクターpNOW-Abに組み込んだ。該発現ベクターをCHO細胞にトランスフェクトし、それぞれクローンについて生産性の高いものを選別した。

[0045] キメラ抗体のCD20抗原に対する結合性試験

作製された8つのキメラ抗CD20モノクローナル抗体はCD20/CHO Cell ELISA法によりヒトCD20抗原に対する反応性が調べられた。陽性コントロールにはrituximab (c2B8)を使用した。試験結果を表2に示す。Cell ELISA測定値(A492)は結合性の強さを反映する。c1K0924及びc1K1422の親和性がコントロールと較べてやや低い傾向にあった以外はほぼ同等またはそれ以上の親和性を示した。

[0046] [表2]

表2 抗CD20キメラ抗体のCD20/CHO Cell ELISA試験

抗体	CD20/CHO Cell ELISA (A492)					
	抗体濃度 (ng/ml)					
	100	32	10	3	1	0
c1K0924	1.423	0.724	0.391	0.186	0.094	0.032
c1K1228	2.226	1.580	0.701	0.289	0.120	0.032
c1K1402	2.449	1.621	0.737	0.349	0.116	0.032
c1K1422	1.919	0.912	0.357	0.151	0.077	
c1K1712	2.292	1.683	0.793	0.359	0.145	
c1K1736	2.428	1.548	0.748	0.320	0.122	
c1K1782	2.101	1.017	0.505	0.169	0.074	
c1K1791	2.231	1.458	0.745	0.276	0.108	
c2B8	2.147	1.143	0.536	0.226	0.088	

[0047] キメラ抗体のCDC試験

作製された8つのキメラ抗CD20モノクローナル抗体についてCDC活性が調べられた。陽性コントロールにはrituximab (c2B8)を使用した。標的細胞にはRC-K8 (高知大医学部より入手)を用いた。使用培地としてRHB (基礎培地: RPMI-1640, 添加物: 0.1% BSA、20mM HEPES (pH 7.2)、2mM グルタミン、ペニシリンG 100unit/ml、ストレプトマイシン100 μ g/ml)を調製し用いた。標的細胞は、RHBで洗浄後、 10^6 cells/mlになるように再懸濁した。被験キメラ抗体及びrituximabのそれぞれについて濃度の異なる溶液50 μ l、市販のヒト補体 (Quidel, San Diego, CA, Cat. A113)の4倍希釈溶液50 μ l、及び 10^6 cells/mlの細胞懸濁液50 μ lを平底の96穴組織培養用プレート(ブラック)の各ウェルに加えた。その150 μ l/ウェル中の抗体濃度の設定は、0.1 μ g/ml、1 μ g/ml、10 μ g/mlとした。補体介在性細胞溶解を促進するために37°C、5% CO₂の条件で2時間インキュベートした。50 μ lのAlamer blue (未希釈, Accumed Internationalの処方、Biosource、Cat. DAL1100)を添加し、さらに同条件で一晩反応させた。プレートを室温下10分置いて冷却させたあと、蛍光マイクロプレートリーダーを使用して、530nm励起、590nm測定で蛍光を読み取り、結果は蛍光強度 (RFU)で表示された。CDC活性の割合は次の式で計算された。

$$\%CDC \text{ activity} = 100 \times \{RFU(\text{抗体無添加}) - RFU(\text{抗体添加})\} / \{RFU(\text{抗体無添加}) - RFU(\text{Triton X-100添加})\}$$

[0048] 結果を図7に示す。c1K1712以外は陽性コントロールであるC2B2とほぼ同等またはそれ以上のCDC活性を示した。

[0049] ヒト化抗体の作製

マウス由来抗CD20モノクローナル抗体1K1791の可変領域CDRをもとにヒト化のデザインを行った。アミノ酸配列から構造解析を行い更にデザイン手法を変えることにより、H鎖及びL鎖それぞれ4種類のヒト化配列が作製された (Padlan EA, Mol Immunol Vol 28, No 4/5, 489-498; Wu TT and Kabat EA, Mol Immunol Vol 29, No 9, 1141-1146; Padlan EA et al., FASEB J Vol 9, 133-139)。H鎖とL鎖各4種類の全ての組み合わせで抗体が作製された。これらのアミノ酸配列を配列番号19及び23、配列番号19及び24、配列番号19及び25、配列番号19及び26、配列番号20及び23、配列

番号20及び24、配列番号20及び25、配列番号20及び26、配列番号21及び23、配列番号21及び24、配列番号21及び25、配列番号21及び26、配列番号22及び23、配列番号22及び24、配列番号22及び25、配列番号22及び26に示す(図8A及び図8B)。

[0050] これらH鎖可変領域4種類とL鎖可変領域4種類のアミノ酸配列は、ヒト遺伝子配列において最も使用頻度の高いDNA(塩基)配列に置換され、さらにこの塩基のいくつかは宿主のCHO細胞への適性を考慮して元のアミノ酸を変えることなく変更された(Kim CH et al., Gene 1997; 15; 199 (1-2): 293-301)。具体的にアミノ酸配列に対応する塩基配列として、それぞれ配列番号19に対応して配列番号27、配列番号20に対応して配列番号28、配列番号21に対応して配列番号29、配列番号22に対応して配列番号30、配列番号23に対応して配列番号31、配列番号24に対応して配列番号32、配列番号25に対応して配列番号33、配列番号26に対応して配列番号34を用いた(図8A及び図8B)。なお、この塩基配列は、それに対応するアミノ酸配列を変更しないかぎり他の塩基を用いて置換しても良い。

[0051] H鎖可変領域(塩基配列番号27～30)及びL鎖可変領域(塩基配列番号31～34)の合計8種類の塩基配列は合成された後(宝酒造株式会社)、マルチクローニングサイトをもつ哺乳動物細胞用発現ベクターpNOW-Abに組み込んだ。これらのヒト化された抗体遺伝子が組み込まれた該発現ベクターをCHO細胞にトランスフェクトし、それぞれクローンについて生産性の高いものを選別した。

[0052] ヒト化抗体の生物学的特性試験 細胞増殖阻害試験

5×10^4 個/mlのRaji細胞懸濁液を10%FCS添加RPMI1640培地で調製して96ウェルプレートに100 μ l/ウェルずつ入れて培養した。24時間後、抗体濃度が0.5 μ g/mlになるように各抗体溶液を50 μ l/ウェル添加して培養を継続した。抗体添加72時間後に発色色素Cell Counting Kit-8(同仁化学 Cat.No.343-07623, Lot. SG076)を10 μ l/ウェル加え、さらに4時間培養した後で波長492nmにおける吸光度を測定した。図9に1K1791由来の16種類のヒト化抗体のうちの15種類(27クローン)と陽性コントロールであるc2B8(rituximabの別称)の生細胞数測定値を、陰性コントロール(100%)に対する割合として示す。細胞増殖阻害効果は陰性コントロールとの比較において減少した生

細胞数の割合により推定することが可能であるが、本試験では全てのクローンについて増殖阻害効果が観察された。

[0053] なお、本発明の明細書及び図表に記載されるモノクローナル抗体名と配列番号は次のように参照できる。

[0054] [表3]

表 3

マウス抗体名	H鎖可変領域	L鎖可変領域	キメラ抗体名	ヒト化可変領域(H鎖/L鎖)
1K1422	配列番号1	配列番号7	c1K1422	
1K1791	配列番号2	配列番号8	c1K1791	配列番号19及び23 配列番号19及び24 配列番号19及び25 配列番号19及び26 配列番号20及び23 配列番号20及び24 配列番号20及び25 配列番号20及び26 配列番号21及び23 配列番号21及び24 配列番号21及び25 配列番号21及び26 配列番号22及び23 配列番号22及び24 配列番号22及び25 配列番号22及び26
1K1712	配列番号3	配列番号9	c1K1712	
1K1402	配列番号4	配列番号10	c1K1402	
1K1736	配列番号5	配列番号11	c1K1736	
1K1782	配列番号6	配列番号12	c1K1782	
1K0924	配列番号15	配列番号17	c1K0924	
1K1228	配列番号16	配列番号18	c1K1228	

[0055] これらのモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、産生する抗体の名称により命名され、独立行政法人産業技術総合研究所特許生物寄託センター(あて名:郵便番号305-8566 日本国茨城県つくば市東一丁目1番地1 中央第6)に2006年3月28日にブタペスト条約に基づく国際寄託がなされ、受託番号が次の通り付与されている。1K1422: FERM BP-10587、1K1791: FERM BP-10591、1K1712: FERM BP-10588、1K1402: FERM BP-10586、1K1736: FERM BP-10589、1K1782: FERM BP-10590、1K0924: FERM BP-10584、1K1228: FERM BP-10585。

産業上の利用可能性

[0056] 本発明により治療薬として使用するのに適した生物学的活性を有するモノクローナ

ル抗体が提供される。

請求の範囲

- [1] エフェクター細胞非存在下でのヒトCD20抗原発現細胞培養において該ヒトCD20抗原発現細胞に対してアポトーシスを含む増殖阻害活性を有するマウス由来抗CD20モノクローナル抗体。
- [2] H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列がそれぞれ配列番号1及び7、配列番号2及び8、又は配列番号15及び17である請求項1記載の抗CD20モノクローナル抗体。
- [3] 請求項1又は2に記載の抗CD20モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
- [4] 請求項2記載の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域アミノ酸配列とヒトイムノグロブリン定常域アミノ酸配列を融合させたキメラ抗CD20モノクローナル抗体。
- [5] 請求項2記載の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域CDRのアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてヒト化された抗CD20モノクローナル抗体。
- [6] H鎖可変領域アミノ酸配列のL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号19及び23、配列番号19及び24、配列番号19及び25、配列番号19及び26、配列番号20及び23、配列番号20及び24、配列番号20及び25、配列番号20及び26、配列番号21及び23、配列番号21及び24、配列番号21及び25、配列番号21及び26、配列番号22及び23、配列番号22及び24、配列番号22及び25、又は配列番号22及び26である請求項5のヒト化抗CD20モノクローナル抗体。
- [7] ヒト補体存在下でCD20抗原発現細胞に対して細胞障害性を有する請求項4～6のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体。
- [8] 請求項4～7のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を組み込んだ哺乳動物細胞。
- [9] CHO細胞である請求項8記載の哺乳動物細胞。
- [10] H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号3及び9、配列番号4及び10、配列番号5及び11、配列番号6及び12、又は配列番号16及び18であるマウス由来抗CD20モノクローナル抗体。
- [11] 請求項10記載の抗CD20モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
- [12] 請求項10記載の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域アミノ酸配列とヒトイムノグロ

ブリン定常域アミノ酸配列を融合させたキメラ抗CD20モノクローナル抗体。

- [13] 請求項10記載の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域CDRのアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてヒト化された抗CD20モノクローナル抗体。
- [14] ヒト補体存在下でCD20抗原発現細胞に対して細胞障害性を有する請求項12または13記載の抗CD20モノクローナル抗体。
- [15] 請求項12～14のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体のアミノ酸をコードする塩基配列を組み込んだ哺乳動物細胞。
- [16] CHO細胞である請求項15記載の哺乳動物細胞。
- [17] 請求項2、4～7、10及び12～14のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体を有効成分とする診断薬。
- [18] 請求項4～7及び12～14のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体を有効成分とする治療薬。

補正書の請求の範囲

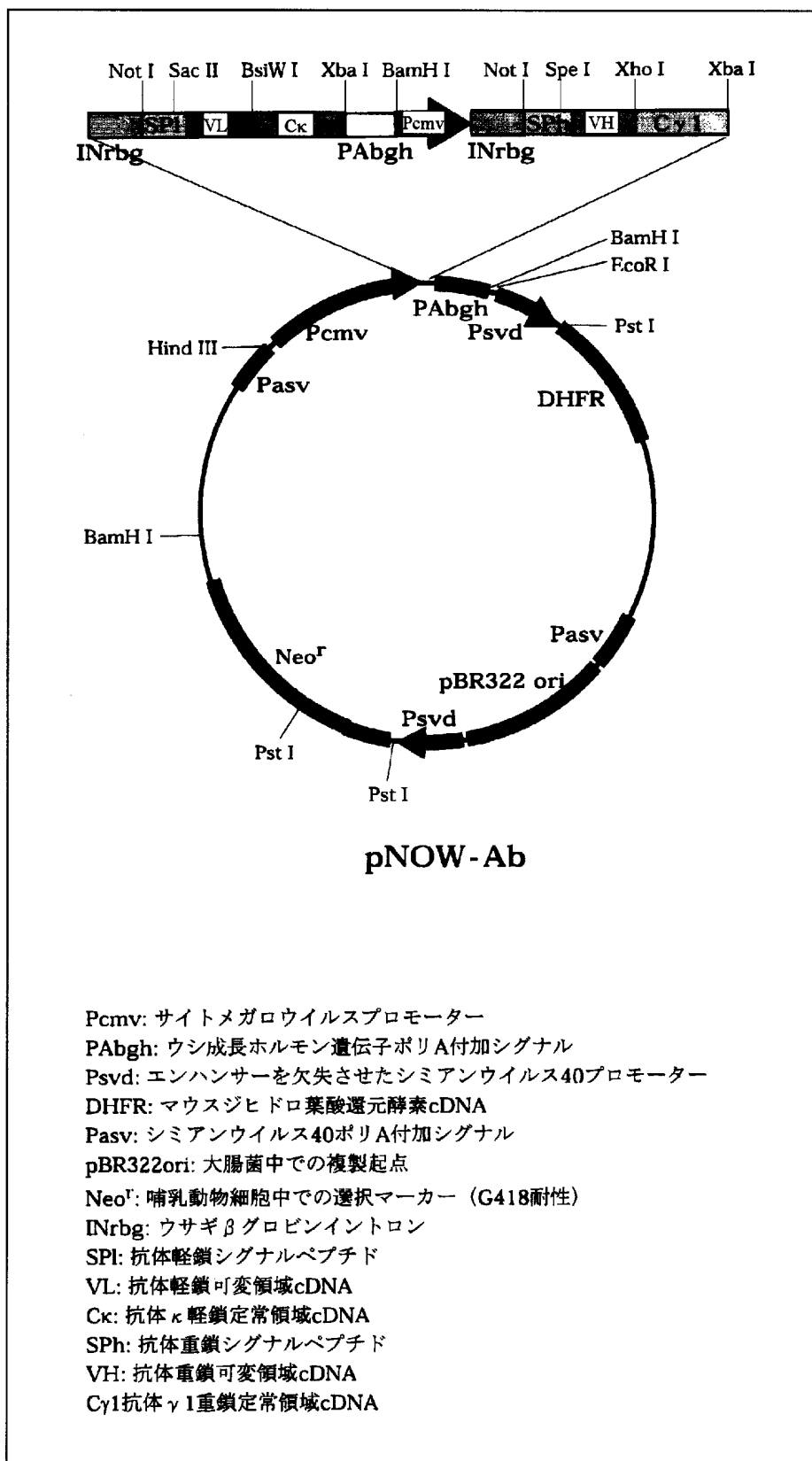
[2006年8月28日 (28. 08. 2006) 国際事務局受理]

- [1] エフェクター細胞非存在下でのヒトCD20抗原発現細胞培養において該ヒトCD20抗原発現細胞に対してアポトーシスを含む増殖阻害活性を有するマウス由来抗CD20モノクローナル抗体。
- [2] H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列がそれぞれ配列番号1及び7、配列番号2及び8、又は配列番号15及び17である請求項1記載の抗CD20モノクローナル抗体。
- [3] 請求項1又は2に記載の抗CD20モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
- [4] 請求項2記載の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域アミノ酸配列とヒトイムノグロブリン定常域アミノ酸配列を融合させたキメラ抗CD20モノクローナル抗体。
- [5] 請求項2記載の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域CDRのアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてヒト化された抗CD20モノクローナル抗体。
- [6] H鎖可変領域アミノ酸配列のL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号19及び23、配列番号19及び24、配列番号19及び25、配列番号19及び26、配列番号20及び23、配列番号20及び24、配列番号20及び25、配列番号20及び26、配列番号21及び23、配列番号21及び24、配列番号21及び25、配列番号21及び26、配列番号22及び23、配列番号22及び24、配列番号22及び25、又は配列番号22及び26である請求項5のヒト化抗CD20モノクローナル抗体。
- [7] (補正後)ヒト補体またはエフェクター細胞存在下でCD20抗原発現細胞に対して細胞障害性を有する請求項4～6のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体。
- [8] 請求項4～7のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体のアミノ酸配列をコードする塩基配列を組み込んだ哺乳動物細胞。
- [9] CHO細胞である請求項8記載の哺乳動物細胞。
- [10] (補正後) H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列の組み合わせがそれぞれ配列番号3及び9、配列番号4及び10、配列番号5及び11、又は配列番号16及び18であるマウス由来抗CD20モノクローナル抗体。
- [11] 請求項10記載の抗CD20モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ。
- [12] 請求項10記載の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域アミノ酸配列とヒトイムノグロ

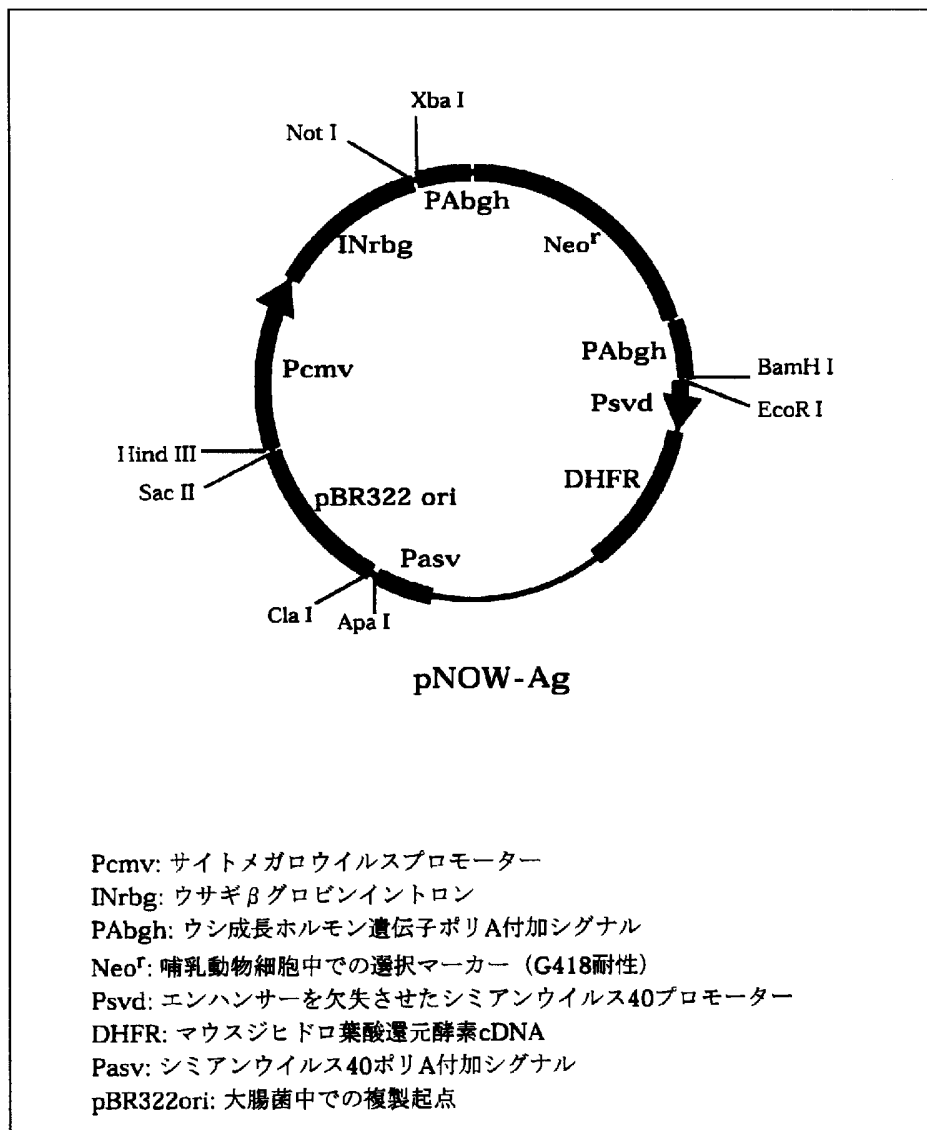
ブリン定常域アミノ酸配列を融合させたキメラ抗CD20モノクローナル抗体。

- [13] 請求項10記載の抗CD20モノクローナル抗体の可変領域CDRのアミノ酸配列とヒトイムノグロブリンのアミノ酸配列を用いてヒト化された抗CD20モノクローナル抗体。
- [14] (補正後)ヒト補体またはエフェクター細胞存在下でCD20抗原発現細胞に対して細胞障害性を有する請求項12または13記載の抗CD20モノクローナル抗体。
- [15] 請求項12～14のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体のアミノ酸をコードする塩基配列を組み込んだ哺乳動物細胞。
- [16] CHO細胞である請求項15記載の哺乳動物細胞。
- [17] 請求項2、4～7、10及び12～14のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体を有効成分とする診断薬。
- [18] 請求項4～7及び12～14のいずれか1項に記載の抗CD20モノクローナル抗体を有効成分とする治療薬。

[図1]



[図2]



[図3]

Human CD20 5' primer ((配列番号13)
 hCD20-S-GK-Not aatgcggccgccaccatgacaacacccagaaattc
 Human CD20 3' primer ((配列番号14)
 hCD20-E-Xba gctctagattaaggagagctgtcatcttc

[図4]

1K1422のH鎖V領域配列 (配列番号1)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCRASGYTFTNFMHWIKQTPGQGLEWIGAIYPGSGDTSYNRKFKGKATLTADTS
SSTAYMQFSSLTSADSAVYYCARFTYYYGGTYGAMDYWGQGTSTVTVSL

1K1791のH鎖V領域配列 (配列番号2)

QIQLVQSGPELKKPGGETVKISCKASGYTFTNFGVNVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPSYADDFKGRFAFSLEAS
ANTAYLQINNKNDDMSTYFCTRRNTYYGTSYYYAMDYWGQGTSTVTVSS

1K1712のH鎖V領域配列 (配列番号3)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGFTFTSYNLHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGSGDTSYNQKFKGKATLTADKS
SNTAYMQLNSLTSEDSAVYCCARSAMISTGNWYFDYWGQGTTLTVSS

1K1402のH鎖V領域配列 (配列番号4)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGFTFTSYNMHWVKQTPGQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKS
SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARFYGGSMGAMDYWGQGTSTVTVSS

1K1736のH鎖V領域配列 (配列番号5)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNLHWVKQTPGQGLEWIGGIYPGNGDTSYNQKFKVKATLTADKS
SNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWIIYGNIEGTLDYWGQGTSTVTVSS

1K1782のH鎖V領域配列 (配列番号6)

QVQLQQSGAELAKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQRPQGQGLEWIGYITPSTGYTDYNKKFKDKATLTADRS
SSTAYMHLSSLTSEDSAVYYCARSGPYFDVWGAGTTTVTVSS

1K1422のL鎖V領域配列 (配列番号7)

QIVLTQSPPIMASLGEETLTCSASSRVSYMLWYQQKSGTSPKLLIYSTNLASGVPSRFSGSGSGTFYSLTIS
SVEAEDAADYYCHQWTSNPCTFGGGTKLEIK

1K1791のL鎖V領域配列 (配列番号8)

STVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKVLIFYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTTI
NTVQAEDLAVYFCQQDYSSPLTFGAGTKLELK

1K1712のL鎖V領域配列 (配列番号9)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMDWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIS
RVEAEDTATYYCQQWTFNPPTFGSGTKLEIK

1K1402のL鎖V領域配列 (配列番号10)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIT
RVEAEDAATYYCQQWTFNPPTFGAGTKLELK

1K1736のL鎖V領域配列 (配列番号11)

QIVLSQSPAILSSSPGEKVTMTCRASSSVSYMLWYQQKPGSSPEPWYATSNLASGVPARFSGGSGSGTSYSLTIS
RVEAEDAATYYCQQWTFNPPTFGGGTKLEIK

1K1782のL鎖V領域配列 (配列番号12)

DILLTQSPAILFVSPGERVSLSCRASQNIQTSIHWWYQQRTNGSPRLIKYASESFSGIPSRFSGSGSGTDFTLIS
NSVESEDIAADYYCQNSNPPTFGSGTKLEIK

1K0924のH鎖V領域配列 (配列番号15)

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNIHWVKQTPGQGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTSDKS
SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARMSTMITGFDYWGQGTTLTVSS

1K1228のH鎖V領域配列 (配列番号16)

QVQLQQPGAELVKPGASVKVSKASGFTFTSYNLHWVKQTPGQGLVWIGAIYPGNGDTSYNQKFRGKATLTADIS
SSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYYGYDAMDYWGQGTSTVTVSS

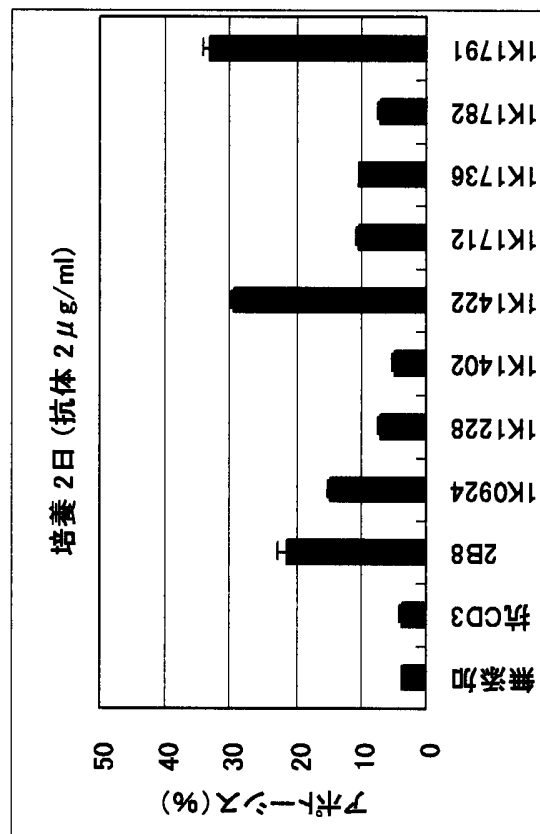
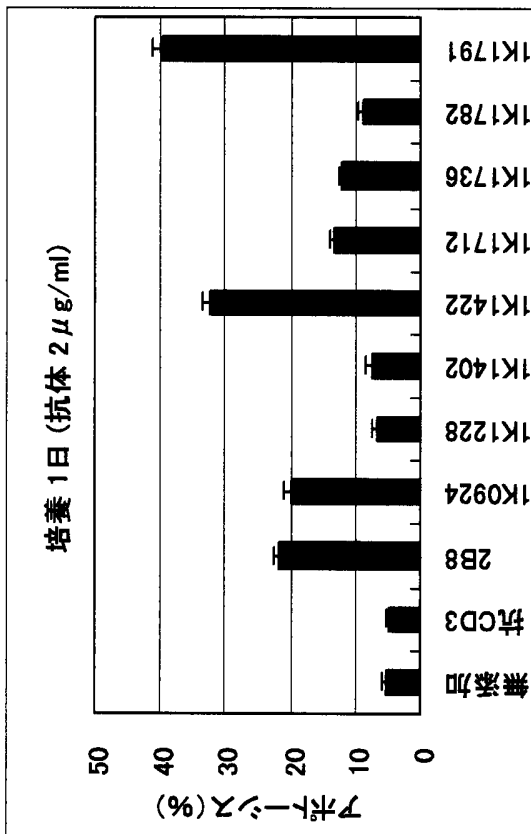
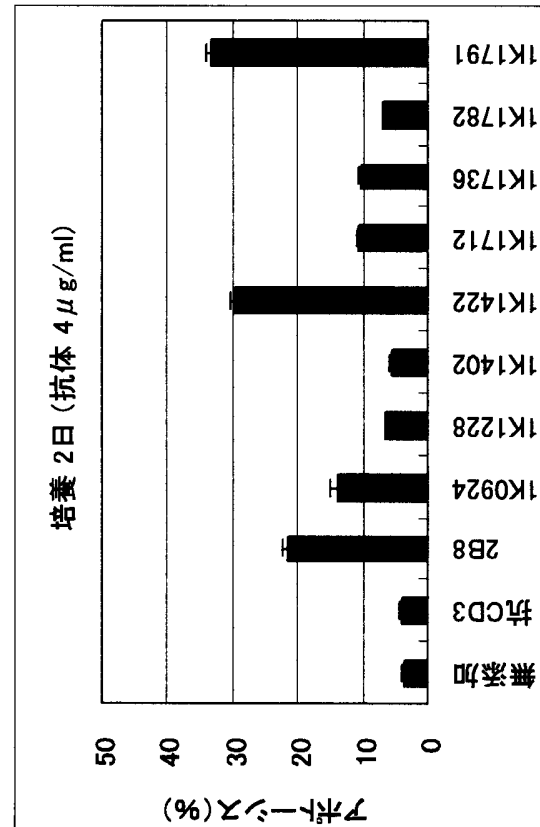
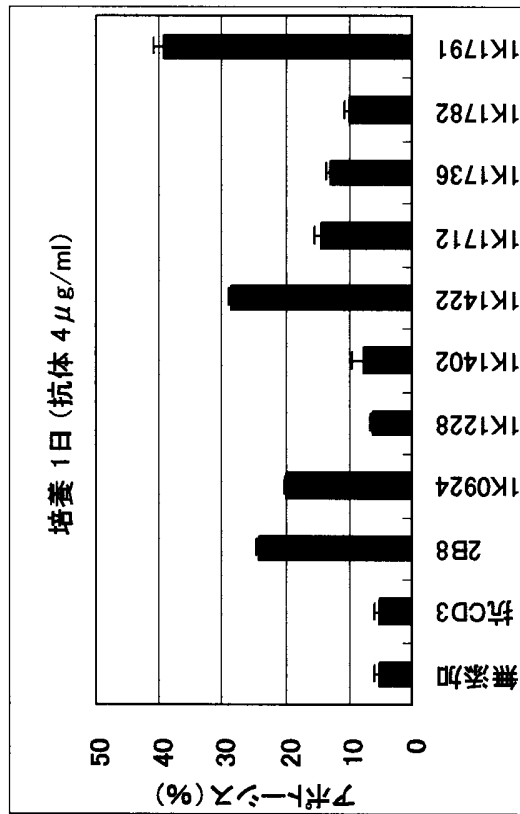
1K0924のL鎖V領域配列 (配列番号17)

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYFYFTIS
RVEAEDAATYYCQQWNSNPPTHGGGTKLEIK

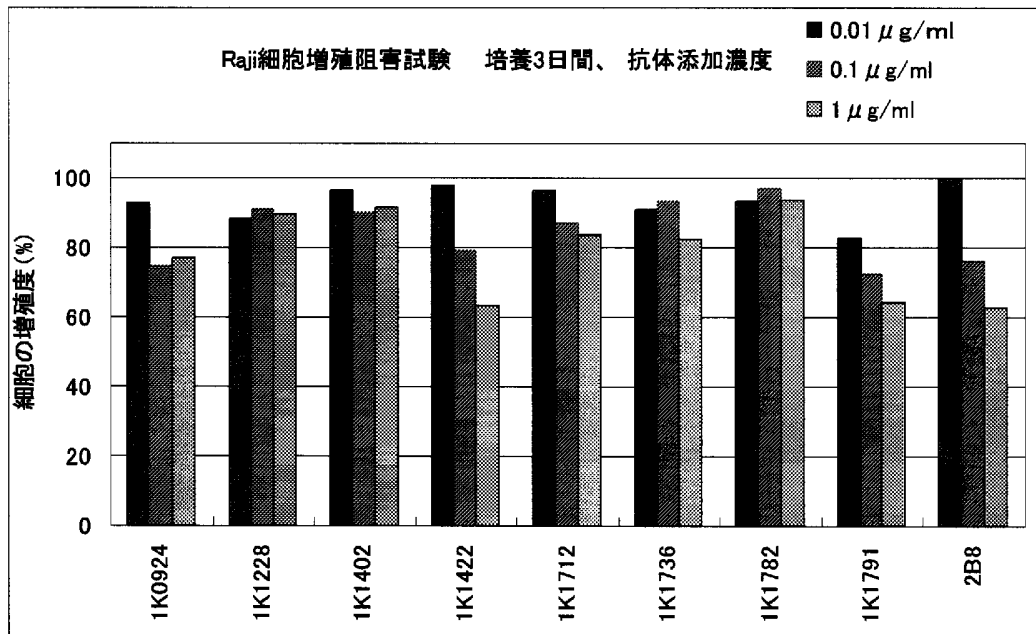
1K1228のL鎖V領域配列 (配列番号18)

EIILTQSPITMAASPGEKITITCSASSISSYYLRWYQQKPGFSPKVLIRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTIG
TMEAEDVATYYCQQGNTVPLTFGSGTKLEIK

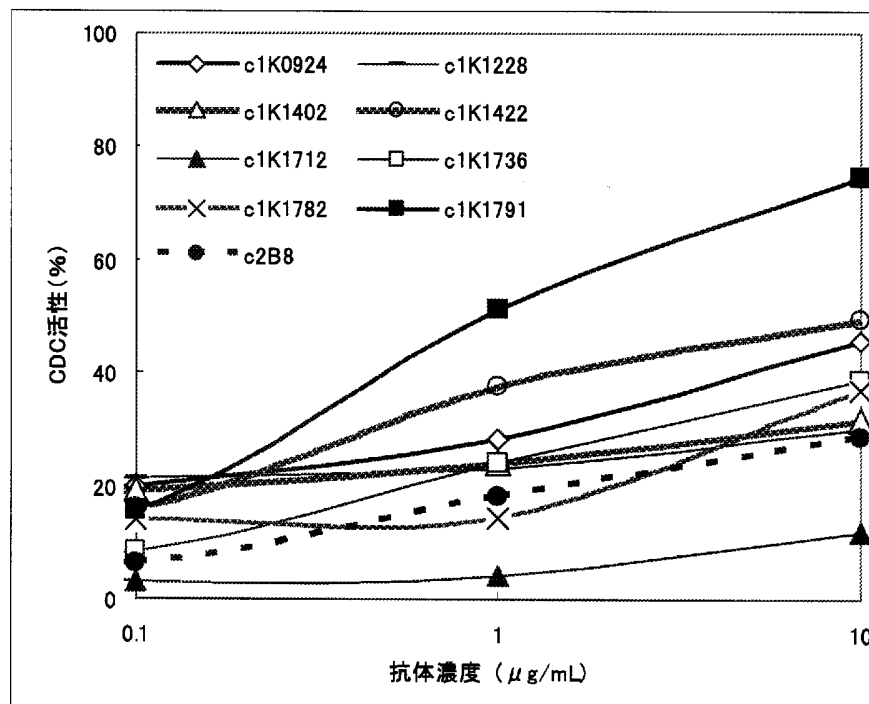
[図5]



[図6]



[図7]



[図8A]

ヒト化抗体H鎖V領域配列 (abbH1791) (配列番号 19)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLEWMGW INTYTGEPSY
 AQGFTGRFVF SLDAVSSTAY LQISLKAED TATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGGQTTV
 TVSS

ヒト化抗体H鎖V領域遺伝子配列例 (abbH1791) (配列番号 27)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGCG
 CCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAGCTACGCCCA
 GGGCTTCACCGCCGCTTCGTGTTACGCTGGACGCCAGCGTGAGCACC GCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCACCCGCGCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

ヒト化抗体H鎖V領域配列 (fraH1791) (配列番号 20)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSY
 ADDFKGRFAF SLDAVSSTAY LQISLKAED MATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGGQTTV
 TVSS

ヒト化抗体H鎖V領域遺伝子配列例 (fraH1791) (配列番号 28)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGAA
 GCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAGCTACGCCGA
 CGACTTCAAGGGCCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGCCAGCACC GCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACATGGCCACCTACTTCTGCACCCGCGCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

ヒト化抗体H鎖V領域配列 (sdrH1791) (配列番号 21)

QIQLVQSGSE LKKPGASVKV SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSY
 AQGFTGRFAF SLDAVSSTAY LQISLKAED TATYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGGQTTV
 TVSS

ヒト化抗体H鎖V領域遺伝子配列例 (sdrH1791) (配列番号 29)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCAGCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGGTGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGCG
 CCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAGCTACGCCCA
 GGGCTTCACCGCCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGTGAGCACC GCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGCCACCTACTTCTGCACCCGCGCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

ヒト化抗体H鎖V領域配列 (venH1791) (配列番号 22)

QIQLVQSGPE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NFGVNWVRQA PGKGLKWMGW INTYTGEPSY
 ADDFKGRFAF SLDAVSSTAY LQISLKAED TSTYFCTRRT NYYGTSYYYA MDYWGGQTTV
 TVSS

ヒト化抗体H鎖V領域遺伝子配列例 (venH1791) (配列番号 30)

ACTAGTTGCAGCTCCTATTTGGGTTCTTCTCAGATCCAGCTGGTGCAGAGCGGCCCCGAGCTGAAGAAGCC
 CGGCGCCAGCGTGAAGATCAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCAACTTCGGCGTGAAGTGGGTGAA
 GCAGGCCCCCGCAAGGGCCTGAAGTGGATGGGCTGGATCAACACCTACACCGCGAGCCAGCTACGCCGA
 CGACTTCAAGGGCCGCTTCGCCTTCAGCCTGGACGCCAGCGTGAGCACC GCCTACCTGCAGATCAGCAGCCT
 GAAGGCCGAGGACACCGACCTACTTCTGCACCCGCGCACCAACTACTACGGCACCAGCTACTACTACGC
 CATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCGTGACCGTCTCGAGC

[図8B]

ヒト化抗体L鎖V領域配列 (abbL1791) (配列番号 2 3)

STVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVLIIYF ASNRYSGVPD
RFSGSGYGTDLFTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK

ヒト化抗体L鎖V領域遺伝子配列例 (abbL1791) (配列番号 3 1)

CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCAC
CATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACAGCGCGGTGCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG
CACCGACTTCACCGTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACG

ヒト化抗体L鎖V領域配列 (fraL1791) (配列番号 2 4)

STVMTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVLIIYF ASNRYTGVPD
RFSGSGYGTDLFTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK

ヒト化抗体L鎖V領域遺伝子配列例 (fraL1791) (配列番号 3 2)

CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCAGCTTCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGAC
CATCACCTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACACCGCGGTGCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG
CACCGACTTCACCGTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGTACG

ヒト化抗体L鎖V領域配列 (sdrL1791) (配列番号 2 5)

STVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKSSQSNS NDVAWYQQKP GQSPKVLIIYF ASNRYSGVPD
RFSGSGYGTDLFTLTISSLQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK

ヒト化抗体L鎖V領域遺伝子配列例 (sdrL1791) (配列番号 3 3)

CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCAC
CATCAACTGCAAGAGCAGCCAGAGCAACAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACAGCGCGGTGCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG
CACCGACTTCACCGTGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGCGTACG

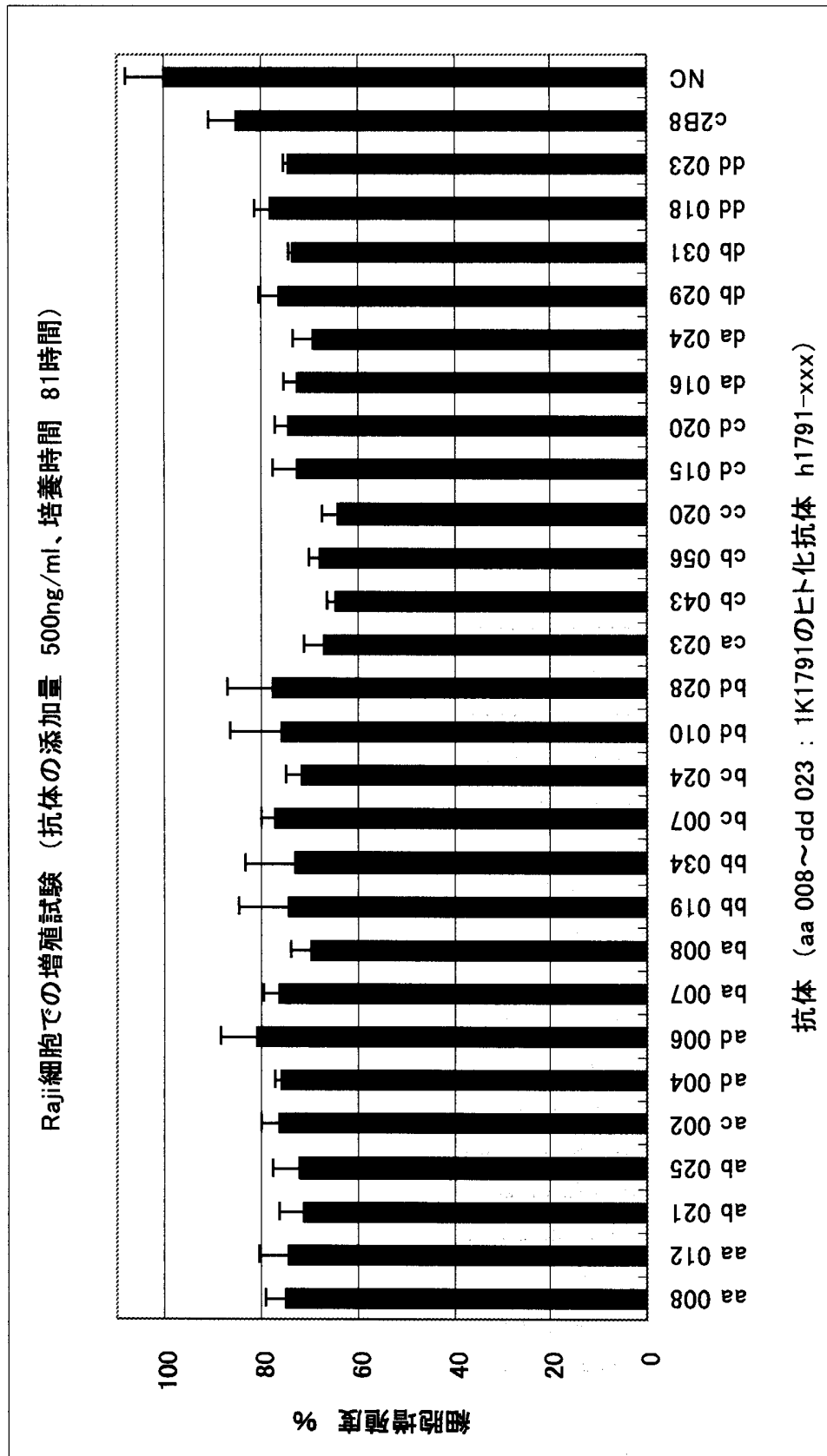
ヒト化抗体L鎖V領域配列 (venL1791) (配列番号 2 6)

STVMTQSPDS LAVSLGERVT INCKASQSVS NDVAWYQQKP GQSPKVLIIYF ASNRYTGVPD
RFSGSGYGTDLFTTISSVQA EDVAVYFCQQ DYSSPLTFGA GTKLEIK

ヒト化抗体L鎖V領域遺伝子配列例 (venL1791) (配列番号 3 4)

CCGCGGTGCCAGAAGCACCGTGATGACCCAGAGCCCCGACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGTGAC
CATCAACTGCAAGGCCAGCCAGAGCGTGAGCAACGACGTGGCCTGGTACCAGCAGAAGCCCGCCAGAGCCC
CAAGGTGCTGATCTACTTCGCCAGCAACCGCTACACCGCGGTGCCGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCTACGG
CACCGACTTCACCTTACCATCAGCAGCGTGACAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGGACTA
CAGCAGCCCCCTGACCTTCGGCGCCGGCACCAAGCTGGAGCTGAAGCGTACG

[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306925

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01), **A61K39/395**(2006.01), **A61P7/00**(2006.01), **A61P7/06**(2006.01), **A61P19/02**(2006.01), **A61P29/00**(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **A61P35/02**(2006.01), **A61P37/02**(2006.01), **C07K16/28**(2006.01),

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09(2006.01), **A61K39/395**(2006.01), **A61P7/00**(2006.01), **A61P7/06**(2006.01), **A61P19/02**(2006.01), **A61P29/00**(2006.01), **A61P35/00**(2006.01), **A61P35/02**(2006.01), **A61P37/02**(2006.01), **C07K16/28**(2006.01),

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2006
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JDream2)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	SHAN, D. et al., Synergistic effects of the fenretinide (4-HPR) and anti-CD20 monoclonal antibodies on apoptosis induction of malignant human B cells, Clin. Cancer Res., Vol.7, No.8, 2001.08, pages 2490 to 2495 (particularly, Materials and Methods, Fig. 5, page 2492, right column, line 21 to page 2493, left column, line 5)	1, 3 1-5, 7-18
Y	DAVIES, A.J., Tositumomab and iodine [¹³¹ I] tositumomab in the management of follicular lymphoma. An oncologist's view, Q.J.Nucl.Med. Mol. Imaging, Vol.48, No.4, 2004.12, pages 305 to 316	1-5, 7-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
19 June, 2006 (19.06.06)

Date of mailing of the international search report
27 June, 2006 (27.06.06)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306925

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	STASHENKO, P. et al., Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen, J.Immunol., Vol.125, No.4, 1980.10, pages 1678 to 1685	1-5,7-18
Y	WO 2003/068821 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.), 21 August, 2003 (21.08.03), All pages & EP 1519959 A1 & US 2003/0219433 A1	1-5,7-18
Y	REFF, M.E. et al., Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20, Blood, Vol.83, No.2, 15 January, 1994 (15.01.94), pages 435 to 445	1-5,7-18
A	UCHIDA, J. et al., The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy, J.Exp.Med., Vol.199, No.12, 21 June, 2004 (21.06.04), pages 1659 to 1669	1-18
A	SHAN, D. et al., Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies, Blood, Vol.91, No.5, 01 March, 1998 (01.03.98), pages 1644 to 1652	1-18
A	SMITH, M.R., Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance, Oncogene, Vol.22, No.47, 20 October, 2003 (20.10.03), pages 7359 to 7368	1-18
A	HOFMEISTER, J.K. et al., Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis, Blood Cells Mol.Dis., Vol.26, No.2, 2000.04, pages 133 to 143	1-18
A	Kensei TOBINAI, "Kotai Ryoho no Genjo to Kongo no Tenkai", Igaku no Ayumi, Vol.212, No.5, 29 January, 2005 (29.01.05), pages 377 to 381	1-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306925

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (International Patent Classification (IPC))

C12P21/08(2006.01)

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC)

Continuation of B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (International Patent Classification (IPC))

C12P21/08(2006.01)

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/306925

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

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

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

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

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

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

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest
the

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

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

The claims are roughly divided into the following inventions: inventions relating to a murine anti-CD-20 monoclonal antibody in which the H-chain variable region amino acid sequence and the L-chain variable region amino acid sequence are: sequences depicted in SEQ ID NOs:2 and 8, respectively (1K1791); sequences depicted in SEQ ID NOs:1 and 7, respectively (1K1422); sequences depicted in SEQ ID NOs:15 and 17, respectively (1K0924); sequences depicted in SEQ ID NOs:3 and 9, respectively (1K1712); sequences depicted in SEQ ID NOs:4 and 10, respectively (1K1402); sequences depicted in SEQ ID NOs:5 and 11, respectively (1K1736); sequences depicted in SEQ ID NOs:6 and 12, respectively (1K1782); and sequences depicted in SEQ ID NOs:16 and 18, respectively (1K1228).

The technical matter common to the inventions relating to the eight antibodies set forth above is a "murine anti-CD-20 monoclonal antibody having growth inhibitory activities including apoptosis against a human CD-20 antigen-expressing cell in culture in the absence of an effector cell". However, a "murine anti-CD-20 antibody having growth inhibitory activities including apoptosis against a human CD-20 monoclonal antigen-expressing cell in culture in the absence of an effector cell" is known, as set forth, for example, in document 1 (Clin. Cancer. Res., 2001, Vol.7, No.8, p.2490-2495). Therefore, there is found no special technical feature among the inventions relating to the above eight antibodies, that is, no technical feature that defines a contribution which each of the claimed inventions, considered as a whole, makes over the prior art (PCT Rule 13.2). (In document 1, it is shown that, in an *in vitro* experiment in which an anti-CD-20 monoclonal antibody is added to a CD-20-expressing human lymphocyte, a murine anti-CD-20 monoclonal antibody Tositumomab exerts solely an apoptosis-inducing activity in the absence of a retinoid compound 4-HPR (see "Materials and Methods", Fig.5 and p.2492, right column, line 21-p.2493, left column, line 5)).

Thus, the claims include the following eight different inventions:

1. inventions relating to SEQ ID NOs:2 and 8 in the inventions of claims 1 to 9, 17 and 18;
2. inventions relating to SEQ ID NOs:1 and 7 in the inventions of claims 1 to 9, 17 and 18;
3. inventions relating to SEQ ID NOs:15 and 17 in the inventions of claims 1 to 9, 17 and 18;
4. inventions relating to SEQ ID NOs:3 and 9 in the inventions of claims 10 to 18;
5. inventions relating to SEQ ID NOs:4 and 10 in the inventions of claims 10 to 18;
6. inventions relating to SEQ ID NOs:5 and 11 in the inventions of claims 10 to 18;
7. inventions relating to SEQ ID NOs:6 and 12 in the inventions of claims 10 to 18; and
8. inventions relating to SEQ ID NOs:16 and 18 in the inventions of claims 10 to 18.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P7/00 (2006.01), A61P7/06 (2006.01), A61P19/02 (2006.01), A61P29/00 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), A61P35/02 (2006.01), A61P37/02 (2006.01), C07K16/28 (2006.01), C12P21/08 (2006.01)			
B. 調査を行った分野			
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))			
Int.Cl. C12N15/09 (2006.01), A61K39/395 (2006.01), A61P7/00 (2006.01), A61P7/06 (2006.01), A61P19/02 (2006.01), A61P29/00 (2006.01), A61P35/00 (2006.01), A61P35/02 (2006.01), A61P37/02 (2006.01), C07K16/28 (2006.01), C12P21/08 (2006.01)			
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの			
日本国実用新案公報	1922-1996年		
日本国公開実用新案公報	1971-2006年		
日本国実用新案登録公報	1996-2006年		
日本国登録実用新案公報	1994-2006年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)			
BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), SwissProt/PIR/Geneseq, PubMed, JSTPlus (JDream2)			
C. 関連すると認められる文献			
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号	
X	SHAN, D., et al., Synergistic effects of the fenretinide (4-HPR) and anti-CD20 monoclonal antibodies on apoptosis induction of malignant human B cells, Clin. Cancer Res., Vol.7, No.8, 2001.08, p.2490-2495 (特に、Materials and Methods、Fig.5、及び、第 2492 頁右欄第 21 行-第 2493 頁左欄第 5 行参照)	1, 3	
Y		1-5, 7-18	
Y	DAVIES, A.J., Tositumomab and iodine [131I] tositumomab in the management of follicular lymphoma. An oncologist's view, Q. J. Nucl.	1-5, 7-18	
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。			
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願			
の日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献			
国際調査を完了した日 19.06.2006		国際調査報告の発送日 27.06.2006	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号		特許庁審査官 (権限のある職員) 光本 美奈子	4 B 3 5 3 8
		電話番号 03-3581-1101 内線	3 4 4 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
	Med. Mol. Imaging, Vol.48, No.4, 2004.12, p.305-316	
Y	STASHENKO, P., et al., Characterization of a human B lymphocyte-specific antigen, J. Immunol., Vol.125, No.4, 1980.10, p.1678-1685	1-5, 7-18
Y	WO 2003/068821 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.) 2003.08.21, 全頁 & EP 1519959 A1 & US 2003/0219433 A1	1-5, 7-18
Y	REFF, M.E., et al., Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20, Blood, Vol.83, No.2, 1994.01.15, p.435-445	1-5, 7-18
A	UCHIDA, J., et al., The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy, J. Exp. Med., Vol.199, No.12, 2004.06.21, p.1659-1669	1-18
A	SHAN, D., et al., Apoptosis of malignant human B cells by ligation of CD20 with monoclonal antibodies, Blood, Vol.91, No.5, 1998.03.01, p.1644-1652	1-18
A	SMITH, M.R., Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and resistance, Oncogene, Vol.22, No.47, 2003.10.20, p.7359-7368	1-18
A	HOFMEISTER, J.K., et al., Clustered CD20 induced apoptosis: src-family kinase, the proximal regulator of tyrosine phosphorylation, calcium influx, and caspase 3-dependent apoptosis, Blood Cells Mol. Dis., Vol.26, No.2, 2000.04, p.133-143	1-18
A	飛内賢正, 抗体療法の現状と今後の展開, 医学のあゆみ, Vol.212, No.5, 2005.01.29, p.377-381	1-18

<第Ⅲ欄の続き>

請求の範囲には大別して、H鎖可変領域アミノ酸配列とL鎖可変領域アミノ酸配列がそれぞれ、配列番号2及び8(1K1791)、配列番号1及び7(1K1422)、配列番号15及び17(1K0924)、配列番号3及び9(1K1712)、配列番号4及び10(1K1402)、配列番号5及び11(1K1736)、配列番号6及び12(1K1782)、並びに、配列番号16及び18(1K1228)であるマウス由来抗CD20モノクローナル抗体に関する発明が記載されている。

上記8つの抗体に関する発明は、「エフェクター細胞非存在下でのヒトCD20抗原発現細胞培養において該ヒトCD20抗原発現細胞に対してアポトーシスを含む増殖阻害活性を有するマウス由来抗CD20モノクローナル抗体」を共通事項とするものであるが、例えば文献1(Clin. Cancer. Res., 2001, Vol.7, No.8, p.2490-2495)に記載されているように「エフェクター細胞非存在下でのヒトCD20抗原発現細胞培養において該ヒトCD20抗原発現細胞に対してアポトーシスを含む増殖阻害活性を有するマウス由来抗CD20モノクローナル抗体」は公知であるから、上記8つの抗体に関する発明の間に特別な技術的特徴、すなわち、請求の範囲に記載された各発明が全体として先行技術に対して行う貢献を明示する技術的特徴(PCT規則13.2)は存在しない(文献1には、CD20発現ヒトリンパ球に対して抗CD20モノクローナル抗体を添加するin vitro実験において、マウス由来の抗CD20モノクローナル抗体Tositumomabがレチノイド化合物である4-HPR非存在下において、単独でアポトーシス誘導活性を有することが示されている(Materials and Methods、Fig.5、及び、第2492頁右欄第21行―第2493頁左欄第5行参照))。

したがって、少なくとも請求の範囲には、

1. 請求の範囲1-9,17,18に記載の発明のうち、配列番号2及び8に関連した発明、
 2. 請求の範囲1-9,17,18に記載の発明のうち、配列番号1及び7に関連した発明、
 3. 請求の範囲1-9,17,18に記載の発明のうち、配列番号15及び17に関連した発明、
 4. 請求の範囲10-18に記載の発明のうち、配列番号3及び9に関連した発明、
 5. 請求の範囲10-18に記載の発明のうち、配列番号4及び10に関連した発明、
 6. 請求の範囲10-18に記載の発明のうち、配列番号5及び11に関連した発明、
 7. 請求の範囲10-18に記載の発明のうち、配列番号6及び12に関連した発明、並びに、
 8. 請求の範囲10-18に記載の発明のうち、配列番号16及び18に関連した発明、
- の異なる8つの発明が記載されている。

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. b の続き）

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 紙形式

☒ 電子形式

c. 提出時期 ☒ 出願時の国際出願に含まれていたもの

☐ この国際出願と共に電子形式により提出されたもの

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出されたもの

2. ☐ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2) (a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求の範囲_____は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求の範囲_____は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲_____は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
（特別ページを参照のこと）

1. ☒ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☒ 追加調査手数料の納付を伴う異議申立てがなかった。