

(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2015-516984

(P2015-516984A)

(43) 公表日 平成27年6月18日 (2015.6.18)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C 0 7 K 16/28 (2006.01)</b>	C 0 7 K 16/28	2 B 0 3 0
<b>A 0 1 H 5/00 (2006.01)</b>	A 0 1 H 5/00 Z N A A	4 B 0 2 4
<b>A 0 1 K 67/027 (2006.01)</b>	A 0 1 K 67/027	4 B 0 6 4
<b>C 1 2 N 15/09 (2006.01)</b>	C 1 2 N 15/00 A	4 C 0 7 6
<b>C 1 2 P 21/08 (2006.01)</b>	C 1 2 P 21/08	4 C 0 8 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2015-509172 (P2015-509172)	(71) 出願人	514268431
(86) (22) 出願日	平成25年4月26日 (2013.4.26)		バイオアトラ、エルエルシー
(85) 翻訳文提出日	平成26年12月22日 (2014.12.22)		アメリカ合衆国、92121 カリフォル
(86) 国際出願番号	PCT/US2013/038370		ニア州、サン ディエゴ 11011 ト
(87) 国際公開番号	W02013/163519		ーレヤーナ ロード
(87) 国際公開日	平成25年10月31日 (2013.10.31)	(74) 代理人	100104411
(31) 優先権主張番号	61/638,834		弁理士 矢口 太郎
(32) 優先日	平成24年4月26日 (2012.4.26)	(72) 発明者	ショート、ジェイ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国、92014 カリフォル
			ニア州、デル マー、12985 ヴィア
			エスペリア
		(72) 発明者	フレイ、ガーハード
			アメリカ合衆国、92129 カリフォル
			ニア州、サン ディエゴ、13768 ヴ
			ィア サイマ ベラ
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CD22抗体

## (57) 【要約】

抗CD22抗体、ならびにそれを作製する方法および使用する方法であって、この抗CD22抗体は、少なくとも1のこのような抗CD22抗体をコードする単離された核酸、ベクター、宿主細胞、トランスジェニック動物または植物を含み、この方法は治療組成物、方法、およびデバイスを含む。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトCD22に結合する単離された抗体または抗体フラグメントであって、配列ID番号49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、または64のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域と、配列ID番号17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、または32のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域と、1若しくはそれ以上のヒト抗体から誘導された定常領域とを有する、単離された抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 2】

ヒトCD22に結合する単離された抗体または抗体フラグメントであって、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015の1若しくはそれ以上からの可変領域から誘導された重鎖および軽鎖の相補性決定領域(CDR)と、1若しくはそれ以上のヒト抗体から誘導された定常領域とを有する、単離された抗体または抗体フラグメント。

10

## 【請求項 3】

請求項1または2記載の抗体またはフラグメントにおいて、前記抗体またはフラグメントは抗CD22マウス抗体のヒトCD22への結合をインビボで競合阻害する、抗体またはフラグメント。

20

## 【請求項 4】

請求項1または2記載の抗CD22抗体または抗体フラグメントにおいて、前記抗体または特殊化された部分若しくはバリエーションは、少なくとも $10^{-9}$  Mの親和性( $K_d$ )でCD22を結合する、抗CD22抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 5】

請求項1または2記載のCD22抗体または抗体フラグメントにおいて、前記抗体または特殊化された部分若しくはバリエーションは、少なくとも $10^{-11}$  Mの親和性( $K_d$ )でCD22を結合する、CD22抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 6】

請求項1または2記載のCD22抗体または抗体フラグメントにおいて、前記抗体または特殊化された部分若しくはバリエーションは、少なくとも $10^{-12}$  Mの親和性( $K_d$ )で結合する、CD22抗体または抗体フラグメント。

30

## 【請求項 7】

請求項1または2記載のCD22抗体または抗体フラグメントにおいて、前記抗体または特殊化された部分若しくはバリエーションは、少なくとも1のCD22の少なくとも1の活性を実質的に中和する、CD22抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 8】

請求項1または2記載の単離されたCD22抗体または特殊化された部分若しくはバリエーションと、担体または希釈剤とを有する、CD22抗体組成物または抗体フラグメント組成物。

40

## 【請求項 9】

細胞、組織、器官、または動物における免疫状態、障害、または疾患を治療する方法であって、少なくとも1の選択された免疫調節有効量の請求項1または2記載の少なくとも1の抗CD22抗体または抗体フラグメントを、前記細胞、組織、器官、または動物と接触させ、または前記細胞、組織、器官、または動物に投与する工程を有する、方法。

## 【請求項 10】

請求項9記載の方法において、前記免疫状態、障害、または疾患は、関節リウマチ/血清反応陰性関節症、骨関節炎、炎症性大腸炎、全身性エリテマトーデス(systematic lupus erythematosus)、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎(uveitis)/視神経炎から選択される少なくとも1つである、方法。

50

## 【請求項 11】

請求項 9 記載の方法において、前記有効量は前記細胞、組織、器官、または動物の 0.0001 ~ 50 mg / キログラムである、方法。

## 【請求項 12】

細胞、組織、器官、または動物における癌性障害または状態を調節する方法であって、薬学的有効量の少なくとも 1 の請求項 1 または 2 記載の抗 CD22 抗体組成物または抗体フラグメントを、前記細胞、組織、器官、または動物と接触させ、または前記細胞、組織、器官、または動物に投与する工程を有する、方法。

## 【請求項 13】

請求項 12 記載の方法において、前記癌性障害または状態が、白血病、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病 (ALL)、B 細胞、T 細胞または FAB ALL、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、ヘアリー細胞白血病、骨髄異形成症候群 (MDS)、リンパ腫、ホジキン病、悪性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、パーキットリンパ腫、および多発性骨髄腫から選択される少なくとも 1 つである、方法。

10

## 【請求項 14】

請求項 12 記載の方法において、前記有効量は前記細胞、組織、器官または動物の 0.01 ~ 100 mg / キログラムである、方法。

## 【請求項 15】

請求項 12 記載の方法において、前記接触させる工程または前記投与する工程が、静脈内、筋肉内、ボーラス、皮下、呼吸、吸入、腔、直腸、頬側、舌下、鼻内、または経皮から選択される少なくとも 1 つの様式によるものである、方法。

20

## 【請求項 16】

請求項 1 または 2 記載の少なくとも 1 つの抗 CD22 抗体組成物または抗体フラグメントを有する医療用デバイスであって、前記デバイスは、静脈内、筋肉内、ボーラス、皮下、呼吸、吸入、腔、直腸、頬側、舌下、鼻内、または経皮から選択される少なくとも 1 つの様式によって、前記少なくとも 1 つの CD22 抗体組成物または抗体フラグメントを接触させ、または投与することに適している、医療用デバイス。

## 【請求項 17】

単離された完全ヒト抗体組成物またはその抗体フラグメントであって、前記抗体または特殊化された部分若しくはバリエーションが、請求項 1 または 2 記載の抗 CD22 抗体またはフラグメントと同じエピトープまたは抗原性領域を結合する、単離された完全ヒト抗体組成物または抗体フラグメント。

30

## 【請求項 18】

請求項 1 または 2 記載の少なくとも 1 つの抗 CD22 抗体組成物または抗体フラグメントと、滅菌水、滅菌緩衝化水、またはフェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム、アルキルパラベン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、およびチメロサル、若しくはこれらの混合物から成る群から選択される水性希釈剤中の少なくとも 1 つの保存剤から選択される少なくとも 1 つの担体とを有する製剤。

40

## 【請求項 19】

請求項 18 記載の製剤において、抗 CD22 抗体組成物または抗体フラグメントの濃度は約 0.1 mg / ml ~ 約 100 mg / ml である、製剤。

## 【請求項 20】

請求項 18 記載の製剤であって、さらに、等張剤を有する、製剤。

## 【請求項 21】

請求項 18 記載の製剤であって、さらに、生理学的に許容可能な緩衝液を有する、製剤。

## 【請求項 22】

50

第 1 の容器中における凍結乾燥型の請求項 1 または 2 記載の少なくとも 1 つの抗 C D 2 2 抗体組成物または抗体フラグメントと、滅菌水、滅菌緩衝化水、またはフェノール、m - クレゾール、p - クレゾール、o - クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム、アルキルパラベン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、およびチメロサル、若しくはこれらの混合物から成る群から選択される水性希釈剤中の少なくとも 1 つの保存剤を有する選択的な第 2 の容器とを有する、キット。

【請求項 2 3】

請求項 2 2 記載のキットにおいて、抗 C D 2 2 抗体組成物または抗体フラグメントの濃度が、約 0 . 1 m g / m l ~ 約 5 0 0 m g / m l の濃度に再構成される、キット。

10

【請求項 2 4】

請求項 2 2 記載のキットであって、さらに、等張剤を有する、キット。

【請求項 2 5】

請求項 2 2 記載のキットであって、さらに、生理学的に許容可能な緩衝液を有する、キット。

【請求項 2 6】

その必要がある患者に請求項 1 8 記載の製剤を投与する工程を有する、少なくとも 1 つの抗 C D 2 2 が媒介する状態を治療する方法。

【請求項 2 7】

20

パッケージング材料と、溶液型または凍結乾燥型の請求項 1 または 2 記載の少なくとも 1 つの C D 2 2 抗体組成物または抗体フラグメントを有する容器とを有する、ヒトの薬学的使用のための製品。

【請求項 2 8】

請求項 2 7 記載の製品において、前記容器は多目的投与のためのストッパーを有するガラスまたはプラスチック容器である、製品。

【請求項 2 9】

請求項 1 または 2 記載の抗 C D 2 2 抗体またはフラグメントを製造する方法であって、前記抗体またはフラグメントをコードするヌクレオチド配列で形質転換された宿主細胞またはトランスジェニック動物またはトランスジェニック植物または植物細胞から前記抗体またはフラグメントを発現させる工程と、そのような抗体またはそのフラグメントをそれから回収する工程とを有する、方法。

30

【請求項 3 0】

請求項 2 9 記載の方法において、前記宿主細胞が、哺乳動物細胞、植物細胞、または酵母細胞である、方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 9 記載の方法において、前記トランスジェニック動物が哺乳動物である、方法。

【請求項 3 2】

請求項 3 1 記載の方法において、前記トランスジェニック哺乳動物が、ヤギ、ウシ、ヒツジ、ウマ、および非ヒト霊長類から選択される、方法。

40

【請求項 3 3】

請求項 1 または 2 記載の少なくとも 1 つの抗体を発現することが可能なトランスジェニック動物または植物。

【請求項 3 4】

請求項 2 9 記載の方法によって産生された少なくとも 1 つの抗 C D 2 2 抗体または特殊化された部分若しくはバリエーション。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

50

本発明は、少なくとも１のＣＤ２２タンパク質またはそのフラグメントに特異的な特殊化された部分またはパリアントを含む抗体、ならびにこのような抗ＣＤ２２抗体をコードする核酸、相補的核酸、ベクター、宿主細胞、ならびに治療用製剤、投与、およびデバイスを含むこれらを製造する方法および使用する方法に関連する。

#### 【背景技術】

##### 【０００２】

ＣＤ２２は、S i g l e c、シアル酸結合受容体タンパク質スーパーファミリーのメンバーであり、Ｂ細胞を発生させることによって産生される。インビボにおいて、Ｂ細胞は、ＣＤ２２の主要な供給源を表す。リンパ腫、白血病およびリンパ球性Ｂ細胞などの他の細胞もまた、ＣＤ２２を産生する。ＣＤ２２は、非ホジキンリンパ腫および急性と慢性の両方の慢性リンパ球性白血病の癌の進行の予後因子として関係があるとされてきた。ＣＤ２２産生は、リンパ節の胚中心におけるＢ細胞分化プロセスによって調節できる。

10

##### 【０００３】

ＣＤ２２リガンド、シアル酸含有細胞外表面分子は、体液性免疫応答の間に、発生しつつあるＢ細胞上で発現されたＣＤ２２受容体に結合できる。ＣＤ２２受容体は、ＣＤ２２-リガンド結合の原因である免疫グロブリン様反復配列を有する。

##### 【０００４】

ＣＤ２２の少なくとも２の主要な生物学的機能が存在する：ＣＤ２２は、Ｂ細胞受容体複合体（ＢＣＲ）と相互作用して、細胞内シグナル伝達を刺激してＢ細胞分化と免疫グロブリンの産生と促進でき、そしてまた、ＢＣＲと相互作用して、細胞内シグナル伝達なら

20

#### 【発明の概要】

#### 【発明が解決しようとする課題】

##### 【０００５】

リンパ腫、急性および慢性白血病、ならびに他のＢ細胞異形成およびＢ細胞依存性自己免疫疾患に関連する状態を、予防、治療、改善、または診断する際の使用のための、ＣＤ２２に対する高親和性中和キメラ抗体またはヒト抗体、またはそのフラグメントを提供する必要性が存在する。

30

#### 【課題を解決するための手段】

##### 【０００６】

#### 発明の要旨

本発明は、高親和性ＶＭ１０００、ＶＭ１００１、ＶＭ１００２、ＶＭ１００３、ＶＭ１００４、ＶＭ１００５、ＶＭ１００６、ＶＭ１００７、ＶＭ１００８、ＶＭ１００９、ＶＭ１０１０、ＶＭ１０１１、ＶＭ１０１２、ＶＭ１０１３、ＶＭ１０１４、またはＶＭ１０１５抗ＣＤ２２抗体から誘導された少なくとも１の抗原結合領域を有する単離されたヒト化抗ＣＤ２２抗体、ならびに抗ＣＤ２２抗体組成物、これらの抗ＣＤ２２抗体の結合体バージョン、これらに関連するコード核酸または相補的核酸、ベクター、宿主細胞、組

40

##### 【０００７】

本発明は、本明細書に記載されるような少なくとも１の単離された抗ＣＤ２２抗体を提供する。本発明に従う抗体は、ＶＭ１０００、ＶＭ１００１、ＶＭ１００２、ＶＭ１００３、ＶＭ１００４、ＶＭ１００５、ＶＭ１００６、ＶＭ１００７、ＶＭ１００８、ＶＭ１００９、ＶＭ１０１０、ＶＭ１０１１、ＶＭ１０１２、ＶＭ１０１３、ＶＭ１０１４、またはＶＭ１０１５のいずれか１つ、または、ＶＭ１０００、ＶＭ１００１、ＶＭ１００２

50

、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015の1から誘導されたそれらの重鎖または軽鎖またはリガンド結合部分の少なくとも1の相補性決定領域(CDR)(例えば、CDR1、CDR2またはCDR3)を有する任意のタンパク質またはペプチド分子を、本発明の抗体に取り込むことができる、重鎖または軽鎖定常領域、フレームワーク領域、またはこれらの任意の部分と組み合わせて含む。1つの実施形態において、本発明は、軽鎖および重鎖を有する抗CD22抗体に向けられ、これらの鎖の各々は、ヒト定常領域の少なくとも一部、および、各々がヒトCD22に特異性を有する、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015の1若しくはそれ以上から誘導された可変領域(v)の少なくとも一部を有し、上記抗体は、ヒトCD22の阻害および/または中和エピトープに対して高い親和性で結合する。本発明はまた、このような抗体のフラグメントまたは誘導体、例えば、抗体鎖の1若しくはそれ以上の部分、例えば、重鎖定常領域、重鎖連結領域、重鎖多様性若しくは可変領域、または軽鎖定常領域、軽鎖連結領域、若しくは可変領域もまた含む。

#### 【0008】

この抗体は、抗CD22抗体(このような用語は本明細書に規定される通りである)から誘導された少なくとも1の相補性決定領域(CDR)(例えば、重鎖または軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、またはCDR3)の少なくとも1の特殊化された部分、および/または少なくとも1の定常領域若しくは可変フレームワーク領域若しくはその任意の部分を含むことができる。抗体アミノ酸配列は、さらに、本明細書に記載されるような、または当該分野において公知であるような、少なくとも1の特殊化された置換、挿入、または欠失を選択的に有することができる。

#### 【0009】

本発明の好ましい抗体は、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015、ならびにこれらのフラグメントおよび領域を含む。

#### 【0010】

1つの実施形態において、本開示は、配列ID番号49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、または64のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域；配列ID番号17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、または32のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域；および1若しくはそれ以上のヒト抗体から誘導された定常領域を有する、単離された抗体、またはヒトCD22に結合する抗体フラグメントを提供する。1つの態様において、本開示は、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015の1若しくはそれ以上からの可変領域から誘導された重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)、ならびに1若しくはそれ以上のヒト抗体から誘導された定常領域を有する、単離された抗体、またはヒトCD22に結合する抗体フラグメントを提供する。別の態様において、本開示は、請求項1または2記載の抗体またはフラグメントを提供し、上記抗体またはフラグメントは、抗CD22マウス抗体のヒトCD22への結合をインビボで競合阻害する。

#### 【0011】

本発明の好ましい抗体は、ヒトCD22を結合し、CD22チロシンリン酸化および内在化を誘導し、ならびにB細胞増殖および分化をネガティブに調節するものである。競合阻害によるモノクローナル抗体の特異性および親和性を決定するための好ましい方法は、

参照により本願に組み込まれる、Harlow, et al, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988)に見出すことができる。例えば、(Stein R, Belisle E, Hansen HJ, Goldenberg DM: Epitope specificity of the anti-(B cell lymphoma) monoclonal antibody, LL2. Cancer Immunol Immunother 1993, 37: 293 - 298)によって記載されているように、本発明の少なくとも1の抗体は、ヒトCD22タンパク質、サブユニット、フラグメント、部分、またはこれらの任意の組み合わせに対して特異的な少なくとも1の特殊化されたエピトープを結合する。モノクローナル抗体LL2は、CD22の細胞外ドメインにおける第3の免疫グロブリン(Ig)反復配列に結合し、CD22を発現するB細胞集団およびリンパ腫および白血病細胞に対するその調節効果のために重要である。このエピトープは、少なくとも1の抗体結合領域を有することができ、このエピトープは、好ましくは、少なくとも1のその部分の少なくとも1~5アミノ酸から構成され、例えば、これに限定されるものではないが、ヒトCD22タンパク質の機能的ドメイン、細胞外ドメイン、可溶性ドメイン、親水性ドメイン、外部ドメイン、または細胞質ドメイン、またはこれらの任意の部分の少なくとも1である。

10

#### 【0012】

1つの実施形態において、本発明は、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015、ならびにこれらをコードする核酸配列の1から少なくとも1の可変領域を有する、少なくとも1の単離された哺乳動物抗CD22抗体を提供する。

20

#### 【0013】

別の態様において、本発明は、(i) VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、若しくはVM1015から誘導される重鎖相補性決定領域(CDR)アミノ酸配列のすべておよびこれらをコードする核酸配列、または(ii) VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、若しくはVM1015の1からの軽鎖CDRアミノ酸配列のすべておよびこれらをコードする核酸配列のいずれかを有する少なくとも1の単離された哺乳動物抗CD22抗体を提供する。

30

#### 【0014】

別の態様において、本発明は、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015から誘導されたアミノ酸配列を有する少なくとも1の重鎖または軽鎖CDR、ならびにこれらをコードする核酸配列を有する、少なくとも1の単離された哺乳動物抗CD22抗体を提供する。

40

#### 【0015】

他の態様において、本発明は、少なくとも1のヒトCDRを有するかまたはヒトCDRを有さない、少なくとも1の単離された哺乳動物キメラ、ヒト化、またはCDR移植抗CD22抗体を提供し、ここで、この抗体は、ヒトCD22のエピトープの少なくとも1~3アミノ酸を有する少なくとも1のエピトープを特異的に結合する。

#### 【0016】

少なくとも1の抗体は、一定の親和性(少なくとも $10^{-9}$  M、好ましくは、少なくとも $10^{-10}$  Mの $K_D$ )でCD22をさらに選択的に結合し、および/または少なくとも1

50

のCD22タンパク質の少なくとも1の活性を実質的に中和することができる。好ましい実施形態において、抗体は、少なくとも $5 \times 10^{-10}$  M、好ましくは、 $5 \times 10^{-11}$ 、より好ましくは、 $5 \times 10^{-12}$ の親和性( $K_D$ )でCD22を結合し、ヒトCD22を中和する。

【0017】

本発明は、1つの態様において、上述の特異的抗CD22抗体をコードするポリヌクレオチドを有し、これと相補的であり、またはこれにハイブリダイズする単離された核酸分子を提供し、これは、少なくとも1のその特殊化された配列、ドメイン、部位、またはバリエーションを有する。本発明は、上記CD22抗体核酸分子を有する組換えベクター、このような核酸分子および/若しくは組換えベクターを含有する宿主細胞、ならびにこのような抗体核酸、ベクター、および/若しくは宿主細胞を作製する方法および/若しくは使用する方法をさらに提供する。それゆえに、本発明は、少なくとも1の単離された哺乳動物抗CD22抗体をコードする単離された核酸；単離された核酸を有する単離された核酸ベクター、および/または単離された核酸を有する原核生物若しくは真核生物宿主細胞を有する。宿主細胞は、選択的に、COS-1、COS-7、HEK293、BHK21、CHO、BSC-1、Hep G2、653、SP2/0、293、HeLa、骨髓腫、またはリンパ腫細胞、またはその任意の誘導体、不死化細胞若しくは形質転換細胞から選択される少なくとも1であり得る。CD22抗体が検出可能なまたは回収可能な量で発現されるように、インビトロ、インビボ、またはインサイチュの条件下で、核酸をコードする抗体を翻訳する工程を有する、少なくとも1のCD22抗体を産生するための方法もまた提供される。

10

20

【0018】

本発明はまた、少なくとも1の抗CD22抗体が検出可能なおよび/または回収可能な量で発現される条件下で、本明細書に記載されるように宿主細胞を培養する工程を有する、宿主細胞中で、少なくとも1の上述の抗CD22抗体を発現するための少なくとも1の方法も提供する。

【0019】

本発明はまた、(a)本明細書に記載されるような単離された抗CD22抗体をコードする核酸および/または抗体；ならびに(b)適切な担体または希釈剤を有する、少なくとも1の組成物も提供する。この担体または希釈剤は、選択的に、公知の担体または希釈剤に従って、薬学的に受容可能であり得る。この組成物は、選択的に、さらなる化合物、タンパク質、または組成物の少なくとも1をさらに有することができる。

30

【0020】

本発明はさらに、当該分野において公知であるように、および/または本明細書に記載されるように、細胞、組織、器官、動物または患者における少なくとも1のCD22関連状態を調節または治療するために、および/または関連する状態の前、それに続いて、またはその間に、治療有効量を投与するための、少なくとも1の抗CD22抗体の方法または組成物を提供する。それゆえに、本発明は、有効量の少なくとも1の単離された本発明の抗CD22抗体を有する組成物を、細胞、組織、器官、または動物と、または細胞、組織、器官、または動物に、接触または投与する工程を有する、細胞、組織、器官、または動物におけるCD22関連状態を診断または治療するための方法を提供する。この方法は、細胞、組織、器官、または動物に対して、有効量の0.001~50mg/キログラムの本発明の抗CD22抗体を使用する工程を選択的にさらに有することができる。この方法は、経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内(intrarticular)、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、腔内(intracavitary)、腔内(intracellular)、小脳内(intracerebellar)、脳室内、結腸内、頸部内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボーラス、膣、直腸、頬側、舌下、鼻内、または経皮から選択される少なくとも1の様式によって、接触または投与を使用する工程を選択的にさらに有することができる。この方法は、検出可能な標識また

40

50



はレポーター、TNFアンタゴニスト、抗リウマチ剤、筋弛緩剤、麻薬、非ステロイド系抗炎症薬物（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断薬（neuromuscular blocker）、抗菌剤、抗乾癬剤、副腎皮質ステロイド、アナボリックステロイド、エリスロポエチン、免疫付与、免疫グロブリン、免疫抑制剤、成長ホルモン、ホルモン補充薬物、放射性医薬品、抗鬱剤、抗精神病薬、興奮剤、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、エピネフリンまたはそのアナログ、細胞毒性薬または他の抗癌剤、メトトレキサートなどの代謝拮抗物質、抗増殖剤、サイトカイン、サイトカインアンタゴニスト、および抗TNFまたは他のモノクローナル抗体または二機能抗体の少なくとも1から選択される、有効量の少なくとも1の化合物またはタンパク質を有する少なくとも1の組成物を、抗体を接触させる工程または投与する工程の前に、それと同時に、またはその後に、投与する工程を選択的にさらに有することができる。

10

#### 【0021】

本発明はさらに、当該分野において公知であるように、および/または本明細書に記載されるように、細胞、組織、器官、動物または患者において、および/または関連する状態の前、それに続いて、若しくはその間に、少なくとも1のCD22関連状態を診断するために、少なくとも1の抗CD22抗体の方法をさらに提供する。

#### 【0022】

本発明はまた、本発明に従う、少なくとも1の抗CD22抗体の診断のための、少なくとも1の組成物、デバイス、および/または送達の方法も提供する。

#### 【0023】

本発明の少なくとも1の単離された哺乳動物抗CD22抗体を有する医療用デバイスもまた提供され、ここで、このデバイスは、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内（intrarticular）、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、腔内（intracavitary）、腔内（intracellic）、小脳内（intracerebellar）、脳室内、結腸内、頸部内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポラス、膈、直腸、頬側、舌下、鼻内、または経皮から選択される少なくとも1の様式によって、少なくとも1の抗CD22抗体を接触または投与するために適切である。

20

#### 【0024】

さらなる態様において、本開示は、第1の容器に凍結乾燥型の本開示の少なくとも1の抗CD22抗体またはフラグメント、ならびに、滅菌水、滅菌緩衝化水、または、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム、アルキルパラベン、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウムおよびチメロサル、若しくはこれらの混合物から成る群から選択される水性希釈剤中の少なくとも1の保存剤を有する選択的な第2の容器を有するキットを提供する。1つの態様において、キット中で、第1の容器における抗CD22抗体または特殊化された部分若しくはバリエーションの濃度は、第2の容器の内容物とともに、約0.1mg/ml～約500mg/mlの濃度まで再構成される。別の態様において、第2の容器は、さらに、等張剤を有する。別の態様において、第2の容器は、さらに、薬学的に受容可能な緩衝液を有する。1つの態様において、本開示は、キットの中で提供されかつ投与前に再構成される製剤を、投与が必要な患者に投与する工程を有する、少なくとも1の抗CD22媒介状態を治療する方法を提供する。

30

40

#### 【0025】

パッケージング材料、および溶液型または凍結乾燥型である本発明の少なくとも1の単離された哺乳動物抗CD22抗体を有する容器を有する、ヒトの薬学的使用または診断的使用のための製品もまた提供される。この製品は、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内（intrarticular）、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、腔内（intracavitary）、腔内（intracellic）、小脳内（intracerebellar）

50

e l l a r )、脳室内、結腸内、頸部内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ボールス、膈、直腸、頬側、舌下、鼻内、または経皮の送達デバイスまたはシステムの構成要素としての容器を有することを選択的に有することができる。

【 0 0 2 6 】

本発明はさらに、本明細書に記載されるいずれかの発明を提供する。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 7 】

【図 1】図 1 は、V M 1 0 0 0 の軽鎖（配列 I D 番号： 1、 1 7）および重鎖（配列 I D 番号： 3 3、 4 9）の可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

10

【図 2】図 2 は、V M 1 0 0 1 の軽鎖（配列 I D 番号： 2、 1 8）および重鎖（配列 I D 番号： 3 4、 5 0）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 3】図 3 は、V M 1 0 0 2 の軽鎖（配列 I D 番号： 3、 1 9）および重鎖（配列 I D 番号： 3 5、 5 1）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 4】図 4 は、V M 1 0 0 3 の軽鎖（配列 I D 番号： 4、 2 0）および重鎖（配列 I D 番号： 3 6、 5 2）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 5】図 5 は、V M 1 0 0 4 の軽鎖（配列 I D 番号： 5、 2 1）および重鎖（配列 I D 番号： 3 7、 5 3）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 6】図 6 は、V M 1 0 0 5 の軽鎖（配列 I D 番号： 6、 2 2）および重鎖（配列 I D 番号： 3 8、 5 4）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

20

【図 7】図 7 は、V M 1 0 0 6 の軽鎖（配列 I D 番号： 7、 2 3）および重鎖（配列 I D 番号： 3 9、 5 5）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 8】図 8 は、V M 1 0 0 7 の軽鎖（配列 I D 番号： 8、 2 4）および重鎖（配列 I D 番号： 4 0、 5 6）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 9】図 9 は、抗 C D 2 2 A b V M 1 0 0 8 の軽鎖（配列 I D 番号： 9、 2 5）および重鎖（配列 I D 番号： 4 1、 5 7）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 1 0】図 1 0 は、V M 1 0 0 9 の軽鎖（配列 I D 番号： 1 0、 2 6）および重鎖（配列 I D 番号： 4 2、 5 8）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

30

【図 1 1】図 1 1 は、V M 1 0 1 0 の軽鎖（配列 I D 番号： 1 1、 2 7）および重鎖（配列 I D 番号： 4 3、 5 9）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 1 2】図 1 2 は、V M 1 0 1 1 の軽鎖（配列 I D 番号： 1 2、 2 8）および重鎖（配列 I D 番号： 4 4、 6 0）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 1 3】図 1 3 は、V M 1 0 1 2 の軽鎖（配列 I D 番号： 1 3、 2 9）および重鎖（配列 I D 番号： 4 5、 6 1）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 1 4】図 1 4 は、V M 1 0 1 3 の軽鎖（配列 I D 番号： 1 4、 3 0）および重鎖（配列 I D 番号： 4 6、 6 2）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

40

【図 1 5】図 1 5 は、V M 1 0 1 4 の軽鎖（配列 I D 番号： 1 5、 3 1）および重鎖（配列 I D 番号： 4 7、 6 3）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 1 6】図 1 6 は、V M 1 0 1 5 の軽鎖（配列 I D 番号： 1 6、 3 2）および重鎖（配列 I D 番号： 4 8、 6 4）可変領域についての核酸配列およびアミノ酸配列をそれぞれ示す。

【図 1 7】図 1 7 は、本発明の V M 1 0 0 0、V M 1 0 0 1、V M 1 0 0 2、V M 1 0 0 3、V M 1 0 0 4、V M 1 0 0 5、V M 1 0 0 6、V M 1 0 0 7、V M 1 0 0 8、V M 1

50

009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015の選択されたクローンの親和性ELISA分析についてのデータを示す。

【図18】図18は、本発明のVM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015、ならびに対照（VM006GおよびVM006H）の組換えCD22細胞外ドメインについての親和性定数（KD）の表面プラズモン共鳴（SPR）測定を示す。

【図19】図19は、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015、ならびに対照からの選択されたクローンの蛍光活性化セルソーティング（FACS）による、Dauidi、RAMOS、およびRAJI B細胞系統などの、CD22を発現するヒトリンパ腫細胞に対する、表面結合および内在化分析についてのデータを示す。各ボックスの右のすべてのピークは対照（抗体なし）を表し；各ボックスの左のすべてのピークは抗体ありのデータを示し、それによって、より低い蛍光シグナルへのシフトは受容体/抗体の内在化を示す。ボックス1はポジティブ対照抗体を示し、ボックス2はVM1000を示し、ボックス3はVM1001を示し、ボックス4はVM1002を示し、ボックス5はVM1004を示し、ボックス6はVM1005を示し、ボックス7はVM1006を示し、そしてボックス8はVM1011を示す。

【図20】図20は、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015、ならびに対照（BA006G）のFACSを使用する、表面結合および内在化分析からのデータを有する表を示す。

【図21】図21は、本発明の抗体VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015の定量的共焦点免疫蛍光顕微鏡法を使用する、急速な表面結合および細胞内内在化についてのデータを示す。

【図22】図22Aおよび22Bは、本発明のVM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015からの選択された抗体への曝露の際に、ヒトリンパ腫細胞系統Dauidiの表面上に提示されたCD22のCD22チロシンリン酸化の誘導を示す。

【図23】図23は、霊長類種、カニクイザル マカクザル（Macaca fascicularis）の細胞で発現されるCD22に対する抗CD22抗体の交差反応性を実証するデータを示す。各試験条件の細胞は、PBSで洗浄され、次いで、PBS中の4%ホルムアルデヒドで室温にて10分間、固定された。次いで、細胞は、2%FBSを含有する0.5mlのPBSに再懸濁され、次いで、蛍光活性化セルソーティング（FACS）分析（1）によって、CD22およびCD20表面染色について分析された。抗体で処理されなかった細胞は、FITCまたはPEチャネルのいずれにおいても感知できるほどの蛍光強度のシフトを有さなかった（1A）のに対して、VM101-PEで染色された細胞はCD22ポジティブ集団を含有した（1B）。同様に、抗CD20-FITCで染色された細胞はCD20ポジティブ集団を含有した（1C）。VM101-PE抗体とCD20-FITC抗体の両方で染色された細胞は、PBM中での両方の抗原の発現パターンに基づいて予測されるように、二重標識集団を有する（1D）。VM101は、カニクイザルCD22タンパク質を特異的に認識する。

10

20

30

40

50

【図 2 4】図 2 4 は、哺乳動物細胞中の本発明の抗 C D 2 2 抗体の高いレベルの発現データを示す。

【発明を実施するための形態】

【0028】

引用

本明細書に引用されるすべての刊行物および特許は、あたかもこれらが本明細書の時点での当該分野の状態を示し、ならびに / または本発明の説明および実施可能性を提供するように、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。刊行物とは、任意の科学刊行物、または特許刊行物、またはすべての記録された形式、電子的形式、若しくは印刷形式を含む任意の媒体形式で利用可能な任意の他の情報をいう。以下の引用文献は、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987 - 2001) ; Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. sup. nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) ; Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989) ; Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994 - 2001) ; Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997 - 2001)。

10

20

【0029】

アミノ酸コード

本発明の抗 C D 2 2 抗体を形作るアミノ酸はしばしば略記される。アミノ酸記号表示は、当該分野において十分に理解されているように、アミノ酸を、その一文字コードによって、その三文字コードによって、名称によって、または 3 ヌクレオチドコドンによって、記号表示することによって示されることができる (Alberts, B., et al., Molecular Biology of The Cell, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994 を参照のこと)。

30

【0030】

定義

本明細書で使用される場合、「抗 C D 2 2 抗体」、「抗 C D 2 2 抗体」、「抗 C D 2 2 抗体部分」、または「抗 C D 2 2 抗体フラグメント」および / 若しくは「抗 C D 2 2 抗体バリエーション」などは、免疫グロブリン分子の少なくとも一部を有する分子を含有する任意のタンパク質またはペプチドを含み、この分子は、本発明の抗体に組み込むことができる、非マウス起源、好ましくはヒト起源の、重鎖若しくは軽鎖可変領域、重鎖若しくは軽鎖定常領域、フレームワーク領域、またはその任意の部分と組み合わせ、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、または VM1015 の少なくとも 1 から誘導されたその重鎖または軽鎖またはリガンド結合部分の少なくとも 1 の相補性決定領域 (CDR) を含有する。あるいは、「抗 C D 2 2 抗体」という用語は、集合的にまたは個別に、ヒト化モノクローナル抗体 VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、および VM1015 をいうべきである。このような抗体は、インビトロ、インサイチュ、および / またはインビボにおいて、少なくとも 1 の C D 2 2 活性または結合を、または C D 2 2 受容体活性または結合を、調節し、減少し、これと拮抗し、これを軽減し、緩和し、遮断し

40

50

、阻害し、無効にし、および／またはこれに干渉することが可能である。非限定的な例として、適切な本発明の抗CD22抗体、特殊化された部分、またはバリエーションは、モノクローナル抗体VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015の少なくとも1によって認識されるヒトCD22の阻害エピトープおよび／または中和エピトープに高い親和性で結合できる。適切な抗CD22抗体、特殊化された部分、またはバリエーションはまた、選択的に、例えば、RNA、DNAまたはタンパク質合成、CD22放出、CD22受容体シグナル伝達、膜CD22切断、CD22活性、CD22産生および／または合成であるがこれらに限定されない、CD22活性または機能の少なくとも1に影響を与えることができる。

10

#### 【0031】

「抗体」という用語は、さらに、抗体、その消化フラグメント、特殊化された部分、およびバリエーションを包含することが意図され、これは抗体模倣物を含むか、または、単鎖抗体若しくはそのフラグメントを含む、抗体若しくは特殊化されたフラグメント若しくはその部分の構造および／または機能を模倣する抗体の部分を含み、各々が抗CD22から誘導された少なくとも1のCDRを含有する。機能的フラグメントは、哺乳動物CD22に結合する抗原結合フラグメントを含む。例えば、これに限定されるものではないが、Fabフラグメント（例えば、パイン消化による）、Fab'フラグメント（例えば、ペプシン消化および部分的還元による）およびF(ab')<sub>2</sub>フラグメント（例えば、ペプシン消化による）、fabcフラグメント（例えば、ブラスミン消化による）、pFc'フラグメント（例えば、ペプシンまたはブラスミン消化による）、Fdフラグメント（例えば、ペプシン消化、部分的還元、および再凝集による）、FvまたはscFvフラグメント（例えば、分子生物学技術による）を含むCD22またはその部分に結合が可能である抗体フラグメントは、本発明によって包含される（例えば、Colligan, Immunology、前出を参照のこと）。

20

#### 【0032】

抗体フラグメントは、当該分野において公知であるように、および／または本明細書に記載されるように、酵素的切断、合成または組換え技術によって産生できる。抗体はまた、1若しくはそれ以上の終始コドンが天然の終始部位の上流に導入されている抗体遺伝子を使用して、様々な短縮型で産生できる。例えば、F(ab')<sub>2</sub>重鎖部分をコードする組み合わせ遺伝子は、重鎖のCH<sub>1</sub>ドメインおよび／またはヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計できる。抗体の様々な部分は、従来の技術によって化学的に一緒に結合でき、または遺伝子操作技術を使用して隣接タンパク質として調製できる。

30

#### 【0033】

本明細書で使用される場合、「キメラ」抗体または「ヒト化」抗体または「CDR移植」は、本明細書に記載される抗CD22 Absの任意の組み合わせ、または、そこから誘導された任意のCDRであって、非マウス、好ましくは、ヒト抗体から誘導された1若しくはそれ以上のタンパク質若しくはペプチドと組み合わされたものを含む。本発明に従うと、キメラ抗体またはヒト化抗体は、CDRが、本明細書に記載される1若しくはそれ以上の抗CD22 Abから誘導され、そして抗体の少なくとも一部、または残りは、1若しくはそれ以上のヒト抗体から誘導されるものを含む。従って、抗体のヒト部分は、ヒトにおいて実質的に非免疫原性である、フレームワークドメイン、CLドメイン、CHドメイン（例えば、CH<sub>1</sub>、CH<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>）、ヒンジ、(VL、VH)領域を含んでもよい。ヒト抗体から誘導される抗体の領域は、ヒト抗体と100%の同一性を有する必要はない。好ましい実施形態において、免疫原性が無視できるように、可能な限り多くのヒトアミノ酸残基が保持されるが、しかし、ヒト残基は、抗体のヒト化を同時に最大化しながら、CDRによって形成された抗原結合部位を支持するために必要に応じて修飾されてもよい。このような変化またはパリエーションは、選択的にまたは好ましくは、非修飾抗体と比較して、ヒトまたは他の種において免疫原性を保持または減少している。ヒト化抗

40

50

体は、再配置されたヒト免疫グロブリン（例えば、重鎖および／または軽鎖）遺伝子を機能的に発現可能である非ヒト動物または原核生物細胞または真核生物細胞によって産生できることが指摘される。さらに、抗体が単鎖抗体であるとき、これは、ネイティブヒト抗体においては見出されないリンカーペプチドを有することができる。例えば、Fvは、2～約8個のグリシンまたは他のアミノ酸残基などのリンカーペプチドを有することができる、これは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域を連結する。このようなリンカーペプチドはヒト起源であると見なされる。

#### 【0034】

抗体のヒト化は、例えば、個別のヒトフレームワークのプールに、インフレームで融合された非ヒト標的モノクローナル抗体の6つのCDRを有するコンビナトリアルライブラリーを合成することによって実施できる。すべての公知の重鎖および軽鎖ヒト生殖系列遺伝子を表す遺伝子を含むヒトフレームワークライブラリーが利用できる。次いで、得られたコンビナトリアルライブラリーは、関心対象の抗原に結合することについてスクリーニングできる。このアプローチは、親の抗体に対する結合活性を維持することによって、完全なヒトフレームワークの最も好ましい組み合わせの選択を可能にできる。次いで、ヒト抗体は、様々な技術によってさらに最適化できる。

10

#### 【0035】

全長抗体分子については、免疫グロブリン遺伝子は、ハイブリドーマ細胞系統のゲノムDNAまたはmRNAから入手できる。抗体重鎖および軽鎖は、哺乳動物ベクター系の中でクローニングされる。アセンブリーは二本鎖配列分析を用いて報告されている。抗体構築物は、他のヒトまたは哺乳動物宿主細胞系統において発現できる。次いで、この構築物は、一過性トランスフェクションアッセイおよび関心対象の発現された抗体のウェスタンブロット分析によって確認できる。最高の生産性を有する安定な細胞系統は、迅速アッセイ方法を使用して単離およびスクリーニングできる。

20

#### 【0036】

いくつかの刊行物が、本発明の抗CD22抗体を含む、抗CD22抗体の使用、適用、ならびに使用方法および適用方法を詳細に記載しており、これらは、例えば、「Humanized Anti-CD22 Antibodies and Their Use」という表題の米国特許出願第20110182887号、「Human Monoclonal Antibodies Specific for CD22」という表題の米国特許出願第20110020344号、および「Human Antibodies That Bind CD22 and Uses Thereof」という表題の米国特許出願第20100143368号であり、これらのすべてが、この参照により本明細書に組み込まれる。

30

#### 【0037】

##### 本発明の抗体

本発明に従うと、抗CD22抗体は、抗体VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015、または可変領域若しくはCDRが、抗体VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、若しくはVM1015のいずれか1つから誘導され、抗体のフレームワークおよび定常領域が1若しくはそれ以上のヒト抗体から誘導された抗体のいずれか1つを有する。キメラ抗体がCD22に結合しかつ阻害する能力を維持している限り、置換、挿入、および欠失を含む任意のおよびすべての修飾が意図されるが、抗体から誘導された可変領域またはCDRは、好ましくは、抗体VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015のいずれか1つの可変領域またはC

40

50

D Rと、約90%～約100%の同一性を有する。ヒト抗体から誘導されるキメラ抗体、ヒト化抗体、またはCDR移植抗体の領域は、ヒト抗体と100%同一性を有する必要はない。好ましい実施形態において、免疫原性が無視できるように、可能な限り多くのヒトアミノ酸残基が保持されるが、しかし、ヒト残基、特に、フレームワーク領域の残基は、本発明に従って、必要に応じておよび以下に教示されるように置換される。本明細書に開示されるようなこのような修飾は、抗体のヒト化を同時に最大化しながら、CDRによって形成された抗原結合部位を支持するために必要である。

#### 【0038】

本発明に従って、抗CD22抗体の可変領域（軽鎖および重鎖）の核酸配列および推定アミノ酸配列は、図1～15に示される。重鎖および軽鎖の可変領域の各々は、組み合わせて抗原結合部位を形成する3つのCDRを含有する。これらの3つのCDRは、主としてCDRを支持するように機能する4つのフレームワーク領域によって取り囲まれている。重鎖および軽鎖の可変領域の配列の中のCDRの配列は、Kabat et al. (1987) in Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4<sup>th</sup> ed., United States Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office, Washington, D.C.に従うコンピュータ支援アラインメントによって、または例えば、Levitt (1983) J. Mol. Biol. 168:595によって記載されるようなENCADプログラムを利用する可変領域の分子モデリングによって、同定できる。

#### 【0039】

好ましい実施形態において、CDRは、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015のいずれか1つから誘導される。重鎖CDRおよび軽鎖CDRの決定は、十分に当業者の範囲内である。例えば、<http://www.bioinf.org.uk/abs/>を参照のこと。

#### 【0040】

抗CD22抗体のCDRの配列は、CDR移植抗体がヒトCD22に結合しかつこれを阻害する能力を維持する程度まで、挿入、置換、および欠失によって修飾されてもよい。当業者は、本明細書中以下に記載されている機能アッセイを実施することによって、この活性の維持を確認することができる。

#### 【0041】

あるいは、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015のいずれか1つの全体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域が、ヒト定常領域およびフレームワーク領域と組み合わせられて、本発明のキメラ抗体を形成してもよい。クローンVM1000は軽鎖VM1000LC（配列ID番号1）および重鎖VM1000HC（配列ID番号33）を有する。クローンVM1001は軽鎖VM1001LC（配列ID番号2）および重鎖VM1001HC（配列ID番号34）を有する。クローンVM1002は軽鎖VM1002LC（配列ID番号3）および重鎖VM1002HC（配列ID番号35）を有する。クローンVM1003は軽鎖VM1003LC（配列ID番号4）および重鎖VM1003HC（配列ID番号36）を有する。クローンVM1004は軽鎖VM1004LC（配列ID番号5）および重鎖VM1004HC（配列ID番号37）を有する。クローンVM1005は軽鎖VM1005LC（配列ID番号6）および重鎖VM1005HC（配列ID番号38）を有する。クローンVM1006は軽鎖VM1006LC（配列ID番号7）および重鎖VM1006HC（配列ID番号39）を有する。クローンVM1007は軽鎖VM1007LC（配列ID番号8）および重鎖VM1007HC（配列ID番号40）を有する。クローンVM1008は軽鎖VM1008LC（配

列ID番号9)および重鎖VM1008HC(配列ID番号41)を有する。クローンVM1009は軽鎖VM1009LC(配列ID番号10)および重鎖VM1009HC(配列ID番号42)を有する。クローンVM1010は軽鎖VM1010LC(配列ID番号11)および重鎖VM1010HC(配列ID番号43)を有する。クローンVM1011は軽鎖VM1011LC(配列ID番号12)および重鎖VM1011HC(配列ID番号44)を有する。クローンVM1012は軽鎖VM1012LC(配列ID番号13)および重鎖VM1012HC(配列ID番号45)を有する。クローンVM1013は軽鎖VM1013LC(配列ID番号14)および重鎖VM1013HC(配列ID番号46)を有する。クローンVM1014は軽鎖VM1014LC(配列ID番号15)および重鎖VM1014HC(配列ID番号47)を有する。クローンVM1015は軽鎖VM1015LC(配列ID番号16)および重鎖VM1015HC(配列ID番号48)を有する。

10

20

30

40

50

#### 【0042】

本発明のヒト化抗体の定常(C)領域、フラグメント、および領域をコードするヒト遺伝子は、公知の方法によって、ヒト胎児肝臓ライブラリーから誘導できる。ヒトC領域遺伝子は、ヒト免疫グロブリンを発現および産生するものを含む、任意のヒト細胞から誘導できる。ヒトC<sub>H</sub>領域は、 $\mu$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、および、G1、G2、G3、およびG4などのそのサブタイプを含む、ヒトH鎖の公知のクラスまたはアイソタイプのいずれかから誘導できる。H鎖アイソタイプは抗体の様々なエフェクター機能の原因であるので、C<sub>H</sub>領域の選択は、補体結合、または抗体依存性細胞傷害性(ADCC)の活性などの所望のエフェクター機能によって導かれる。好ましくは、C<sub>H</sub>領域はガンマ1(IgG1)から誘導される。

#### 【0043】

ヒトC<sub>L</sub>領域は、ヒトL鎖アイソタイプ、カッパまたはラムダのいずれか、好ましくは、カッパから誘導できる。

#### 【0044】

ヒト免疫グロブリンC領域をコードする遺伝子は、標準的なクローニング技術(Sambrook, et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)およびAusubel et al., eds. Current Protocols in Molecular Biology (1987-1993))によってヒト細胞から得られる。ヒトC領域遺伝子は、L鎖の2つのクラス、H鎖の5つのクラス、およびこれらのサブクラスを表す遺伝子を含む公知のクローンから容易に利用可能である。F(ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub>およびFabなどのキメラ抗体フラグメントは、適切に短縮化されるキメラH鎖遺伝子を設計することによって調製できる。例えば、F(ab<sup>1</sup>)<sub>2</sub>フラグメントのH鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、H鎖のCH1ドメインおよびヒンジ領域をコードするDNA配列、続いて、翻訳終止コドンを含み、短縮型分子を生じる。

#### 【0045】

一般的に、1つの例において、本発明のヒト化抗体、フラグメント、および領域は、抗CD22特異的抗体のH鎖およびL鎖抗原結合領域をコードするDNAセグメントをクローニングすること、およびこれらのDNAセグメントを、C<sub>H</sub>領域およびC<sub>L</sub>領域を含むDNAセグメントにそれぞれ連結し、全長免疫グロブリンコード遺伝子を産生することによって産生される。

#### 【0046】

抗体の可変領域の配列は、キメラ抗体がヒトCD22に結合しかつこれを阻害する能力を維持する程度まで、挿入、置換、および欠失によって修飾されてもよい。当業者は、本明細書中以下に記載される機能的アッセイを実施することによってこの活性の維持を確認できる。この可変領域は、例えば、配列ID番号: 1~64の可変領域に対して、約50%~約100%相同性を有することができる。好ましい実施形態において、抗体の可変領



域は、配列 I D 番号： 1 ~ 6 4 の可変領域に対して、約 8 0 % ~ 約 1 0 0 % 相同性を有する。より好ましい実施形態において、この可変領域は、配列 I D 番号： 1 ~ 6 4 の可変領域に対して、約 9 0 % ~ 約 1 0 0 % 相同性を有する。

【 0 0 4 7 】

1 つの特定の態様において、本開示の好ましい抗 C D 2 2 M a b は、配列 I D 番号 1 7 ~ 3 2 に対して 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % アミノ酸配列相同性を有する可変軽鎖領域を有し、そしてさらに、配列 I D 番号 4 9 ~ 6 4 に対して 9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % アミノ酸配列相同性を有する可変重鎖領域を有する。

【 0 0 4 8 】

1 つの特定の態様において、本開示の好ましい抗 C D 2 2 M a b は、配列 I D 番号 1 ~ 1 6 の 1 つから選択された可変軽鎖領域を有する。別の特定の態様において、本開示の好ましい抗 C D 2 2 M a b は、配列 I D 番号 3 3 ~ 4 8 の 1 つから選択された可変重鎖領域を有する。

【 0 0 4 9 】

非ヒト抗体またはヒト抗体を操作またはヒト化するための方法が使用でき、当該分野において周知である。一般的に、ヒト化または操作された抗体は、これに限定されるものではないが、非ヒト、例えば、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類または他の哺乳動物である供給源からの 1 若しくはそれ以上のアミノ酸残基を有する。これらのヒトアミノ酸残基は、しばしば、「インポート」残基といわれ、これは、典型的には、既知のヒト配列の「インポート」可変ドメイン、定常ドメイン、または他のドメインから取られる。公知のヒト I g 配列は例えば、以下に開示されている：

[www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi) ;  
[www.atcc.org/phage/hdb.html](http://www.atcc.org/phage/hdb.html) ; [www.sciquest.com/](http://www.sciquest.com/) ; [www.abcam.com/](http://www.abcam.com/) ; [www.antibodyresource.com/onlinecomp.html](http://www.antibodyresource.com/onlinecomp.html) ;  
[www.public.iastate.edu/.about.pedro/research\\_tools.html](http://www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html) ; [www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html](http://www.mgen.uni-heidelberg.de/SD/IT/IT.html) ; [www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm](http://www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm) ;  
[www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html](http://www.library.thinkquest.org/12429/Immune/Antibody.html) ;  
[www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/](http://www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab/) ;  
[www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html](http://www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html) ; [www.antibodyresource.com/](http://www.antibodyresource.com/) ;  
[mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html](http://mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html) . [www.immunologylink.com/](http://www.immunologylink.com/) ;  
[pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html](http://pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html) ; [www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/](http://www.biotech.ufl.edu/.about.hcl/) ;  
[www.pebio.com/pa/340913/340913.html](http://www.pebio.com/pa/340913/340913.html) ;  
[www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/](http://www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody/) ;  
[www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html](http://www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html) ; [www.biodesign.com/table.asp](http://www.biodesign.com/table.asp) ;  
[www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html](http://www.icnet.uk/axp/facs/davies/links.html) ;  
[www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html](http://www.biotech.ufl.edu/.about.fccl/protocol.html) ;  
[www.isac-net.org/sites\\_geo.html](http://www.isac-net.org/sites_geo.html) ; [aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html](http://aximtl.imt.uni-marburg.de/.about.rek/AEPStart.html) ; [baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html](http://baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html) ; [www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/](http://www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwvu.edu/) ; [www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu](http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/pu)

10

20

30

40

50

b l i c / I N T R O . h t m l ; w w w . i b t . u n a m . m x / v i r / V \_ m i  
 c e . h t m l ; i m g t . c n u s c . f r : 8 1 0 4 / ;  
 w w w . b i o c h e m . u c l . a c . u k / . a b o u t . m a r t i n / a b s /  
 i n d e x . h t m l ; a n t i b o d y . b a t h . a c . u k / ;  
 a b g e n . c v m . t a m u . e d u / l a b / w w w a b g e n . h t m l ;  
 w w w . u n i z h . c h / . a b o u t . h o n e g g e r / A H O s e m i n a r /  
 S l i d e 0 1 . h t m l ;  
 w w w . c r y s t . b b k . a c . u k / . a b o u t . u b c g 0 7 s / ; w w w .  
 n i m r . m r c . a c . u k / C C / c c a e w g / c c a e w g . h t m ;  
 w w w . p a t h . c a m . a c . u k / . a b o u t . m r c 7 / h u m a n i s a t  
 i o n / T A H H P . h t m l ;  
 w w w . i b t . u n a m . m x / v i r / s t r u c t u r e / s t a t \_ a i m . h  
 t m l ;  
 w w w . b i o s c i . m i s s o u r i . e d u / s m i t h g p / i n d e x . h t  
 m l ;  
 w w w . c r y s t . b i o c . c a m . a c . u k / . a b o u t . f m o l i n a /  
 W e b - p a g e s / P e p t / s p o t t e c h . h t m l ;  
 w w w . j e r i n i . d e / f r \_ p r o d u c t s . h t m ; w w w . p a t e n t  
 s . i b m . c o n / i b m . h t m l . K a b a t e t a l . S e q u e n c e s  
 o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t 、 U  
 . S . D e p t . H e a l t h ( 1 9 8 3 ) 、 各々は、この参照によりその全体が本明細  
 書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0050】

このようなインポートされた配列は、免疫原性を減少し、結合、親和性、オンレート、  
 オフレート、結合活性、特異性、半減期、または当該分野において公知であるような任意  
 の他の適切な特徴を減少、増強、若しくは修飾するために使用できる。一般的に、非ヒト  
 またはヒトCDR配列の一部またはすべてが維持される一方、可変領域および定常領域の  
 非ヒト配列は、ヒトまたは他のアミノ酸で置き換えられる。抗体はまた、選択的に、抗原  
 および他の好ましい生物学的特性についての高い親和性の保持を伴って、ヒト化できる。  
 この目的を達成するために、ヒト化抗体は、選択的に、親の配列およびヒト化配列の三次  
 元モデルを使用して、親の配列および様々な概念的なヒト化産物の分析のプロセスによっ  
 て調製できる。三次元的な免疫グロブリンモデルは一般的に利用可能であり、当業者によ  
 く知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能な三次元コンホメーション構  
 造を図示および表示する、コンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示の検  
 査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち  
 、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響を与える残基の分析を可能にする  
 。このようにして、FR残基は、標的抗原についての親和性の増加などの望ましい抗体の  
 特徴が達成されるように、コンセンサス配列およびインポート配列から選択および組み合  
 わせできる。一般的に、CDR残基は、直接的にかつ最も実質的に、抗原結合に影響を与  
 えることに関与する。本発明の抗体のヒト化または操作は、これに限定されるものではな  
 いが、例えば、以下に記載されている任意の公知の方法を使用して実施できる：Wint  
 er ( Jones et al . , Nature 321 : 522 ( 1986 ) ; Rie  
 chmann et al . , Nature 332 : 323 ( 1988 ) ; Verho  
 eyen et al . , Science 239 : 1534 ( 1988 ) ) 、 Sims  
 et al . , J . Immunol . 151 : 2296 ( 1993 ) ; Chothia  
 and Lesk、J . Mol . Biol . 196 : 901 ( 1987 ) 、 Carte  
 r et al . , Proc . Natl . Acad . Sci . U . S . A . 89 : 428  
 5 ( 1992 ) ; Presta et al . , J . Immunol . 151 : 2623  
 ( 1993 ) 、米国特許第5 , 723 , 323号明細書、同第5 , 976 , 862号明細  
 書、同第5 , 824 , 514号明細書、同第5 , 817 , 483号明細書、同第5 , 81

4, 476号明細書、同第5, 763, 192号明細書、同第5, 723, 323号明細書、同第5, 766, 886号明細書、同第5, 714, 352号明細書、同第6, 204, 023号明細書、同第6, 180, 370号明細書、同第5, 693, 762号明細書、同第5, 530, 101号明細書、同第5, 585, 089号明細書、同第5, 225, 539号明細書；同第4, 816, 567号明細書、PCT/:US98/16280、US96/18978、US91/09630、US91/05939、US94/01234、GB89/01334、GB91/01134、GB92/01755；国際公開第90/14443号パンフレット、同第90/14424号パンフレット、同第90/14430号パンフレット、欧州特許第229246号明細書、これらの各々は、そこに引用されている参考文献を含めて、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

#### 【0051】

本発明のヒト化抗体のヒト定常領域は、任意のクラス(IgG、IgA、IgM、IgE、IgDなど)またはアイソタイプであり得、カッパまたはラムダ軽鎖を有することができる。1つの実施形態において、ヒト定常領域は、IgG重鎖または規定されたフラグメント、例えば、少なくとも1のアイソタイプ、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4を有する。別の実施形態において、抗ヒトCD22ヒト抗体は、IgG1重鎖およびIgG1 K軽鎖を有する。本発明の単離された抗CD22抗体は、任意の適切なポリヌクレオチドによってコードされた本明細書に開示される抗体アミノ酸配列を同様に有する。好ましくは、抗体または抗原結合フラグメントはヒトCD22を結合し、それによって、タンパク質の少なくとも1の生物学的活性を部分的にまたは実質的に中和する。抗体、またはその特殊化された部分若しくはバリエーションは、少なくとも1のCD22タンパク質またはフラグメントの少なくとも1の生物学的活性を部分的にまたは好ましくは実質的に中和し、それによって、CD22受容体へのCD22の結合を通して、または他のCD22依存性若しくは媒介性メカニズムを通して媒介される活性を阻害する。本明細書で使用される場合、「中和抗体」という用語は、CD22依存性活性を、アッセイに依存して、約20~120%、好ましくは、少なくとも約10、20、30、40、50、55、60、65、70、75、80、85、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100%若しくはそれ以上阻害できる抗体をいう。抗CD22抗体がCD22依存性活性を阻害する能力は、好ましくは、本明細書に記載されるように、および/または当該分野において公知であるように、少なくとも1の適切なCD22タンパク質またはレポーターアッセイによって評価される。

20

30

#### 【0052】

本発明の少なくとも1の抗体は、少なくとも1のCD22タンパク質、サブユニット、フラグメント、部分またはこれらの任意の組み合わせに特異的な少なくとも1の特殊化されたエピトープを結合する。少なくとも1のエピトープは、少なくとも1のタンパク質の部分有する少なくとも1の抗体結合領域を有することができ、このエピトープは、好ましくは、少なくとも1のタンパク質の細胞外部分、可溶性部分、親水性部分、外部部分、または細胞質部分から構成される。一般的に、本発明のヒト抗体または抗原結合フラグメントは、本明細書に記載される抗CD22 Abから誘導された、少なくとも1のヒト相補性決定領域(CDR1、CDR2、およびCDR3)または少なくとも1の重鎖可変領域のバリエーション、および少なくとも1のヒト相補性決定領域(CDR4、CDR5、およびCDR6)または少なくとも1の軽鎖可変領域のバリエーションを有する抗原結合領域を有する。特定の実施形態において、抗体または抗原結合フラグメントは、対応するCDR1、2、および/または3のアミノ酸配列を有する、少なくとも1の重鎖CDR(すなわち、CDR1、CDR2、および/またはCDR3)の少なくとも部分を有する抗原結合領域を有することができる。別の特定の実施形態において、抗体または抗原結合部分またはバリエーションは、対応するCDR4、5、および/または6のアミノ酸配列を有する少なくとも1の軽鎖CDR(すなわち、CDR4、CDR5、および/またはCDR6)の少なくとも部分を有する抗原結合領域を有することができる。好ましい実施形態において、抗

40

50

体または抗原結合フラグメントの3つの重鎖CDRおよび3つの軽鎖CDRは、VM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、またはVM1015の少なくとも1の対応するCDRのアミノ酸配列を有する。このような抗体は、従来の技術を使用して、抗体の様々な部分（例えば、CDR、フレームワーク）と一緒に化学的に連結することによって、組換えDNAの従来の技術を使用して、抗体をコードする（すなわち、1若しくはそれ以上の）核酸分子を調製および発現させることによって、または任意の他の適切な方法を使用することおよび本発明のポリペプチドの発現を生じる可能な縮重コドンのいずれかを使用することによって調製できる。

10

#### 【0053】

軽鎖および重鎖のためのコンビナトリアル可変ドメインヒト化ライブラリーの液相合成が利用できる。ヒト化軽鎖（LC）可変ドメインライブラリーのアセンブリーは、例えば、ヒト軽鎖フレームワーク（FW）および非ヒト相補性決定領域（CDR）を含有している。このライブラリーは、例えば、FWおよびCDR DNAフラグメントの段階的液相ライゲーションを使用することによってアセンブルされる。これらのライブラリーは、当業者に公知である技術によって、FW1 - CDR1 - FW2 - CDR2 - FW3 - CDR3の順番で、FWおよびCDR DNAフラグメントの段階的液相ライゲーションを使用することによってアセンブルされる。例えば、以下の参考文献の1若しくはそれ以上の技術によってであり、この参照によりそれらの各々が本明細書に組み込まれる。Lo, B. K., 2003, Antibody humanization by CDR grafting. Antibody Engineering, Methods and protocols. Edit by Benny K. C. Lo, Methods in Molecular Biology, 248, 135 - 159; Kashmiri et al., 2003, Developing a minimally immunogenic humanized antibody by CDR grafting. Antibody Engineering, Methods and protocols. Edit by Benny K. C. Lo, Methods in Molecular Biology, 248, 361 - 376; Bassette, P. H., et al., 2003, Construction of Designed Protein Libraries Using Gene Assembly Mutagenesis. Directed Evolution Library Creation, Methods and protocols. Edit. Arnold and Georgiou, Methods in Molecular Biology, 231, 29 - 37; Chames, P., et al., 2001, Selections on Biotinylated antigens. Antibody Engineering, Edit by R. Kontermann and S. Dubel, Springer Lab Manual, 149 - 166; O'Brien S., and Jones, T., 2001, Humanising antibodies by CDR grafting. Antibody Engineering, Edit by R. Kontermann and S. Dubel, Springer Lab Manual, 567 - 590.

20

30

40

ヒトCD22に結合しかつ規定された重鎖または軽鎖可変領域若しくはCDR領域を有する抗体は、当該分野において公知であるように、および/または本明細書に記載されるように、ファージディスプレイ（Katsube, Y., et al., Int J. Mol. Med, 1(5): 863 - 868 (1998)）またはトランスジェニック動物を利用する方法などの適切な方法を使用して調製できる。例えば、抗体、特殊化された部分若しくはバリエーションは、適切な宿主細胞中でのコード核酸またはその部分を使用して発現できる。

#### 【0054】

50

言及されるように、本発明はまた、本明細書に記載されるアミノ酸配列と実質的に同じである配列のアミノ酸を有する、抗体、抗原結合フラグメント、免疫グロブリン鎖、およびCDRに関連する。このような抗CD22抗体は、本明細書に特定されるように、天然の変異またはヒトの操作からのいずれかである、1若しくはそれ以上のアミノ酸の置換、欠失、または付加を含むことができる。好ましくは、このような抗体または抗原結合フラグメントおよびこのような鎖またはCDRを有する抗体は、高い親和性（例えば、約 $10^{-9}$  M若しくはそれ以下の $K_D$ ）でヒトCD22を結合できる。本明細書に記載される配列と実質的に同じであるアミノ酸配列には、保存性アミノ酸置換、ならびにアミノ酸欠失および/または挿入を有する配列が含まれる。保存性アミノ酸置換とは、第1のアミノ酸の化学的および/または物理的特性（例えば、電荷、構造、極性、疎水性/親水性）に類似している化学的および/または物理的特性を有する第2のアミノ酸による、第1のアミノ酸の置き換えをいう。保存性置換には、以下のグループ内での1のアミノ酸の別のアミノ酸への置き換えが含まれる：リジン（K）、アルギニン（R）およびヒスチジン（H）；アスパラギン酸（D）およびグルタミン酸（E）；アスパラギン（N）、グルタミン（Q）、セリン（S）、スレオニン（T）、チロシン（Y）、K、R、H、D、およびE；アラニン（A）、バリン（V）、ロイシン（L）、イソロイシン（I）、プロリン（P）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、メチオニン（M）、システイン（C）およびグリシン（G）；F、W、およびY；C、S、およびT。

10

**【0055】**

当然、当業者が作成するアミノ酸置換の数は、上記のものを含む多くの要因に依存する。一般的に言えば、任意の所定の抗CD22抗体、フラグメント若しくはバリエーションについてのアミノ酸置換、挿入、または欠失の数は、本明細書に特定されるように、40、30、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1を超えない、例えば、1～30またはこの中の任意の範囲または値である。

20

**【0056】**

機能のために必須である本発明の抗CD22抗体におけるアミノ酸は、部位特異的変異誘発またはアラニンスキャニング変異誘発などの当該分野において公知の方法によって同定できる（例えば、Ausubel、前出、*Chapters 8, 15; Cunningham and Wells, Science 244: 1081-1085 (1989)*）。後者の手順は、分子中のすべての残基において単一のアラニン変異を導入する。次いで、得られる変異型分子は、これに限定されるものではないが、少なくとも1のCD22中和活性などの生物学的活性について試験される。抗体結合のために決定的に重要である部位もまた、結晶化、核磁気共鳴、または光親和性標識などの構造分析によって同定できる（*Smith, et al., J. Mol. Biol. 224: 899-904 (1992)*）および*de Vos, et al., Science 255: 306-312 (1992)*）。

30

**【0057】**

本発明の抗CD22抗体は、これに限定されるものではないが、配列ID番号：17～32および49～64から誘導されたCDRの少なくとも1の連続するアミノ酸の5～すべてから選択される、少なくとも1の部分、配列、または組み合わせを含むことができる。

40

**【0058】**

抗CD22抗体は、配列ID番号：17～32および49～64の少なくとも1から誘導されたCDRの連続するアミノ酸の70～100%の少なくとも1のポリペプチドをさらに選択的に有することができる。1つの特定の態様において、抗CD22抗体は、配列ID番号1～16に対して95～99%配列相同性のポリペプチドを有する。別の特定の態様において、抗CD22抗体は、配列ID番号33～48に対して95～99%配列相同性のポリペプチドを有する。

**【0059】**

50

1つの実施形態において、免疫グロブリン鎖またはその部分（例えば、可変領域、C D R）のアミノ酸配列は、配列ID番号：17～32または49～64の少なくとも1のアミノ酸配列に対して、約70～100%同一性（例えば、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100またはこれらの中の任意の範囲または値）を有する。好ましくは、70～100%アミノ酸同一性（すなわち、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100またはこれらの中の任意の範囲または値）は、当該分野において公知であるように、適切なコンピュータアルゴリズムを使用して決定される。1つの特定の態様において、抗CD22抗体は、配列ID番号17～32または49～64に対して95～99%配列相

10

#### 【0060】

例示的な重鎖および軽鎖可変領域配列は、配列ID番号：1～64において提供される。本発明の抗体、または特殊化されたそのバリエーションは、本発明の抗体からの任意の数の連続したアミノ酸残基を有することができ、ここで、この数は、抗CD22抗体における連続する残基の数の10～100%から成る整数の群から選択される。選択的に、この連続するアミノ酸のサブ配列は、少なくとも約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250若しくはそれ以上のアミノ酸長、またはこれらの中の任意の範囲または値である。さらに、このようなサブ配列

20

#### 【0061】

当業者が認識するように、本発明は、本発明の少なくとも1の生物学的に活性な抗体を含む。生物学的に活性な抗体は、ネイティブ（非合成）、内因性、または関連および公知の抗体の活性の少なくとも20%、30%、または40%、好ましくは、少なくとも50%、60%、または70%、最も好ましくは、少なくとも80%、90%、または95%～100%である特異的活性を有する。酵素活性および基質特異性の尺度をアッセイおよび定量する方法は当業者に周知である。

#### 【0062】

別の態様において、本発明は、有機部分の共有結合によって修飾されている、本明細書に記載されるような、ヒト抗体および抗原結合フラグメントに関連する。このような修飾は、薬物動態学特性が改善された（例えば、インビボ血清半減期が増加している）抗体または抗原結合フラグメントを産生できる。この有機部分は、直鎖状または分枝状の親水性ポリマー基、脂肪酸基、または脂肪酸エステル基であり得る。特定の実施形態において、親水性ポリマー基は、約800～約120,000ダルトンの分子量を有することができ、ポリアルカングリコール（例えば、ポリエチレングリコール（PEG）、ポリプロピレングリコール（PPG））、炭水化物ポリマー、アミノ酸ポリマー、またはポリビニルピロリドンであり得、そして脂肪酸または脂肪酸エステル基は、約8個～約40個の炭素原子を有することができる。

30

40

#### 【0063】

本発明の修飾された抗体および抗原結合フラグメントは、直接的にまたは間接的に、共有結合されている、1若しくはそれ以上の有機部分を有することができる。本発明の抗体または抗原結合フラグメントに結合されている各有機部分は、独立して、親水性ポリマー基、脂肪酸基、または脂肪酸エステル基であり得る。本明細書で 사용되는場合、「脂肪酸」という用語は、モノカルボン酸およびジカルボン酸を包含する。本明細書で 사용되는用語としての「親水性ポリマー基」は、オクタンよりも水に溶解性である有機ポリマーをいう。例えば、ポリリジンは、オクタンよりも水に溶解性である。従って、ポリリジンの共有結合によって修飾された抗体は、本発明に包含される。本発明の抗体を修飾するために適切な親水性ポリマーは、直鎖状または分枝状であり得、これには、例えば、ポリア

50

ルカングリコール（例えば、PEG、モノメトキシ-ポリエチレングリコール（mPEG）、PPGなど）、炭水化物（例えば、デキストラン、セルロース、オリゴサッカリド、ポリサッカリドなど）、親水性アミノ酸のポリマー（例えば、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリアスパラギン酸など）、ポリアルカンオキサイド（例えば、ポリエチレンオキサイド、ポリプロピレンオキサイドなど）およびポリビニルピロリドンが含まれる。好ましくは、本発明の抗体を修飾する親水性ポリマーは、別々の分子実体として、約800～約150,000ダルトンの分子量を有する。例えば、下付文字がダルトンで表されたポリマーの平均分子量である、PEG<sub>5000</sub>およびPEG<sub>20,000</sub>が使用できる。親水性ポリマー基は、1～約6のアルキル、脂肪酸、または脂肪酸エステル基で置換できる。脂肪酸または脂肪酸エステル基で置換されている親水性ポリマーは、適切な方法を利用することによって調製できる。例えば、アミン基を有するポリマーは、脂肪酸または脂肪酸エステルのカルボン酸にカップリングでき、脂肪酸または脂肪酸エステル上の活性化カルボン酸（例えば、N,N-カルボニルジイミダゾールで活性化される）はポリマー上のヒドロキシル基にカップリングできる。

#### 【0064】

本発明の抗体を修飾するために適切な脂肪酸および脂肪酸エステルは飽和されることができ、または1若しくはそれ以上の不飽和の単位を含有することができる。本発明の抗体を修飾するために適切である脂肪酸には、例えば、n-ドデカノエート（C<sub>12</sub>、ラウレート）、n-テトラデカノエート（C<sub>14</sub>、ミリストート）、n-オクタデカノエート（C<sub>18</sub>、ステアレート）、n-エイコサノエート（C<sub>20</sub>、アラキデート）、n-ドコサノエート（C<sub>22</sub>、ベヘネート）、n-トリアコンタノエート（C<sub>30</sub>）、n-テトラコンタノエート（C<sub>40</sub>）、シス-9-オクタデカノエート（C<sub>18</sub>、オレエート）、すべてのシス-5,8,11,14-エイコサテトラエノエート（C<sub>20</sub>、アラキドネート）、オクタン二酸、テトラデカン二酸、オクタデカン二酸、ドコサエン二酸などが含まれる。適切な脂肪酸エステルには、直鎖または分枝鎖低級アルキル基を有するジカルボン酸のモノエステルが含まれる。低級アルキル基には、1～約12、好ましくは1～約6の炭素原子を有することができる。

#### 【0065】

修飾されたヒト抗体および抗原結合フラグメントは、例えば、1若しくはそれ以上の修飾剤を用いる反応によって、適切な方法を使用して調製できる。本明細書で使用される場合の「修飾剤」は、活性化基を有する適切な有機基（例えば、親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）をいう。「活性化基」は、適切な条件下で第2の化学基と反応でき、それによって修飾剤と第2の化学基の間で共有結合を形成する、化学部分または官能基である。例えば、アミン反応性活性化基には、トシレート、メシレート、ハロ（クロロ、ブロモ、フルオロ、ヨード）、N-ヒドロキシスクシンイミジルエステル（NHS）など求電子基が含まれる。チオールと反応できる活性化基には、例えば、マレイミド、ヨードアセチル、アクリロイル（acryloyl）、ピリジルジスルフィド、5-チオール-2-ニトロ安息香酸チオール（TNB-チオール）などが含まれる。アルデヒド官能基は、アミンまたはヒドラジン含有分子にカップリングでき、アジド基は、三価リン基と反応でき、ホスホルアミダートまたはホスホルイミド連結を形成する。活性化基を分子に導入するための適切な方法は当該分野で公知である（例えば、Hernanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)を参照のこと）。活性化基は、有機基（例えば、親水性ポリマー、脂肪酸、脂肪酸エステル）に直接結合でき、またはリンカー部分、例えば、二価C<sub>1</sub>-C<sub>12</sub>基を通して結合でき、ここで、1若しくはそれ以上の炭素原子は、酸素、窒素、または硫黄などのヘテロ原子によって置き換えることができる。適切なリンカー部分には、例えば、テトラエチレングリコール、-（CH<sub>2</sub>）<sub>3</sub>-, -NH-（CH<sub>2</sub>）<sub>6</sub>-NH-, -（CH<sub>2</sub>）<sub>2</sub>-NH-, および-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>-NH-が含まれる。リンカー部分を有する修飾剤は、例えば、1-エチル-3-（3-ジメチルア

10

20

30

40

50

ミノプロピル)カルボジイミド(EDC)の存在下で、モノ-Boc-アルキルジアミン(例えば、モノ-Boc-エチレンジアミン、モノ-Boc-ジアミンヘキサン)を脂肪酸と反応させて、遊離のアミンと脂肪酸カルボキシレートの間のアミド結合を形成することによって、産生できる。Boc保護基は、記載されるように、別のカルボキシレートにカップリングできる一級アミンを露出させるために、トリフルオロ酢酸(TFA)を用いる処理によって生成物から除去でき、または、無水マレイン酸と反応でき、得られる生成物は環化して脂肪酸の活性化マレイミド誘導体を生成できる(例えば、Thompson, et al., 国際公開第92/16221号パンフレットを参照のこと、この全体の教示は、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

#### 【0066】

本発明の修飾抗体は、ヒト抗体または抗原結合フラグメントを修飾剤と反応させることによって産生できる。例えば、有機部分が、アミン反応性修飾剤、例えば、PEGのNHSEステルを利用することによって、非部位特異的な様式で抗体に結合できる。修飾ヒト抗体または抗原結合フラグメントはまた、抗体または抗原結合フラグメントのジスルフィド結合(例えば、鎖間ジスルフィド結合)を還元することによって調製できる。次いで、還元された抗体または抗原結合フラグメントは、チオール反応性修飾剤と反応でき、本発明の修飾抗体を産生する。本発明の抗体の特異的部位に結合する有機部分を有する修飾ヒト抗体および抗原結合フラグメントは、適切な方法、例えば、リバースプロテオリシス(Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992); Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994); Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1):59-68 (1996); Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997))およびHermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, Calif. (1996)に記載されている方法を使用して調製できる。

#### 【0067】

本発明の抗体は、広い範囲の親和性( $K_D$ )でヒトCD22を結合することができる。好ましい実施形態において、本発明の少なくとも1のヒトmAbは、選択的に、高い親和性でヒトCD22を結合することができる。例えば、mAbは、約 $10^{-7}$ M以下の $K_D$ 、例えば、これに限定されるものではないが、 $0.1 \sim 9.9$ (またはその中の任意の範囲または値) $\times 10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$ 、 $10^{-12}$ 、 $10^{-13}$ またはその中の任意の範囲または値でヒトCD22を結合できる。

#### 【0068】

抗原についての抗体の親和性または結合活性は、任意の適切な方法を使用して実験的に決定できる。(例えば、Berzofsky, et al., 「Antibody - Antigen Interactions」, In Fundamental Immunology, Paul, W.E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W.H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); およびそこに記載されている方法を参照のこと)。特定の抗体-抗原相互作用の測定された親和性は、異なる条件下で(例えば、塩濃度、pH)測定されるならば、変動し得る。従って、親和性および他の抗原-結合パラメーター(例えば、 $K_D$ 、 $K_a$ 、 $K_d$ )の測定は、好ましくは、抗体および抗原の標準化された溶液、および、本明細書に記載される緩衝液などの標準化された緩衝液を用いて行われる。

#### 【0069】

本発明の方法および組成物において有用な抗CD22抗体は、CD22への高親和性結合および選択的におよび好ましくは低毒性を有することによって特徴付けられる。特に、可変領域、定常領域、およびフレームワークなどの個々の成分が、個別におよび/または

10

20

30

40

50



集合的に、選択的および好ましくは低い免疫原性を保有している、本発明の抗体、特殊化されたフラグメントまたはバリエーションは、本発明において有用である。本発明において使用できる抗体は、徴候の測定可能な緩和、ならびに低いおよび/または受容可能な毒性を伴って長期間の間、患者を治療するそれらの能力によって、選択的に特徴付けられる。低いまたは受容可能な免疫原性および/または高親和性、ならびに他の適切な特性は、達成される治療結果に寄与できる。「低免疫原性」は、治療された患者の約75%未満、または好ましくはその約50%未満で有意なH A H A、H A C AまたはH A M A応答を惹起すること、および/または治療された患者において低力価を惹起すること(二重抗原酵素イムノアッセイを用いて測定される約300未満、好ましくは約100未満)として、本明細書に定義される(Elliott et al., Lancet 344: 1125 - 1127 (1994)、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

#### 【0070】

少なくとも2の異なる抗原についての結合特異性を有するモノクローナル、ヒト化抗体である、二重特異性、ヘテロ特異性、ヘテロ結合体、または同様の抗体もまた使用できる。今回の場合では、結合特異性の1つが少なくとも1のCD22タンパク質用であり、他の1つが任意の他の抗原用である。二重特異性抗体を作製するための方法は当該分野において知られている。伝統的に、二重特異性抗体の組換え産生は、2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づいており、ここで、2つの重鎖は異なる特異性を有する(Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983))。免疫グロブリン重鎖および軽鎖のランダムな仕分けのために、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は10の異なる抗体分子の潜在的な混合物を生じ、これらのうちの1つのみが正しい二重特異性構造を有する。アフィニティークロマトグラフィー工程によって通常行われる正しい分子の精製はむしろ厄介であり、生成物収率は低い。同様の手順は、例えば、国際公開第93/08829号パンフレット、米国特許第6,210,668号明細書、同第6,193,967号明細書、同第6,132,992号明細書、同第6,106,833号明細書、同第6,060,285号明細書、同第6,037,453号明細書、同第6,010,902号明細書、同第5,989,530号明細書、同第5,959,084号明細書、同第5,959,083号明細書、同第5,932,448号明細書、同第5,833,985号明細書、同第5,821,333号明細書、同第5,807,706号明細書、同第5,643,759号明細書、同第5,601,819号明細書、同第5,582,996号明細書、同第5,496,549号明細書、同第4,676,980号明細書、国際公開第91/00360号パンフレット、同第92/00373号パンフレット、欧州特許第03089号明細書、Traunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991)、Suresh et al. Methods in Enzymology 121: 210 (1986)に開示されており、各々は、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0071】

##### 核酸分子

配列ID番号: 17~32または49~64、これらのバリエーション、若しくはコンセンサス配列の少なくとも1の連続するアミノ酸の少なくとも70~100%をコードするヌクレオチド配列、またはこれらの配列の少なくとも1を有する寄託ベクターなどの本明細書に提供される情報を使用して、少なくとも1の抗CD22抗体をコードする本発明の核酸分子が、本明細書に記載される方法を使用して、または当該分野において公知であるように、得ることができる。

#### 【0072】

本発明の核酸分子は、これに限定されるものではないが、クローニングによって得られ、または合成的に産生されたcDNAおよびゲノムDNA、またはこれらの任意の組み合わせを含む、mRNA、hnRNA、tRNAまたは他の任意の型などのRNAの型、またはDNAの型であり得る。DNAは、三本鎖、二本鎖、または一本鎖、またはこれらの任意の組み合わせであり得る。DNAまたはRNAの少なくとも1の鎖の任意の部分が、

センス鎖としてもまた知られるコード鎖であり得、またはこれは、アンチセンス鎖としてもまた知られる非コード鎖であり得る。

【0073】

本発明の単離された核酸分子は、1若しくはそれ以上のイントロンを選択的に伴うオープンリーディングフレーム(ORF)を有する核酸分子、これに限定されるものではないが、例えば、少なくとも1の重鎖(例えば、配列ID番号: 33~48)または軽鎖(例えば、配列ID番号: 1~16)のCDR1、CDR2および/またはCDR3としての少なくとも1のCDRの少なくとも1の特殊化された部分; 抗CD22抗体または可変領域についてのコード配列を有する核酸分子; ならびに、上記のものとは実質的に異なるヌクレオチドを有するが、しかし、これは、本明細書に記載されるようにおよび/または当該分野において公知であるように、遺伝コードの縮重に起因して、少なくとも1の抗CD22抗体をなおコードしている核酸配列、を含むことができる。当然、遺伝コードは当該分野において周知である。従って、本発明の特異的抗CD22抗体をコードするような縮重核酸バリエーションを生成することは当業者にとっては日常的である。例えば、Ausubel, et al.、前出を参照のこと、そしてこのような核酸バリエーションは本発明に含まれる。本発明の単離された核酸分子の非限定的な例には配列ID番号: 1~16および33~48が含まれ; HC CDR1、HC CDR2、HC CDR3、LC CDR1、LC CDR2、LC CDR3、HC可変領域、およびLC可変領域をそれぞれコードする核酸の非限定的な例に対応する。

10

【0074】

本明細書に示されるように、抗CD22抗体をコードする核酸を有する本発明の核酸分子は、これに限定されるものではないが以下を含むことができる: それ自体、抗体フラグメントのアミノ酸配列をコードするもの、全体の抗体またはその一部のコード配列、抗体、フラグメント、または部分のコード配列、ならびに、少なくとも1のイントロンなどの上述のさらなるコード配列を伴うかまたは伴わない、少なくとも1のシグナルリーダーまたは融合ペプチドのコード配列などのさらなる配列、これらは、これに限定されるものではないが以下を含むさらなる非コード配列を伴う: 転写、スプライシングを含むmRNAプロセッシング、およびポリアデニル化シグナル(例えば、リボソーム結合およびmRNAの安定性)において役割を果たす、転写され翻訳されない配列などの非コード5'および3'配列; さらなる機能を提供するものなどのさらなるアミノ酸をコードするさらなるコード配列。従って、抗体をコードする配列は、抗体フラグメントまたは部分を有する融合抗体の精製を容易にするペプチドをコードする配列などのマーカー配列に融合できる。

20

30

【0075】

本明細書に記載されるようなポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズするポリヌクレオチド

本発明は、選択的ハイブリダイゼーション条件下で、本明細書に開示されているポリヌクレオチドにハイブリダイズする単離された核酸分子を提供する。従って、この実施形態のポリヌクレオチドは、このようなポリヌクレオチドを有する核酸を単離、検出、および/または定量するために使用できる。例えば、本発明のポリヌクレオチドは、寄託ライブラリーにおける部分または全長クローンを同定、単離、または増幅するために使用できる。ある実施形態において、ポリヌクレオチドは、ヒトまたは哺乳動物核酸ライブラリーから単離されたか、またはさもなくばそこからのcDNAに相補性である、ゲノム配列またはcDNA配列である。

40

【0076】

好ましくは、cDNAライブラリーは、少なくとも80%全長配列、好ましくは、少なくとも85%または90%全長配列、およびより好ましくは、少なくとも95%全長配列を有する。cDNAライブラリーは、めったにない配列の表示を増加させるように標準化できる。低または中程度のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件は、典型的であるが、しかし、排他的ではなく、相補的配列と比較して配列同一性が減少している配列とともに利用される。中程度および高ストリンジェンシー条件は、より高い同一性の配

50

列のために選択的に利用できる。低ストリンジェンシー条件は、約 70 % 配列同一性を有する配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、オーソロガス配列またはパラロガス配列を同定するために利用できる。

#### 【0077】

選択的に、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載されるポリヌクレオチドによってコードされる抗体の少なくとも一部をコードする。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードしているポリヌクレオチドに対する選択的ハイブリダイゼーションのために利用できる核酸配列を包含する。例えば、各々がこの参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、A u s u b e l、前出；C o l l i g a n、前出を参照のこと。

#### 【0078】

##### 核酸の構築

本発明の単離された核酸は、当該分野において周知であるように、(a) 組換え方法、(b) 合成技術、(c) 精製技術、またはこれらの組み合わせを使用して作製できる。

#### 【0079】

これらの核酸は、本発明のポリヌクレオチドに加えて、配列を便利に有することができる。例えば、1 若しくはそれ以上のエンドヌクレアーゼ制限部位を有するマルチクローニングサイトが核酸に挿入し、ポリヌクレオチドの単離に役立つことができる。また、翻訳可能な配列を挿入し、本発明の翻訳されたポリヌクレオチドの単離に役立つことができる。例えば、ヘキサヒスチジンマーカ配列は、本発明のタンパク質を精製するための便利な手段を提供する。本発明の核酸(コード配列を除く)は、選択的に、本発明のポリヌクレオチドのクローニングおよび/または発現のためのベクター、アダプター、またはリンカーである。

#### 【0080】

さらなる配列は、クローニングおよび/若しくは発現におけるそれらの機能を最適化するため、ポリヌクレオチドの単離に役立つため、または細胞へのポリヌクレオチドの導入を改善するために、このようなクローニングおよび/若しくは発現配列に加えることができる。クローニングベクター、発現ベクター、アダプターおよびリンカーの使用は、当該分野で周知である。(例えば、A u s u b e l、前出；またはS a m b r o o k、前出を参照のこと)。

#### 【0081】

##### 核酸を構築するための組換え方法

R N A、c D N A、ゲノム D N A、またはこれらの任意の組み合わせなどの本発明の単離された核酸組成物は、当業者に公知である任意の数のクローニング方法論を使用して、生物学的供給源から得ることができる。ある実施形態において、ストリンジェントな条件下で本発明のポリヌクレオチドに選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプローブが使用されて、c D N Aまたはゲノム D N Aライブラリー中の所望の配列を同定する。R N Aの単離、ならびにc D N Aおよびゲノムライブラリーの構築は当業者には周知である。(例えば、A u s u b e l、前出；またはS a m b r o o k、前出を参照のこと)。

#### 【0082】

##### 核酸スクリーニングおよび単離の方法

c D N Aまたはゲノムライブラリーは、本発明のポリヌクレオチドの配列、例えば、本明細書に開示されているものに基づくプローブを使用してスクリーニングできる。プローブは、ゲノム D N Aまたはc D N A配列とハイブリダイズし、同じまたは異なる生物における相同遺伝子を単離するために使用できる。当業者は、様々な程度のハイブリダイゼーションのストリンジェンシーがアッセイにおいて利用できることを認識しており；ハイブリダイゼーションまたは洗浄媒体がストリンジェントであり得る。ハイブリダイゼーションのための条件がよりストリンジェントになるに従って、二重鎖形成が起こるためのプローブと標的の間のより高い程度の相補性が存在するに違いない。ストリンジェンシーの程度は、温度、イオン強度、p H、およびホルムアミドなどの部分変性剤の存在の1 若しくはそれ以上によって制御できる。例えば、ハイブリダイゼーションのストリンジェンシー

10

20

30

40

50

は、例えば、0%～50%の範囲内でのホルムアミドの濃度の操作を通して、反応溶液の極性を変化させることによって便利に変動される。検出可能な結合のために要求される相補性（配列同一性）の程度は、ハイブリダイゼーション媒体および/または洗浄媒体のストリンジェンシーに従って変動する。相補性の程度は、最適には、100%、または70～100%、またはその中の任意の範囲または値である。しかし、プローブおよびプライマー中の少ない配列のバリエーションは、ハイブリダイゼーションおよび/または洗浄媒体のストリンジェンシーを減少させることによって補うことができることが理解されるべきである。

#### 【0083】

RNAまたはDNAの増幅の方法は当該分野において周知であり、本明細書に提示される教示およびガイダンスに基づいて、過度の実験を伴うことなく、本発明に従って使用することができる。

10

#### 【0084】

DNAまたはRNA増幅の公知の方法は、これに限定されるものではないが、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）および関連する増幅プロセス（例えば、Mullis, et al. への米国特許第4,683,195号明細書、同第4,683,202号明細書、同第4,800,159号明細書、同第4,965,188号明細書；Tabor, et al. への米国特許第4,795,699号明細書および同第4,921,794号明細書；Innisへの米国特許第5,142,033号明細書；Wilson, et al. への米国特許第5,122,464号明細書；Innisへの米国特許第5,091,310号明細書；Gyllenstein, et al. への米国特許第5,066,584号明細書；Gelfand, et al. への米国特許第4,889,818号明細書；Silver, et al. への米国特許第4,994,370号明細書；Biswasへの米国特許第4,766,067号明細書；Ringoldへの米国特許第4,656,134号明細書を参照のこと）、および二本鎖DNA合成のための鋳型として標的配列に対するアンチセンスRNAを使用するRNA媒介増幅（Malek, et al. への米国特許第5,130,238号明細書、商品名NASBA）を含み、これらの全体の内容は、この参照により本明細書に組み込まれる（例えば、Ausubel、前出；またはSambrook、前出を参照のこと）。

20

#### 【0085】

例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）技術は、ゲノムDNAまたはcDNAライブラリーから直接的に本発明のポリヌクレオチドまたは関連遺伝子の配列を増幅するために使用できる。PCRおよび他のインビトロ増幅方法もまた、例えば、発現されるタンパク質をコードする核酸配列をクローニングするため、サンプル中の所望のmRNAの存在を検出するため、核酸配列決定のため、または他の目的のためのプローブとして使用するための核酸を作製するために有用であり得る。インビトロ増幅方法を通して当業者を方向付けるために十分な技術の例は、Berger、前出、Sambrook、前出、およびAusubel、前出、ならびにMullis, et al., 米国特許第4,683,202号明細書（1987）；およびInnis, et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, E. Academic Press Inc., San Diego, Calif. (1990)において見い出すことができる。ゲノムPCR増幅のための市販のキットは、当該分野において公知である。例えば、Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech)を参照のこと。加えて、T4遺伝子32タンパク質（Boehringer Mannheim）は、長いPCR産物の収率を改善するために使用することができる。

30

40

#### 【0086】

核酸を構築するための合成方法

単離された本発明の核酸はまた、公知の方法によって直接化学合成によって調製できる（例えば、Ausubel, et al., 前出を参照のこと）。化学合成は、一般的に

50

、一本鎖オリゴヌクレオチドを産生し、これは、相補性配列とのハイブリダイゼーションによって、または鋳型として一本鎖を使用するDNAポリメラーゼを用いる重合によって、二本鎖DNAに転換できる。当業者は、DNAの化学合成が約100若しくはそれ以上の塩基の配列に制限できないが、より長い配列は、より短い配列のライゲーションによって得ることができることを認識している。

#### 【0087】

##### 組換え発現カセット

本発明はさらに、本発明の核酸を有する組換え発現カセットを提供する。本発明の核酸配列、例えば、本発明の抗体をコードしているcDNAまたはゲノム配列は、少なくとも1の所望の宿主細胞に導入できる組換え発現カセットを構築するために使用できる。組換え発現カセットは、典型的には、意図される宿主細胞の中でポリヌクレオチドの転写を方向付ける転写開始制御配列に作動可能に連結されている本発明のポリペプチドを有する。異種プロモーターと非異種（内在性）プロモーターの両方が、本発明の核酸の発現を指向するために利用できる。

10

#### 【0088】

ある実施形態において、プロモーター、エンハンサー、または他のエレメントとして役立つ単離された核酸は、本発明のポリヌクレオチドの発現をアップレギュレーションまたはダウンレギュレーションするために、本発明のポリヌクレオチドの非相同型の適切な位置（上流、下流、またはイントロン中）に導入できる。例えば、内在性プロモーターは、変異、欠失、および/または置換によって、インビボまたはインビトロで変更できる。

20

#### 【0089】

##### ベクターおよび宿主細胞

本発明はまた、本発明の単離された核酸分子を含むベクター、組換えベクターで遺伝子操作されている宿主細胞、および、当該分野において周知であるような、組換え技術による少なくとも1の抗CD22抗体の産生にも関連する。例えば、Sambrook, et al., 前出; Ausubel, et al., 前出を参照のこと、この参照により各々が完全に本明細書に組み込まれる。

#### 【0090】

ポリヌクレオチドは、選択的に、宿主中での伝播のための選択マーカ含有するベクターに結合できる。一般的に、プラスミドベクターが、リン酸カルシウム沈殿などの沈殿物中に、または電荷を有する脂質との複合体中に導入される。ベクターがウイルスであるならば、これは適切なパッケージング細胞システムを使用してインビトロでパッケージングでき、次いで、宿主細胞に導入できる。

30

#### 【0091】

DNA挿入物は、適切なプロモーターに作動可能に連結されるべきである。発現構築物は、さらに、転写の開始、終結のための部位、および、転写領域中に、翻訳のためのリボソーム結合部位を含有する。構築物によって発現される成熟転写物のコード部分は、好ましくは、翻訳されるmRNAの最初に翻訳開始コドンを含み、そして翻訳されるmRNAの最後に適切に位置する終止コドン（例えば、UAA、UGAまたはUAG）を含み、哺乳動物または真核生物発現のためにはUAAおよびUAGが好ましい。

40

#### 【0092】

発現ベクターは、好ましくは、しかし選択的に、少なくとも1の選択マーカを含む。このようなマーカは、これに限定されるものではないが、例えば、真核生物細胞培養のための、メトトレキサート（MTX）、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR、米国特許第4,399,216号明細書；同第4,634,665号明細書；同第4,656,134号明細書；同第4,956,288号明細書；同第5,149,636号明細書；同第5,179,017号明細書、アンピシリン、ネオマイシン（G418）、ミコフェノール酸、またはグルタミンシンターゼ（GS、米国特許第5,122,464号明細書；同第5,770,359号明細書；同第5,827,739号明細書）耐性、ならびにE. coli および他の細菌または原核生物の培養のためのテトラサイクリンまたはアンピシ

50

リン耐性遺伝子を含む（上記の特許はこの参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。上記に記載された宿主細胞のための適切な培養培地および条件は当該分野において公知である。適切なベクターは、当業者に容易に明らかである。ベクター構築物の宿主細胞への導入は、リン酸カルシウムトランスフェクション、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、カチオン性脂質媒介トランスフェクション、エレクトロポレーション、形質導入、感染、または他の公知の方法によってもたすことができる。このような方法は、当該分野において、例えば、Sambrook、前出、1～4章および16～18章；Ausubel、前出、1章、9章、13章、15章、16章に記載されている。

#### 【0093】

本発明の少なくとも1の抗体は、融合タンパク質などの修飾型で発現でき、分泌シグナルを含むことができるのみならず、さらなる異種機能領域もまた含むことができる。例えば、さらなるアミノ酸、特に、電荷を有するアミノ酸の領域が、抗体のN末端に加えられて、精製の間、またはそれに続く取り扱いおよび保存の間の、宿主細胞の安定性および持続性を改善できる。また、ペプチド部分が本発明の抗体に加えられて、精製を容易にすることができる。このような領域は、抗体またはその少なくとも1のフラグメントの最終調製の前に除去できる。このような方法は、多くの標準的な実験室マニュアル、例えば、Sambrook、前出、17.29章～17.42章および18.1章～18.74章；Ausubel、前出、16章、17章、および18章に記載されている。

#### 【0094】

当業者は、本発明のタンパク質をコードする核酸の発現のために利用可能な多数の発現系における知識を持っている。

#### 【0095】

あるいは、本発明の核酸は、本発明の抗体をコードする内在性DNAを含有する宿主細胞中で（操作によって）スイッチを入れることによって、宿主細胞中で発現させることができる。このような方法は当該分野において周知であり、例えば、米国特許第5,580,734号明細書、同第5,641,670号明細書、同第5,733,746号明細書、および同第5,733,761号明細書に記載されており、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0096】

抗体、その特殊化された部分またはパリアントの産生のために有用な細胞培養の例は哺乳動物細胞である。哺乳動物細胞系は、しばしば、単層の細胞の型であるが、哺乳動物細胞懸濁物またはバイオリアクターもまた使用できる。インタクトなグリコシル化タンパク質を発現することが可能である多数の適切な宿主細胞系統が当該分野において開発されており、これには、COS-1（例えば、ATCC CRL 1650）、COS-7（例えば、ATCC CRL-1651）、HEK293、BHK21（例えば、ATCC CRL-10）、CHO（例えば、ATCC CRL 1610）およびBSC-1（例えば、ATCC CRL-26）細胞系統、Cos-7細胞、CHO細胞、hep G2細胞、P3X63Ag8.653、SP2/0-Ag14、293細胞、HeLa細胞など

が含まれ、これらは、例えば、American Type Culture Collection、Manassas, Va. (www.atcc.org) から容易に入手可能である。好ましい宿主細胞には、骨髄腫およびリンパ腫細胞などのリンパ起源の細胞が含まれる。特に好ましい宿主細胞はP3X63Ag8.653細胞（ATCC Accession Number CRL-1580）およびSP2/0-Ag14細胞（ATCC Accession Number CRL-1851）である。特に好ましい実施形態において、組換え細胞はP3X63Ab8.653またはSP2/0-Ag14細胞である。

#### 【0097】

これらの細胞の発現ベクターは、以下の発現制御配列の1若しくはそれ以上、これに限定されるものではないが、複製起点；プロモーター（例えば、後期または初期SV40プ

10

20

30

40

50

ロモーター、CMVプロモーター（米国特許第5,168,062号明細書；同第5,385,839号明細書）、HSV tkプロモーター、pgk（ホスホグリセレートキナーゼ）プロモーター、EF-1アルファプロモーター（米国特許第5,266,491号明細書）、少なくとも1のヒト免疫グロブリンプロモーター）；エンハンサー、および／またはプロセッシング情報部位、例えば、リボソーム結合部位、RNAスプライシング部位、ポリアデニル化部位（例えば、SV40ラージT Ag ポリA付加部位）、および転写ターミネーター配列などである。例えば、Ausubel et al.、前出；Sambrook, et al.、前出を参照のこと。本発明の核酸またはタンパク質の産生のために有用な他の細胞は公知であり、および／あるいは、例えば、細胞系統およびハイブリドーマのAmerican Type Culture Collectionカタログ（www.atcc.org）から、または他の公知の若しくは商業的な供給源から利用可能である。

#### 【0098】

真核生物宿主細胞が利用されるとき、ポリアデニル化または転写ターミネーター配列は、典型的には、ベクターに組み込まれる。ターミネーター配列の1つの例は、ウシ成長ホルモン遺伝子からのポリアデニル化配列である。転写物の正確なスプライシングのための配列もまた含むことができる。スプライシング配列の1つの例は、SV40からのVP1イントロンである（Sprague, et al., J. Virol. 45:773-781 (1983)）。さらに、宿主細胞において複製を制御するための遺伝子配列は、当該分野において公知であるように、ベクターに組み込まれる。

#### 【0099】

##### 抗体の産生

本発明の少なくとも1の抗CD22抗体は、当該分野において周知であるように、細胞系統、混合された細胞系統、不死化細胞、または不死化細胞のクローン性集団によって、選択的に産生できる。例えば、Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2001)；Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2. sup. and Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)；Harlow and Lane, antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989). Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001)；Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)を参照のこと、各々がこの参照により本明細書に組み込まれる。

#### 【0100】

1つのアプローチにおいて、ハイブリドーマは、当該分野において公知であるように、適切な不死化細胞系統（例えば、骨髓腫細胞系統、これに限定されるものではないが、Sp2/0、Sp2/0-AG14、NSO、NS1、NS2、AE-1、L.5、>243、P3X63Ag8.653、Sp2 SA3、Sp2 MAI、Sp2 SS1、Sp2 SA5、U937、MLA 144、ACT IV、MOLT4、DA-1、JURKAT、WEHI、K-562、COS、RAJI、NIH 3T3、HL-60、MLA 144、NAMAIWA、NEURO 2Aなど）または同様のもの、またはヘテロミエローマ（heteromyeloma）、その融合産物、またはそこから誘導された任意の細胞若しくは融合細胞、または任意の他の適切な細胞系統を融合することによって産生される。例えば、www.atcc.org、www.lifetech.com.などを参照のこと、抗体産生細胞は、これに限定されるものではないが、例えば、単離されたかまたはクローニングされた、脾臓、末梢血、リンパ液、扁桃腺、または他の免疫ま

たはB細胞含有細胞、または、組換え若しくは内在性の、ウイルス、細菌、藻類、原核生物、両生類、昆虫、爬虫類、魚類、哺乳動物、齧歯類、ウマ、ヒツジ ( o v i n e )、ヤギ、ヒツジ ( s h e e p )、霊長類、真核生物、ゲノムDNA、cDNA、rDNA、ミトコンドリアDNAまたはRNA、葉緑体DNAまたはRNA、hnRNA、mRNA、tRNA、一本鎖、二本鎖または三本鎖、ハイブリダイズしたなど、またはこれらの任意の組み合わせとしての内在性または異種核酸のいずれかとして、重鎖または軽鎖定常または可変配列またはフレームワーク配列またはCDR配列を発現する任意の他の細胞である。例えば、Ausubel、前出、およびColligan, Immunology, 前出、第2章を参照のこと、この参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0101】

10

任意の他の適切な宿主細胞はまた、本発明の抗体、その特殊化されたフラグメントまたはバリエーションをコードする異種または内在性核酸を発現するためにも使用できる。融合細胞 (ハイブリドーマ) または組換え細胞は、選択的培養条件または他の公知の方法を使用して単離でき、そして限界希釈若しくはセルソーティング、または他の公知の方法によってクローニングできる。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、適切なアッセイ (例えば、ELISA) によって選択できる。

【0102】

本発明の抗体は、少なくとも1の抗CD22抗体をコードする核酸を使用して調製され、ヤギ、ウシ、ウマ、ヒツジなどのトランスジェニック動物または哺乳動物を提供でき、これらの動物はこのような抗体をこれらのミルクの中で産生する。このような動物は公知の方法を使用して提供できる。例えば、これに限定されないが、米国特許第5,827,690号明細書; 同第5,849,992号明細書; 同第4,873,316号明細書; 同第5,849,992号明細書; 同第5,994,616号明細書、同第5,565,362号明細書; 同第5,304,489号明細書などを参照のこと、これらの各々は、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0103】

本発明の抗体は、少なくとも1の抗CD22抗体をコードする核酸を使用してさらに調製され、植物の部分の中で、またはそこから培養された細胞の中で、このような抗体、特殊化された部分、またはバリエーションを産生するトランスジェニック植物および培養植物細胞 (例えば、これに限定されるものではないが、タバコおよびトウモロコシを含む) を提供することができる。非限定的な例として、組換えタンパク質を発現するトランスジェニックタバコ葉は、例えば、誘導性プロモーターを使用して、大量の組換えタンパク質を提供するために首尾よく使用されてきた。例えば、Cramer et al., Curr. Top. Microbiol. Immunol. 240:95-118 (1999) およびその中で引用された参考文献を参照のこと。また、トランスジェニックトウモロコシは、他の組換え系において産生されたもの、または天然の供給源から精製されたものと等価な生物学的活性を有する、商業的な製造レベルで哺乳動物タンパク質を発現するために使用されてきた。例えば、Hood et al., Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999) およびそこに引用された参考文献を参照のこと。抗体はまた、タバコ種子およびジャガイモ塊茎を含む、単鎖抗体 (scFv's) などの抗体フラグメントを含むトランスジェニック植物種子から大量に産生されたきた。例えば、Conrad et al., Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998) およびそこに引用された参考文献を参照のこと。従って、本発明の抗体はまた、公知の方法に従って、トランスジェニック植物を使用して産生できる。例えば、Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (October, 1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem Soc. Trans. 22:940-944 (1994); およびそこに引用された参考文献もまた参照のこと。上記の参考文献の各々は、この参照によりその全

30

40

50



体が本明細書に組み込まれる。

【0104】

抗体の精製

抗CD22抗体は、これに限定されるものではないが、プロテインA精製、プロテインG精製、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィーを含む周知の方法によって、組換え細胞培養から回収および精製できる。高速液体クロマトグラフィー（「HPLC」）もまた、精製のために利用できる。例えば、Colligan, Current Protocols in Immunology, or Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)、例えば、1章、4章、6章、8章、9章、および10章を参照のこと、各々はこの参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

を参照のこと。

【0105】

本発明の抗体には、天然に精製された生成物、化学合成手順の生成物、例えば、酵母、高等植物、昆虫、および哺乳動物細胞を含む真核生物宿主から、組換え技術によって産生される生成物が含まれる。組換え産生手順において利用される宿主に依存して、本発明の抗体はグリコシル化でき、またはグリコシル化されないこともでき、グリコシル化が好ましい。このような方法は多くの標準的な実験室マニュアルに記載されており、例えば、Sambrook、前出、17.37~17.42節；Ausubel、前出、10章、12章、13章、16章、18章、および20章、Colligan、Protein Science、前出、12~14章であり、すべてがこの参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

【0106】

精製された抗体は、例えば、ELISA、ELISPOT、フローサイトメトリー、免疫細胞学、Biacore（登録商標）分析、Sapidyne KinExA（商標）キネティック排除アッセイ、SDS-PAGEおよびウェスタンブロットによって、またはHPLC分析によって、ならびに本明細書に開示されている他の機能アッセイによって、特徴付けができる。

30

【0107】

哺乳動物細胞におけるCD22抗体のクローニングおよび発現

典型的な哺乳動物発現ベクターは、mRNAの転写の開始を媒介する少なくとも1のプロモーターエレメント、抗体コード配列、ならびに転写の終結および転写物のポリアデニル化のために必要とされるシグナルを含有する。さらなるエレメントには、エンハンサー、Kozak配列、およびドナーによって隣接されている介在配列、およびRNAスプライシングのためのアクセプター部位が含まれる。高度に効率的な転写は、SV40からの初期および後期プロモーター、レトロウイルス、例えば、RSV、HTLVII、HIVIIからの長い末端反復配列（LTRS）、およびサイトメガロウイルス（CMV）の初期プロモーターを用いて達成できる。しかし、細胞エレメントもまた使用できる（例えば、ヒトアクチンプロモーター）。本発明を実施する際の使用のための適切な発現ベクターには、例えば、pIRES1neo、pRetro-Off、pRetro-On、PLXSN、またはpLNCX（Clontech Labs, Palo Alto, Calif.）、pcDNA3.1(+/-)、pcDNA/Zeo(+/-)またはpcDNA3.1/Hygro(+/-)（Invitrogen）、PSVLおよびPMSG（Pharmacia, Uppsala, Sweden）、pRSVcat（ATCC 37152）、pSV2dhfr（ATCC 37146）、ならびにpBC12MI（ATCC 67109）などのベクターが含まれる。使用できる哺乳動物宿主細胞には、ヒトHeLa 293、H9およびJurkat細胞、マウスNIH3T3およびC127細胞

40

50

胞、C o s 1、C o s 7 および C V 1、ウズラ Q C 1 - 3 細胞、マウス L 細胞、ならびにチャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞が含まれる。

#### 【 0 1 0 8 】

あるいは、遺伝子は、染色体に組み込まれる遺伝子を含む安定な細胞系統の中で発現できる。d h f r、g p t、ネオマイシン、またはハイグロマイシンなどの選択マーカーを用いる同時トランスフェクションは、トランスフェクトされた細胞の同定および単離を可能にする。

#### 【 0 1 0 9 】

トランスフェクトされた遺伝子はまた、大量のコードされた抗体を発現するために増幅できる。D H F R ( ジヒドロ葉酸還元酵素 ) マーカーは、数百コピーまたは数千コピーさえもの関心対象の遺伝子を保有する細胞系統を開発するために有用である。別の有用な選択マーカーは、酵素グルタミンシンターゼ ( G S ) である ( M u r p h y , e t a l . , B i o c h e m . J . 2 2 7 : 2 7 7 - 2 7 9 ( 1 9 9 1 ) ; B e b b i n g t o n , e t a l . , B i o / T e c h n o l o g y 1 0 : 1 6 9 - 1 7 5 ( 1 9 9 2 ) ) 。これらのマーカーを使用して、哺乳動物細胞が選択培地中で増殖され、最高の耐性を有する細胞が選択される。これらの細胞系統は染色体に組み込まれた増幅された遺伝子を含む。チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) および N S O 細胞は、しばしば、抗体の産生のために使用される。

10

#### 【 0 1 1 0 】

C H O 細胞中でのクローニングおよび発現

20

単離された可変領域および定常領域をコードしている D N A、ならびに脱リン酸化されたベクターが、T 4 D N A リガーゼでライゲーションされる。次いで、E . c o l i H B 1 0 1 または X L - 1 B l u e 細胞が形質転換され、例えば、制限酵素分析を使用して、プラスミド p C 4 に挿入されたフラグメントを含む細菌が同定される。

#### 【 0 1 1 1 】

活性 D H F R 遺伝子を欠いているチャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞がトランスフェクションのために使用される。リポフェクションを使用して、5  $\mu$  g の発現プラスミド p C 4 が、0 . 5  $\mu$  g のプラスミド p S V 2 - n e o とともに同時トランスフェクトされる。プラスミド p S V 2 n e o は、優生選択マーカーを含むし、これは、G 4 1 8 を含む一群の抗生物質に対して耐性を付与する酵素をコードしている T n 5 からの n e o 遺伝子である。これらの細胞は、1  $\mu$  g / m l G 4 1 8 が補充されたアルファマイナス M E M に播種される。2 日後、細胞はトリプシン処理され、1 0、2 5、または 5 0 n g / m l のメトトレキサートプラス 1  $\mu$  g / m l G 4 1 8 が補充されたアルファマイナス M E M 中のハイブリドーマクローニングプレート ( G r e i n e r , G e r m a n y ) に播種される。約 1 0 ~ 1 4 日後、単クローンがトリプシン処理され、次いで、様々な濃度のメトトレキサート ( 5 0 n M、1 0 0 n M、2 0 0 n M、4 0 0 n M、8 0 0 n M ) を使用して、6 ウェルペトリディッシュまたは 1 0 m l フラスコに播種される。次いで、最高濃度のメトトレキサートで増殖しているクローンは、さらに高い濃度 ( 1 m M、2 m M、5 m M、1 0 m M、2 0 m M ) のメトトレキサートを含む新たな 6 ウェルプレートに移された。1 0 0 ~ 2 0 0 m M の濃度で増殖するクローンが得られるまで、同じ手順が反復される。所望の遺伝子産物の発現は、例えば、S D S - P A G E およびウェスタンブロット、E L I S A、または逆相 H P L C 分析によって分析される。

30

40

#### 【 0 1 1 2 】

抗 C D 2 2 抗体組成物

本発明はまた、天然には存在しない組成物、混合物、または型で提供される、本明細書に記載されているように、および / または当該分野において公知であるように、少なくとも 1、少なくとも 2、少なくとも 3、少なくとも 4、少なくとも 5、少なくとも 6 若しくはそれ以上の本発明の抗 C D 2 2 抗体を有する、少なくとも 1 の抗 C D 2 2 抗体組成物もまた提供する。このような組成物は、本明細書に記載された抗体、またはその特殊化されたフラグメント、ドメインまたはバリエーションの C D R 領域の連続するアミノ酸の 7 0 ~ 1

50

00%から成る群から選択される、抗CD22抗体アミノ酸配列の少なくとも1または2の全長、C末端および/またはN末端欠失バリエーション、ドメイン、フラグメント、または特殊化されたバリエーションを有する、天然に存在しない組成物を有する。好ましい抗CD22抗体組成物には、本明細書に記載される抗CD22抗体配列の一部を含有する少なくとも1のCDRまたはLBRとして、少なくとも1または2の全長、フラグメント、ドメイン、またはバリエーションが含まれる。さらなる好ましい組成物は、本明細書に記載される抗CD22AbのCDR領域の70~100%の少なくとも1の40~99%を有する。このような組成物のパーセンテージは、当該分野において公知であるようにまたは本明細書に記載されるように、重量、体積、濃度、モル濃度、または液体若しくは乾燥溶液、混合物、懸濁液、エマルジョン、若しくはコロイドとしてのモル濃度による。

10

#### 【0113】

本発明の抗CD22抗体組成物は、少なくとも1の抗CD22抗体を有する、任意の適切かつ有効な量の組成物または薬学的組成物の少なくとも1をさらに有することができ、この組成物は、このような調節、処理、または治療の必要がある細胞、組織、器官、動物、または患者に対してのものであり、選択的に、さらに以下から選択される少なくとも1を有する：少なくとも1のTNFアンタゴニスト（例えば、これに限定されるものではないが、TNF抗体またはフラグメント、可溶性TNF受容体またはフラグメント、その融合タンパク質、または小分子TNFアンタゴニスト）、抗リウマチ剤（例えば、メトトレキサート、オーラノフィン、オーロチオグルコース、アザチオプリン、エタネルセプト、金チオマレートナトリウム、ヒドロキシクロロキン硫酸塩、レフルノミド、スルファサラジン（sulfasalazine）、筋弛緩剤、麻薬、非ステロイド系抗炎症薬（NSAID）、鎮痛剤、麻酔薬、鎮静剤、局所麻酔薬、神経筋遮断薬、抗菌剤（例えば、アミノグリコシド、抗真菌剤、駆虫薬、抗ウイルス薬、カルバペネム、セファロスポリン、フルオロキノロン（fluroquinolone）、マクロライド、ペニシリン、スルホンアミド、テトラサイクリン、別の抗菌剤）、抗乾癬剤、副腎皮質ステロイド、アナボリックステロイド、糖尿病関連薬剤、ミネラル剤、栄養剤、甲状腺製剤、ビタミン、カルシウム関連ホルモン、下痢止め剤、咳止め薬、制吐薬、抗潰瘍剤、通じ薬、抗凝血剤、エリスロポエチン（例えば、エポエチンアルファ）、フィルグラスチム（例えば、G-CSF、ニューボジェン）、サルグラモスチム（GM-CSF、ロイキン（Leukine））、免疫化、免疫グロブリン、免疫抑制剤（例えば、バシリキシマブ、シクロスポリン、ダクリズマブ）、成長ホルモン、ホルモン補充薬物、エストロゲン受容体調節因子、散瞳薬、毛様筋調節薬、アルキル化剤、代謝拮抗物質、分裂抑制剤、放射性医薬品、抗鬱剤、抗躁剤、抗精神病薬、精神安定剤、睡眠薬、交感神経様作用薬、興奮剤、ドネペジル、タクリン、喘息薬、ベータアゴニスト、吸入ステロイド、ロイコトリエン阻害剤、メチルキサンチン、クロモリン、エピネフリンまたはそのアナログ、ドルナーゼ（domase）アルファ（ブルモザイム）、サイトカインまたはサイトカインアンタゴニスト。このようなサイトカインの非限定的な例には、これに限定されるものではないが、IL-1~IL-34のいずれかが含まれる。適切な投薬量は当該分野において周知である。例えば、Wells et al., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, Calif. (2000)を参照のこと、これらの各々は、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

20

30

40

#### 【0114】

本発明の抗CD22抗体化合物、組成物、または組み合わせは、任意の適切な補助剤の少なくとも1、例えば、これに限定されるものではないが、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバントなどをさらに有することができる。薬学的に受容可能な補助剤が好ましい。このような滅菌溶液の非限定的な例、およびこのような

50

滅菌溶液を調製する方法は当該分野において周知であり、例えば、これに限定されるものではないが、Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18<sup>th</sup> Edition, Mack Publishing Co. (Easton, Pa.) 1990である。当該分野において周知であるように、または本明細書に記載されるように、抗CD22抗体、フラグメントまたはバリアント組成物の投与の様式、溶解性、および/または安定性のために適切である薬学的に受容可能な担体は、日常的に選択することができる。

【0115】

本発明の組成物において有用な薬学的賦形剤および添加剤は、これに限定されるものではないが、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、および炭水化物（例えば、モノサッカリド、ジ-、トリ-、テトラ-、およびオリゴサッカリド；アルジトール、アルジトール酸、エステル化糖などの誘導化糖類；およびポリサッカリドまたは糖ポリマーを含む糖類）を含み、これは、単独でまたは組み合わせで存在し得、重量でまたは体積で1~99.99%を有する。例示的なタンパク質賦形剤には、ヒト血清アルブミン（HSA）、組換えヒトアルブミン（rHA）などの血清アルブミン、ゼラチン、カゼインなどが含まれる。緩衝能力においてもまた機能することができる代表的なアミノ酸/抗体成分には、アラニン、グリシン、アルギニン、ペタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リジン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテームなどが含まれる。1つの好ましいアミノ酸はグリシンである。

【0116】

本発明における使用のために適切な炭水化物賦形剤は、例えば、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなどのモノサッカリド；ラクトース、スクロース、トレハロース、セロピオースなどのジサッカリド；ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなどのポリサッカリド；およびマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）、ミオイノシトールなどのアルジトールを含む。本発明における使用のための好ましい炭水化物賦形剤は、マンニトール、トレハロース、およびラフィノースである。

【0117】

抗CD22抗体組成物はまた、緩衝剤またはpH調整剤も含むことができ；典型的には、この緩衝剤は、有機酸または塩基から調製された塩である。代表的な緩衝剤には、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸、またはフタル酸の塩などの有機酸塩、Tris、トロメタミン塩酸塩、またはリン酸緩衝液が含まれる。本発明の組成物における使用のための好ましい緩衝液は、クエン酸塩などの有機酸塩である。

【0118】

加えて、本発明の抗CD22抗体組成物は、ポリビニルピロリドン、フィコール（ポリマー性糖）、デキストレート（例えば、2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリンなどのシクロデキストリン）、ポリエチレングリコールなどのポリマー性賦形剤/添加剤、香料、抗菌剤、甘味料、抗酸化剤、帯電防止剤、界面活性剤（例えば、「TWEEN 20」および「TWEEN 80」などのポリソルベート）、脂質（例えば、リン脂質、脂肪酸）、ステロイド（例えば、コレステロール）、およびキレート剤（例えば、EDTA）を含むことができる。

【0119】

本発明に従う抗CD22抗体、部分またはバリアント組成物における使用のために適切なこれらおよびさらなる公知の薬学的賦形剤および/または添加剤は、例えば、「Remington: The Science & Practice of Pharmacy」, 19<sup>sup</sup>.th ed., Williams & Williams, (1995)において、および、「Physician's Desk Reference」, 52<sup>nd</sup> ed., Medical Economics, Montvale, N.J

10

20

30

40

50

．（１９９８）において列挙されているように、当該分野において公知であり、これらの開示は、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。好ましい担体または賦形剤は炭水化物（例えば、サッカリドおよびアルジトール）および緩衝剤（例えば、クエン酸）またはポリマー性剤である。

#### 【０１２０】

##### 製剤

上記の通り、本発明は、安定な製剤を提供し、これは、好ましくは、生理食塩水または選択された塩を伴うリン酸緩衝液であり、ならびに保存剤を含有する保存溶液および製剤、ならびに薬学的および獣医学的使用のために適切である多目的保存製剤であり、薬学的に受容可能な製剤の中に少なくとも１の抗ＣＤ２２抗体を有する。保存製剤は、少なくとも１の公知の保存剤、または、水性希釈剤中の少なくとも１のフェノール、*m*-クレゾール、*p*-クレゾール、*o*-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、硝酸フェニル水銀、フェノキシエタノール、ホルムアルデヒド、クロロブタノール、塩化マグネシウム（例えば、六水和物）、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、およびチメロサル、若しくはこれらの混合物から成る群から選択的に選択される。任意の適切な濃縮物または混合物が、当該分野において公知であるように使用でき、例えば、０．００１～５％、またはその中の任意の範囲若しくは値、例えば、これに限定されるものではないが、０．００１、０．００３、０．００５、０．００９、０．０１、０．０２、０．０３、０．０５、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．４、０．５、０．６、０．７、０．８、０．９、１．０、１．１、１．２、１．３、１．４、１．５、１．６、１．７、１．８、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．３、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、またはその中の任意の範囲若しくは値である。非限定的な例には以下が含まれる：保存剤なし、０．１～２％*m*-クレゾール（例えば、０．２、０．３、０．４、０．５、０．９、１．０％）、０．１～３％ベンジルアルコール（例えば、０．５、０．９、１．１、１．５、１．９、２．０、２．５％）、０．００１～０．５％チメロサル（例えば、０．００５、０．０１）、０．００１～２．０％フェノール（例えば、０．０５、０．２５、０．２８、０．５、０．９、１．０％）、０．０００５～１．０％アルキルパラベン（例えば、０．０００７５、０．０００９、０．００１、０．００２、０．００５、０．００７５、０．００９、０．０１、０．０２、０．０５、０．０７５、０．０９、０．１、０．２、０．３、０．５、０．７５、０．９、１．０％）など。

#### 【０１２１】

上記の通り、本発明は、パッケージング材料、および、選択的に水性希釈剤中で、処方された緩衝剤および／または保存剤とともに、少なくとも１の抗ＣＤ２２抗体の溶液を有する少なくとも１のバイアルを有する製品を提供し、ここで、上記パッケージング材料は、このような溶液が１、２、３、４、５、６、９、１２、１８、２０、２４、３０、３６、４０、４８、５４、６０、６６、７２時間若しくはそれ以上の期間にわたって保持できることを示すラベルを有する。本発明はさらに、パッケージング材料、凍結乾燥された少なくとも１の抗ＣＤ２２抗体を有する第１のバイアル、および処方された緩衝剤または保存剤の水性希釈液を有する第２のバイアルを有する製品を有し、ここで、上記パッケージング材料は、少なくとも１の抗ＣＤ２２抗体を水性希釈液中で再構成して、２４時間若しくはそれ以上の期間にわたって保持できる溶液を形成することを患者に指示するラベルを有する。

#### 【０１２２】

本発明に従って使用される少なくとも１の抗ＣＤ２２抗体は、哺乳動物細胞またはトランスジェニック調製物からを含む、組換え手段によって産生でき、または、本明細書に記載されるように、若しくは当該分野において公知であるように、他の生物学的供給源から精製できる。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 2 3 】

本発明の生成物中の少なくとも1の抗CD22抗体の範囲には、再構成の際に生じる量が含まれ、湿/乾系における場合、約1.0マイクログラム/ml～約1000mg/mlの濃度であるが、より低い濃度およびより高い濃度が操作可能であり、そして意図される送達ビヒクルに依存し、例えば、溶液製剤は、経皮パッチ、肺、経粘膜、または浸透圧若しくはマイクロポンプ方法とは異なる。

## 【 0 1 2 4 】

好ましくは、水性希釈剤は、選択的に、さらに、薬学的に受容可能な保存剤を有する。好ましい保存剤には、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、およびチメロサル、またはその混合物から成る群から選択されるものが含まれる。製剤中で使用される保存剤の濃度は、抗菌効果を生じるために十分な濃度である。このような濃度は、選択された保存剤に依存し、当業者によって容易に決定される。

## 【 0 1 2 5 】

他の賦形剤、例えば、等張剤、緩衝剤、抗酸化剤、保存増強剤は、選択的にかつ好ましく希釈剤に添加できる。グリセリンなどの等張剤は、既知の濃度で一般的に使用される。生理学的に耐容性である緩衝剤は、pH調節の改善を提供するために好ましく添加される。これらの製剤は、広い範囲のpH、例えば、pH4～約pH10を網羅することができ、好ましい範囲は約pH5～約pH9、最も好ましい範囲は約6.0～約8.0である。好ましくは、本発明の製剤は、約6.8から約7.8の間のpHを有する。好ましい緩衝剤にはリン酸緩衝剤が含まれ、最も好ましくは、リン酸ナトリウム、特に、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）である。

## 【 0 1 2 6 】

他の添加剤、例えば、Tween 20（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート）、Tween 40（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノパルミテート）、Tween 80（ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノオレエート）、プルロニック F68（ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンブロックコポリマー）、およびPEG（ポリエチレングリコール）のような薬学的に受容可能な可容化剤、またはポリソルベート20若しくは80またはポロキサマー184若しくは188、プルロニック、R T M、ポリオール（polyols）などの非イオン系界面活性剤、他のブロックコポリマー、およびキレート剤、例えば、EDTAおよびEGTAは、凝集を減少させるために、製剤または組成物に選択的に加えることができる。これらの添加剤は、ポンプまたはプラスチック容器が製剤を管理するために使用される場合に特に有用である。薬学的に受容可能な界面活性剤の存在は、タンパク質が凝集する傾向を軽減する。

## 【 0 1 2 7 】

本発明の製剤は、少なくとも1の抗CD22抗体、ならびに、フェノール、m-クレゾール、p-クレゾール、o-クレゾール、クロロクレゾール、ベンジルアルコール、アルキルパラベン、（メチル、エチル、プロピル、ブチルなど）、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、およびチメロサルまたはこれらの混合物から成る群から選択される水性希釈剤中の保存剤を混合する工程を有するプロセスによって調製できる。少なくとも1の抗CD22抗体および水性希釈剤中の保存剤を混合する工程は、従来の溶解手順および混合手順を使用して実行される。適切な製剤を調製するために、例えば、緩衝溶液中の少なくとも1の抗CD22抗体の測定量は、所望の濃度のタンパク質および保存剤を提供するために十分な量で緩衝溶液中で所望の保存剤と組み合わせられる。このプロセスのバリエーションは、当業者によって認識される。例えば、さらなる添加剤が使用されるか否かにかかわらず、成分が加えられる順番、製剤が調製される温度およびpHは、使用される濃度および投与の手段のために最適化できるすべての因子である。

## 【 0 1 2 8 】

特許請求された製剤は、透明溶液として、または凍結乾燥した少なくとも1の抗CD22抗体のバイアルを有し、このバイアルがともに再構成される水性希釈剤中に水、保存剤および/または賦形剤、好ましくは、リン酸緩衝液および/または生理食塩水、および選択された塩を含有する第2のバイアルを有する2バイアルとして、患者に提供できる。単一溶液バイアルまたは再構成を必要とする2バイアルのいずれかが、複数回再使用でき、患者の治療の単回または複数回サイクルのために十分であり得、従って、現在利用可能であるよりも便利な治療投薬計画を提供できる。

#### 【0129】

現在特許請求されている製品は、即時から24時間若しくはそれ以上までの期間にわたって、投与のために有用である。従って、現在特許請求されている製品は、患者に対して有意な利点を提供する。本発明の製剤は、選択的に、約2～約40の温度で安全に保存でき、長期間の間、タンパク質の生物学的活性を保持し、従って、溶液が、6、12、18、24、36、48、72、または96時間若しくはそれ以上の期間にわたって保持または使用できること示すパッケージ材料を可能にする。保存された希釈剤が使用される場合、このようなラベルは、1～12ヶ月間、半年間、1年半、および/または2年間までの使用を含むことができる。

10

#### 【0130】

本発明の少なくとも1の抗CD22抗体の溶液は、水性希釈剤中で少なくとも1の抗体を混合する工程を有するプロセスによって調製できる。混合は、従来の溶解および混合の手順を使用して実行される。適切な希釈剤を調製するために、例えば、水または緩衝剤中の少なくとも1の抗体の測定量は、所望の濃度でタンパク質および任意選択で保存剤または緩衝剤を提供するために十分な量で組み合わせられる。このプロセスのバリエーションは当業者によって認識されている。例えば、さらなる添加剤が加えられるか否かにかかわらず、成分が加えられる順番、製剤が調製される温度およびpHは、使用される濃度および投与の手段のために最適化できるすべての因子である。

20

#### 【0131】

特許請求された製品は、透明溶液として、または凍結乾燥した少なくとも1の抗CD22抗体のバイアルを有し、このバイアルがともに再構成される水性希釈剤を含有する第2のバイアルを有する2バイアルとして患者に提供できる。単一溶液バイアルまたは再構成を必要とする2バイアルのいずれかが、複数回再使用でき、患者の治療の単回または複数回サイクルのために十分であり得、従って、現在利用可能であるよりも便利な治療投薬計画を提供する。

30

#### 【0132】

特許請求された製品は、透明溶液、または凍結乾燥した少なくとも1の抗CD22抗体のバイアルを有し、このバイアルがともに再構成される水性希釈剤を含有する第2のバイアルを有する2バイアルを、薬局、医院、または他のこのような機関若しくは施設に提供することによって患者に直接的に提供できる。この場合の透明溶液は、1リットルまたはさらに大きなサイズまでであり得、少なくとも1の抗体溶液のより小さな部分がより小さなバイアルへの移動のために1回若しくは複数回収できる大きなリザーバーを提供し、薬局または医院によって彼らの顧客および/または患者まで提供できる。

40

#### 【0133】

これらの単一バイアル系を有する認識されているデバイスは、BD Pens、BD Autojector.RTM.、Humaject.RTM.、NovoPen.RTM.、B-D.RTM.Pen、AutoPen.RTM.、およびOptiPen.RTM.、GenotropinPen.RTM.、Genotronorm Pen.RTM.、Humatro Pen.RTM.、Reco-Pen.RTM.、Roferon Pen.RTM.、Biojector.RTM.、ijec.RTM.、J-tip Needle-Free Injector.RTM.、Intraject.RTM.、Medi-Ject.RTM.、例えば、Becton Dickinson (Franklin Lakes, N.J., www.bectondickenson.

50

com)によって製造または開発されたもの、Disetronic(Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com; Bioject, Portland, Oreg. (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical(Peterborough, UK, www.weston-medical.com)、Medi-Ject Corp(Minneapolis, Minn., www.mediject.com)などの、溶液の送達のためのこれらのペンインジェクターデバイスが含まれる。2バイアル系を有する認識されているデバイスには、HumatroPen.RTMなどの再構成溶液の送達のためのカートリッジ中で凍結乾燥薬物を再構成するためのこれらのペンインジェクター系が含まれる。

10

#### 【0134】

現在特許請求されている製品にはパッケージング材料が含まれる。パッケージング材料は、監督官庁によって必要とされる情報に加えて、製品が使用できる条件を提供する。本発明のパッケージング材料は、2バイアル、湿/乾、製品のために、水性希釈剤中で少なくとも1の抗CD22抗体を再構成して、溶液を形成し、かつその溶液を、2~24時間若しくはそれ以上の期間にわたって使用するために患者に説明書を提供する。単一バイアル、溶液製品について、ラベルはこのような溶液が2~24時間若しくはそれ以上の期間にわたって使用できることを示す。現在特許請求されている製品は、ヒト薬学的製品用途のために有用である。

#### 【0135】

20

本発明の製剤は、少なくとも1の抗CD22抗体、および選択された緩衝液、好ましくは、生理食塩水または選択された塩を含有するリン酸緩衝液を混合することを有するプロセスによって調製できる。水性希釈剤中で少なくとも1の抗体および緩衝液を混合することは、従来の溶解手順および混合手順を使用して実行される。適切な製剤を調製するために、例えば、水または緩衝液中の少なくとも1の抗体の測定量は、所望の濃度のタンパク質および緩衝液を提供するために十分な量の水中の所望の緩衝剤とともに組み合わせられる。このプロセスのバリエーションは当業者によって認識されている。例えば、さらなる添加剤が使用されるか否かにかかわらず、成分が加えられる順番、製剤が調製される温度およびpHは、使用される濃度および投与の手段のために最適化できるすべての因子である。

30

#### 【0136】

特許請求された安定なまたは保存された製剤は、透明溶液として、または凍結乾燥した少なくとも1の抗CD22抗体のバイアルを有し、このバイアルがともに再構成される水性希釈剤中に保存剤および/または賦形剤を含有する第2のバイアルを有する2バイアルとして、患者に提供できる。単一溶液バイアルまたは再構成を必要とする2バイアルのいずれかが、複数回再使用でき、患者の治療の単回または複数回サイクルのために十分であり得、従って、現在利用可能であるよりも便利な治療投薬計画を提供する。

#### 【0137】

本明細書に記載される安定なまたは提示された製剤または溶液のいずれかにおける少なくとも1の抗CD22抗体は、当該分野において周知であるように、SCまたはIM注射; 経皮、肺、経粘膜、移植、浸透圧ポンプ、カートリッジ、マイクロポンプ、または当業者によって認識される他の手段を含む様々な送達方法を介して、本発明に従って患者に投与できる。

40

#### 【0138】

##### 治療用適用

CD22は、Siglecシアル酸結合タンパク質受容体スーパーファミリーのメンバーであり、B細胞の発生に対して、ならびに、リンパ腫ならびに急性および慢性リンパ球性白血病を含む様々なB細胞癌に対して、高度に特異的な様式で発現される(Crocke et al, Nature Reviews Immunology 7, 255-266, 2007)。抗CD22抗体は、B細胞を発現するCD22の増殖をネガティ

50



ブに調節することが見出されており、様々な疾患の治療において関係している。C D 2 2 抗体は、B 細胞依存性自己免疫疾患の患者、および C D 2 2 が発現する血液学的癌の患者における臨床試験において試験されてきた。特定の抗体は、細胞複製を遮断するネガティブ成長シグナルを刺激するプロセスである、C D 2 2 のチロシンリン酸化を誘導することが示されてきた。加えて、C D 2 2 抗体は、細胞内分泌経路およびリソソームの中で内在化されることが示されてきた。従って、迅速に内在化される強力なネガティブな成長調節特性を有する C D 2 2 に対する高親和性ヒト抗体は、血液学的癌、S L E、関節リウマチ、多発性硬化症、ならびに他の B 細胞依存性自己免疫疾患などの C D 2 2 関連疾患において使用されることが望ましい。抗 C D 2 2 A b s、またはキメラ若しくはヒト化、若しくはフラグメントを含むこれらの m A b s の任意の誘導体は、非ホジキンリンパ腫、他のリンパ腫、およびリンパ増殖性疾患、急性および慢性リンパ球性白血病、ならびに C D 2 2 が関与している他の疾患の治療において使用できる。これらの抗体は、単一の薬剤として、または他の治療剤と組み合わせてのいずれかで使用できる。これらはまた、I L - 2、I L - 1 2、および / または I F N などの他の腫瘍免疫調節剤と組み合わせて使用できる。加えて、抗 C D 2 2 抗体は、抗 T N F - 、I L - 1 2 / I L - 2 3、I L - 2、G p I I b / I I I a 受容体、C D 5 2、C D 2 0、R S V タンパク質、H E R 2 / n e u 受容体などの他のモノクローナル抗体；ならびにリツキサン、ハーセプチン、ミロターグ ( M y l o t a r g )、キャンパス、ゼバリン、ベックス ( B e x x a r )、エルビタックス、アバスチン、およびベクチピックスを含む商業的に認可された抗体と組み合わせて使用できる。

10

20

#### 【 0 1 3 9 】

これらの抗体は、単一の剤として、または他の治療剤と組み合わせて使用できる。これらはまた、I L - 2、I L - 1 2、G M - C S F、および / または I F N などの他の腫瘍免疫調節剤と組み合わせても使用できる。加えて、抗 C D 2 2 抗体は、抗 T N F - 、I L - 1 2 / I L - 2 3、I L - 2、G p I I b / I I I a 受容体、C D 5 2、C D 2 0、R S V タンパク質、H E R 2 / n e u 受容体などの他のモノクローナル抗体；ならびにリツキサン、ハーセプチン、ミロターグ ( M y l o t a r g )、キャンパス、ゼバリン、ベックス ( B e x x a r )、エルビタックス、アバスチン、およびベクチピックスを含む商業的に認可された抗体と組み合わせて使用できる。

30

#### 【 0 1 4 0 】

従って、本発明はまた、本発明の少なくとも 1 の抗 C D 2 2 抗体を使用して、当該分野において公知であるように、または本明細書に記載されるように、細胞、組織、器官、動物、または患者における、少なくとも 1 の C D 2 2 関連疾患を調節または治療するための方法も提供する。

#### 【 0 1 4 1 】

C D 2 2 は、B 細胞癌および異形成に対して高いレベルで発現されることが知られており、有害な細胞のアポトーシスの誘導を包含する自己分泌または傍分泌メカニズムを調節してもよい。高いレベルで C D 2 2 を発現する B 細胞癌は、これに限定されるものではないが、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 ( D L B C )、濾胞性リンパ腫、急性および慢性 B 細胞リンパ球性白血病 ( A L L / C L L )、粘膜関連リンパ管リンパ腫 ( M A L T )、マントル細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、および他のリンパ形質細胞増殖 ( W H O 腫瘍分類、2 0 0 1 ) を含む。従って、抗 C D 2 2 抗体は、単独で、または他の化学療法剤および B 細胞を標的とする生物製剤と組み合わせて、これらの疾患を治療するために使用できる。加えて、全身性エリテマトーデス ( S L E )、関節リウマチ ( R A )、多発性硬化症 ( M S ) などの、B 細胞産生自己抗体形成が疾患に関与している、他の B 細胞依存性自己免疫疾患が、抗 C D 2 2 抗体を用いて治療できる。腫瘍細胞の生存および疾患の進行を調節するために C D 2 2 に向けられる抗体の能力は、インビトロとインビボの両方での腫瘍増殖に対する抗 C D 2 2 m A b の阻害作用によって確認された。C D 2 2 を発現するリンパ腫細胞への特定の抗 C D 2 2 抗体の結合は、インビボでの増殖を阻害できることが報告された ( S t e i n e t a l E p i t o p e s p e c i f i c i t y o

40

50

f the anti-B-cell lymphoma monoclonal antibody、LL2. Cancer Immunol. Immunother., 37: 293, 1993)。マウス抗CD22 MA b (元はEPB-2と命名され、今はLL2と呼ばれている)は、ヒト化することができ、NHLまたは慢性リンパ管白血病的画像化および治療のために使用できる。免疫組織化学研究は、LL2が、びまん性および結節性、低分化性リンパ球性リンパ腫、ならびに組織球性大細胞リンパ腫を含む実質的にすべてのNHLの症例と反応性であることを明らかにした。LL2は高度に制限された特異性を有し、正常リンパ節の胚中心および白脾髄のB細胞集団のみと反応性であり、骨髓における巨核球、ミエロイド細胞、または赤血球とは反応性でない。さらに、LL2は、末梢血正常B細胞を含むいかなる末梢血細胞とも反応性ではなく、または任意の他の正常組織とも反応性ではない。LL2はまた、その標的抗原に関連する他の独特な特徴を有し、他の抗B細胞リンパ腫抗体からこれを区別する。インビトロ研究は、Rajiリンパ腫細胞系統の表面上でそのCD22標的抗原に結合後にLL2が内在化されること、および抗原が細胞表面上で迅速に再発現されることを明確に実証した。エブラツズマブとして知られるマウスモノクローナル抗体のヒト化は、ヒトリンパ腫細胞系統に対して免疫調節効果および増殖調節効果を有する。(Carnahan et al., Molecular Immunology 44: 1331, 2007) al. 2001)。

10

#### 【0142】

抗CD22モノクローナル抗体

CD22はまた、予後因子および悪性度のマーカーであり得る。CD22は、実質的にすべてのリンパ腫において、ならびに大部分のALLおよびCLL B細胞白血病で高いレベルで発現されている。CD22発現は、CD20標的治療用抗体リツキシサンの治療後の患者の腫瘍において増加しており、CD22標的抗体が、リツキシサン耐性および再発患者を治療するために使用できることを示唆している(Micallef et al., Blood 118: 4053, 2011)。

20

#### 【0143】

CD22は、無力症/悪液質および骨吸収などの癌関連の病的状態における原因因子であると仮定されている。腫瘍誘導性の悪液質(Cahlin et al., 2000)および骨吸収(高カルシウム血症に続いて起こる)(Sandhu et al., 1999)は、CD22ノックアウトマウスにおいて減少していることが見出された。脳腫瘍に対して二次的である癌に付随するうつ病および脳水腫もまた、高レベルのCD22と関連付けられてきた(Musselman et al., 2001)。本発明の抗CD22抗体はまた、ヒトメラノーマを阻害することができ、ヒト前立腺癌腫は、ヌードマウスにおいて悪液質を誘導した。

30

#### 【0144】

本発明は、細胞、組織、器官、動物、または患者における少なくとも1の悪性疾患を調節または治療するための方法を含み、この疾患は、これに限定されるものではないが、以下の少なくとも1を含む：非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、白血病、急性白血病、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、B細胞、慢性リンパ球性白血病(CLL)、およびヘアリー細胞白血病。このような方法は、選択的に、このようなCD22抗体の投与の前、これらの投与と同時に、またはこれらの投与の後で、放射線治療、抗血管新生薬、化学療法剤、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤などと組み合わせて使用できる。

40

#### 【0145】

本発明はまた、細胞、組織、器官、動物、または患者における少なくとも1のCD22媒介免疫関連疾患を調節または治療するための方法も提供し、この疾患は、これに限定されるものではないが、以下の少なくとも1を含む：関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性発症若年性関節リウマチ、乾癬性関節炎、強直性脊椎炎(ankylosing spondylitis)、胃潰瘍、血清反応陰性関節症、変形性関節症(osteoarthritis)、炎症性大腸炎、潰瘍性大腸炎(ulcerative colitis)、全身性エリテマトーデス(systemic lupus erythematosus)。

50

osis)、抗リン脂質症候群、虹彩毛様体炎/ブドウ膜炎/視神経炎、特発性肺線維症、全身性血管炎/ヴェーゲナー肉芽腫症、サルコイドーシス、精巣炎/精管切除戻し手術、アレルギー性/アトピー性疾患、喘息、アレルギー性鼻炎、皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、アレルギー性結膜炎、過敏性肺炎、移植、臓器移植拒絶、移植片対宿主病、全身性炎症反応症候群、敗血症症候群、グラム陽性菌敗血症、グラム陰性菌敗血症、培養陰性敗血症、真菌敗血症、好中球減少性発熱、尿性敗血症、髄膜炎菌血症、外傷/出血、熱傷、電離放射線曝露、急性膵炎、成人呼吸窮迫症候群、関節リウマチ、アルコール性肝炎、慢性炎症性病変、サルコイドーシス、クローン病変、鎌状赤血球貧血、糖尿病、ネフローゼ、アトピー性疾患、過敏反応(hypersensitivity reactions)、アレルギー性鼻炎、花粉症、通年性鼻炎、結膜炎、子宮内膜症、喘息、じんましん、全身性アナフィラキシー(systemic anaphylaxis)、皮膚炎、悪性貧血、溶血性疾患、血小板減少症、任意の臓器または組織の移植片拒絶、腎臓移植拒絶、心臓移植拒絶、肝臓移植拒絶、膵臓移植拒絶、肺移植拒絶、骨髄移植(BMT)拒絶、皮膚同種移植片拒絶、軟骨移植拒絶、骨移植片拒絶(hone graft rejection)、小腸移植拒絶、胎児胸腺移植拒絶、副甲状腺移植拒絶、任意の臓器または組織の異種移植片拒絶、同種移植片拒絶、抗受容体過敏性反応、グレーブス病、レイノー病(Raynaud's disease)、B型インスリン抵抗性糖尿病、喘息、重症筋無力症、抗体媒介性細胞傷害性、III型過敏性反応、全身性エリテマトーデス、POEMS症候群(多発性神経障害、臓器肥大症、内分泌障害、モノクローナル免疫グロブリン異常症、および皮膚変化症候群)、多発性神経障害、臓器肥大症、内分泌障害、モノクローナル免疫グロブリン異常症、皮膚変化症候群、リン脂質症候群、天疱瘡、強皮症、混合性結合組織病、特発性アジソン病、真性糖尿病、慢性活動性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、白斑、血管炎、MI後心臓切開術症候群、IV型過敏性、接触性皮膚炎、過敏性肺炎、同種移植片拒絶、細胞内生物による肉芽腫、薬物過敏性、代謝性/特発性、ウィルソン病、ヘモクロマトーシス(hemochromatosis)、-1-抗トリプシン欠乏症、糖尿病性網膜症、橋本甲状腺炎、骨粗しょう症、視床下部-下垂体-副腎軸評価、原発性胆汁性肝硬変、甲状腺炎、脳脊髄炎、悪液質、嚢胞性線維症、新生児慢性肺疾患、慢性閉塞性肺疾患(COPD)、家族性血球貪食リンパ組織球増多症、皮膚病変、乾癬、脱毛症、ネフローゼ症候群、腎炎、糸球体腎炎、急性腎不全、血液透析、尿毒症、毒性、子癇前症、okt3治療、抗cd3治療、サイトカイン治療、化学療法、放射線治療(例えば、これに限定されるものではないが、無力症、貧血、悪液質などを含む)、慢性サリチル酸塩中毒、睡眠時無呼吸、肥満、心不全、副鼻腔炎、炎症性大腸炎など。例えば、the Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rahway, N.J. (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000)を参照のこと、各々がこの参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

30

40

50

#### 【0146】

##### 治療的処置

本発明の任意の方法は、少なくとも1の抗CD22抗体を有する有効量の組成物または薬学的組成物を、このような調節、処理、または治療の必要がある細胞、組織、器官、動物、または患者に投与する工程を有する、CD22媒介障害を治療するための方法を有することができる。このような方法は、選択的に、さらに、このような免疫疾患を治療するための同時投与または組み合わせ治療を有し、ここで、上記少なくとも1の抗CD22抗体、その特殊化された部分、若しくはバリエーションを投与する工程は、上記に記載されたような少なくとも1の薬剤の前、それと同時に、および/またはその後、投与する工程をさらに有する。

#### 【0147】

典型的には、病理学的状態の治療は、組成物中に含有される特異的活性に依存して、単

回または複数回投与あたり、全体で、平均で、用量あたり、患者キログラムあたり、少なくとも約 0.01 ~ 500 ミリグラムの範囲の少なくとも 1 の抗 CD22 抗体、および好ましくは、少なくとも約 0.1 ~ 100 ミリグラム抗体 / キログラム患者である、1 つの有効量または投薬量の少なくとも 1 の抗 CD22 抗体組成物を投与することによってもたらされる。あるいは、有効な血清濃度は、単回または複数回投与あたり、0.1 ~ 500  $\mu\text{g} / \text{ml}$  血清濃度を有することができる。適切な投薬量は医療従事者に公知であり、当然、特定の疾患状態、投与される組成物の特異的活性、および、いくつかの例においては、治療を受ける特定の患者に依存して、所望の治療量が達成され、これが、反復投与、すなわち、モニターされ、または測定された特定の用量の個々の投与の反復のために提供することが必要であり得、その場合、所望の日々の用量または効果が達成されるまで、個々の投与が反復される。

10

#### 【0148】

好ましい用量は、選択的に、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99 および / 若しくは 100 ~ 500  $\text{mg} / \text{kg}$  / 投与、若しくはその任意の範囲、値、若しくは分数を含むことができ、または、単回または複数回投与あたり、0.1、0.5、0.9、1.0、1.1、1.2、1.5、1.9、2.0、2.5、2.9、3.0、3.5、3.9、4.0、4.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、20、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14.0、14.5、4.9、5.0、5.5、5.9、6.0、6.5、6.9、7.0、7.5、7.9、8.0、8.5、8.9、9.0、9.5、9.9、10、10.5、10.9、11、11.5、11.9、12、12.5、12.9、13.0、13.5、13.9、14、14.5、15、15.5、15.9、1.6、1.6.5、1.6.9、1.7、1.7.5、1.7.9、1.8、1.8.5、1.8.9、1.9、1.9.5、1.9.9、2.0、2.0.5、2.0.9、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.6、10.0、20.0、30.0、40.0、50.0、60.0、70.0、80.0、90.0、100.0、150.0、200.0、250.0、300.0、350.0、400.0、450.0、および / 若しくは 5000  $\mu\text{g} / \text{ml}$  血清濃度、若しくはその任意の範囲、値、若しくは分数を達成するためである。

20

30

#### 【0149】

あるいは、投与される用量は、特定の薬剤の薬力学的特徴、ならびにその投与の様式および経路；レシピエントの年齢、健康、および体重；徴候の性質および程度、同時治療の種類、治療の頻度、ならびに所望される効果などの既知の因子に依存して変動する可能性がある。普通は、活性成分の投薬量は、体重キログラムあたり、約 0.1 ~ 100 ミリグラムであり得る。投与あたりまたは持続放出型で、キログラムあたり、通常、0.1 ~ 50、および好ましくは、0.1 ~ 10 ミリグラムが、所望の結果を得るために有効である。

40

#### 【0150】

非限定的な例として、ヒトまたは動物の治療は、少なくとも 1 の本発明の抗体の 1 回または定期的な投薬量として、1 日あたり、0.1 ~ 100  $\text{mg} / \text{kg}$ 、例えば、0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、

50

26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90または100 mg / kg を、1日め、2日め、3日め、4日め、5日め、6日め、7日め、8日め、9日め、10日め、11日め、12日め、13日め、14日め、15日め、16日め、17日め、18日め、19日め、20日め、21日め、22日め、23日め、24日め、25日め、26日め、27日め、28日め、29日め、30日め、31日め、32日め、33日め、34日め、35日め、36日め、37日め、38日め、39日め、または40日めの少なくとも1に、または、代替的にまたはさらに、1週め、2週め、3週め、4週め、5週め、6週め、7週め、8週め、9週め、10週め、11週め、12週め、13週め、14週め、15週め、16週め、17週め、18週め、19週め、20週め、21週め、22週め、23週め、24週め、25週め、26週め、27週め、28週め、29週め、30週め、31週め、32週め、33週め、34週め、35週め、36週め、37週め、38週め、39週め、40週め、41週め、42週め、43週め、44週め、45週め、46週め、47週め、48週め、49週め、50週め、51週め、または52週めの少なくとも1に、または、代替的にまたはさらに、1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、11年、12年、13年、14年、15年、16年、17年、18年、19年、または20年の少なくとも1に、またはこれらの任意の組み合わせに、単回、注入、または反復用量を使用して、提供されることができる。

10

#### 【0151】

内部投与のために適切な剤形（組成物）は、一般的には、単位または容器あたり、約0.1ミリグラム～約500ミリグラムの活性成分を含有する。これらの薬学的組成物中で、活性成分は、通常、組成物の総重量に基づいて約0.5～99.999重量%の量で存在する。

20

#### 【0152】

非経口製剤および投与

非経口投与のために、抗体は、薬学的に受容可能な非経口ビヒクルと一緒に、または別々に提供される、溶液、懸濁液、エマルジョン、または凍結乾燥粉末として製剤化できる。このようなビヒクルの例は、水、生理食塩水、リンガー溶液、デキストロース溶液、および1～10%ヒト血清アルブミンである。リポソームおよび固定油などの非水系ビヒクルもまた使用できる。ビヒクルまたは凍結乾燥粉末は、等張性を維持する添加剤（例えば、塩化ナトリウム、マンニトール）および化学安定性を維持する添加剤（例えば、緩衝剤および保存剤）を含有することができる。この製剤は公知のまたは適切な技術によって滅菌される。

30

#### 【0153】

適切な薬学的担体は、この分野における標準的な参考テキストである、Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osolの最新の版に記載されている。

#### 【0154】

非経口投与のための製剤は、一般的な賦形剤として、滅菌水または生理食塩水、ポリエチレングリコールなどのポリアルキレングリコール、植物起源の油、水素化ナフタレンなどを含有することができる。注射のための水性または油性懸濁液は、公知の方法に従って、適切な乳化剤または湿潤剤および懸濁剤を使用することによって調製できる。注射のための薬剤は、水溶液、または滅菌注射溶液、または溶媒中の懸濁液などの、非毒性、非経口投与可能な希釈剤であり得る。使用可能なビヒクルまたは溶媒として、水、リンガー液、等張性生理食塩水などが許容される：通常の溶媒、または懸濁溶媒として、滅菌不揮発性オイルが使用できる。これらの目的のために、いずれかの種類の不揮発性オイルおよび脂肪酸が使用でき、これには、天然または合成または半合成の脂肪油または脂肪酸；天然または合成または半合成のモノ-またはジ-またはトリ-グリセリドが含まれる。非経口（parental）投与は当該分野において公知であり、これに限定されるものではないが、従来的な注射手段、米国特許第5,851,198号明細書に記載されているようなガス圧無針注射デバイス、および米国特許第5,839,446号明細書に記載されて

40

50

いるようなレーザー穿孔デバイスを含み、これらはこの参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

#### 【0155】

##### 代替的な送達

本発明は、さらに、非経口、皮下、筋肉内、静脈内、関節内 (intrarticular)、気管支内、腹内、嚢内、軟骨内、腔内 (intracavitary)、腔内 (intracellular)、小脳内 (intracerebellar)、脳室内、結腸内、頸部内、胃内、肝内、心筋内、骨内、骨盤内、心膜内、腹腔内、胸膜内、前立腺内、肺内、直腸内、腎内、網膜内、髄腔内、滑液嚢内、胸腔内、子宮内、膀胱内、ポータス、膣、直腸、頬側、舌下、鼻内、または経皮の手段による少なくとも1の抗CD22抗体の投与に関連する。少なくとも1の抗CD22抗体組成物は、非経口 (皮下、筋肉内または静脈内) または任意の他の投与のため、特に、液体溶液または懸濁液の型での使用のため；膣または直腸投与における使用のため、特に、半固体、これに限定されるものではないが、例えば、クリームおよび坐剤の型で；頬側または舌下投与のため、例えば、これに限定されるものではないが、錠剤またはカプセルの型で；または鼻内、例えば、これに限定されるものではないが、散剤、鼻ドロップ、またはエアロゾルまたは特定の薬剤の型で；または、経皮的に、例えば、これに限定されるものではないが、ゲル、軟膏、ローション、懸濁液、または、皮膚構造を修飾するために、若しくは経皮パッチ中の薬物濃度を増加させるためのいずれかのために、ジメチルスルホキシドなどの化学エンハンサーを有し (Junginger, et al. In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59 - 90, Marcel Dekker, Inc. New York 1994、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)、または、皮膚上へのタンパク質およびペプチドを含有する製剤の適用を可能にする酸化剤を有する (国際公開第98/53847号パンフレット) パッチ送達デバイス系、または一過性の輸送経路を作製するためのエレクトロポレーションなど、または、電荷を有する薬剤の皮膚を通しての移動性を高めるためのイオントフォoresisなどの電場の適用、またはソノフォoresisなどの超音波の適用 (米国特許第4,309,989号明細書および同第4,767,402号明細書) のために調製できる (上記の刊行物および特許は、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。

#### 【0156】

##### 肺 / 鼻投与

肺投与のために、好ましくは、少なくとも1の抗CD22抗体組成物は、肺の下気道または副鼻腔に到達するために有効な粒子サイズで送達される。本発明に従って、少なくとも1の抗CD22抗体は、吸入による治療剤の投与のために、当該分野において公知である様々な吸入または鼻デバイスのいずれかによって送達できる。患者の副鼻腔または肺胞におけるエアロゾル化製剤を沈着させることが可能なこれらのデバイスは、定量吸入器、噴霧器、乾燥粉末発生器、スプレーヤーなどを含む。抗体の肺または鼻投与を指向するために適切な他のデバイスもまた、当該分野において公知である。すべてのこのようなデバイスは、エアロゾル中での抗体の分配のために、投与のために適切な製剤の使用ができる。このようなエアロゾルは、溶液 (水系と非水系の両方) または固体粒子のいずれかから構成されることができる。Ventolin, RTM, 定量用量吸入器のような定量用量吸入器は、典型的には、推進ガスを使用し、呼気の際に作動を必要とする (例えば、国際公開第94/16970号パンフレット、同第98/35888号パンフレットを参照のこと)。Turbuhaler, TM, (Astra)、Rotahaler, RTM, (Glaxo)、Diskus, RTM, (Glaxo)、Spiros, TM, inhaler (Dura)、Inhale Therapeuticsによって販売されているデバイス、およびSpinhaler, RTM, 粉末吸入器 (Fisons) のような粉末吸入器は、混合粉末の呼気作動を使用する (米国特許第4,668,218号明細書 Astra、欧州特許第237507号明細書 Astra、国際公開第97/25086号パンフレット Glaxo、同第94/08552号パンフレット Dura、米

国特許第5,458,135号明細書 Inhale、国際公開第94/06498号パンフレット Fisons、この参照によりその全体が本明細書に組み込まれる)。AERx.TM.Aradigm、the Ultravent.RTM.噴霧器(Mallinckrodt)、およびAcorn II.RTM.噴霧器(Marquest Medical Products)(米国特許第5,404,871号明細書 Aradigm、国際公開第97/22376号パンフレット)のような噴霧器は、溶液からエアロゾルを産生し、一方、定量用量吸入器、乾燥粉末吸入器などは小粒子溶液を生成し、上記の引用文献はこの参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。市販の吸入デバイスのこれらの特定の例は、本発明の実施のために適切な特定のデバイスの代表であることを意図し、本発明の範囲を限定することとしては意図されない。好ましくは、少なくとも1の抗CD22抗体を有する組成物は、乾燥粉末吸入器またはスプレーヤーによって送達される。本発明の少なくとも1の抗体を投与するための吸入デバイスのいくつかの望ましい特徴が存在する。例えば、吸入デバイスによる送達は、有利には、信頼性があり、再現可能で、かつ正確である。吸入デバイスは、良好な呼吸性のために、選択的に、小さな乾燥粒子、例えば、約10 $\mu$ m未満、好ましくは、約1~5 $\mu$ mを送達できる。

10

#### 【0157】

スプレーとしてのCD22抗体組成物の投与

CD22抗体組成物タンパク質を含むスプレーは、圧力下でノズルを通して少なくとも1の抗CD22抗体の懸濁液または溶液を押し進めることによって産生できる。ノズルのサイズと構成、適用される圧力、および液体供給速度は、所望のアウトプットおよび粒子サイズを達成するために選択できる。エレクトロスプレーは、例えば、キャピラリーまたはノズルフィードと接続した電場によって産生できる。有利には、スプレーヤーによって送達された少なくとも1の抗CD22抗体組成物タンパク質の粒子は、約10 $\mu$ m未満の粒子サイズ、好ましくは、約1 $\mu$ m~約5 $\mu$ mの範囲の、最も好ましくは、約2 $\mu$ m~約3 $\mu$ mの粒径を有する。

20

#### 【0158】

スプレーヤーとの使用のために適切な少なくとも1の抗CD22抗体組成物タンパク質の製剤は、典型的には、ml溶液あたり約0.1mg~約100mgの少なくとも1の抗CD22抗体組成物タンパク質、すなわち、mg/gm、またはこれらの中の任意の範囲または値、例えば、これに限定されるものではないが、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90または100mg/mlまたはmg/gmの濃度の水性溶液の抗体組成物タンパク質を含む。この製剤は、賦形剤、緩衝剤、等張剤、保存剤、界面活性剤、および好ましくは、亜鉛などの剤を含むことができる。この製剤はまた、賦形剤または抗体組成物タンパク質の安定化のための剤、例えば、緩衝剤、還元剤、バルクタンパク質、または炭水化物も含むことができる。抗体組成物タンパク質を製剤する際に有用なバルクタンパク質は、アルブミン、プロタミンなどを含む。抗体組成物タンパク質を製剤する際に有用な典型的な炭水化物は、スクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコースなどを含む。抗体組成物タンパク質製剤はまた、エアロゾルを形成する際の溶液の噴霧化によって引き起こされる抗体組成物タンパク質の表面誘導性凝集を減少または妨害できる、界面活性剤も含むことができる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、ならびにポリオキシエチレンソルビトール脂肪酸エステルなどの様々な従来の界面活性剤が利用できる。量は、一般的には、製剤の0.001から14重量%の間の範囲である。本発明の目的のためにとりわけ好ましい界面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート、ポリソルベート80、ポリソルベート20などである。CD22抗体、または特殊化された部分、またはバリエーションなどのタンパク質の製剤のための当該分野において公知であるさらなる剤もまた、製剤中に含まれることができる。

30

40

#### 【0159】

50

#### 噴霧器によるCD22抗体組成物の投与

抗体組成物タンパク質は、ジェット噴霧器または超音波噴霧器などの噴霧器によって投与できる。典型的には、ジェット噴霧器において、圧縮空気の供給源が、オリフィスを通して高速空気ジェットを作るために使用される。ガスがノズルを越えて広がるとき、低圧領域が作られ、これは、液体リザーバーに接続されたキャピラリーチューブを通して、抗体組成物タンパク質の溶液を引き出す。キャピラリーチューブからの液体の流れは、それがチューブを出たときに、不安定なフィラメントおよび液滴にせん断され、エアロゾルを作る。一定の範囲の構成、流速、およびパッフル型が、所定のジェット噴霧器からの所望の性能特性を達成するために利用できる。超音波噴霧器において、高周波電気エネルギーが、典型的には、圧電変換器を利用して、振動エネルギー、力学的エネルギーを作るために使用される。このエネルギーは、直接的に、またはカップリング液体を通してのいずれかで、抗体組成物タンパク質の製剤に移され、抗体組成物タンパク質を含むエアロゾルを作製する。有利には、噴霧器によって送達される抗体組成物タンパク質の粒子は、約10  $\mu\text{m}$ 未満の粒径、好ましくは、約1  $\mu\text{m}$  ~ 約5  $\mu\text{m}$ の範囲、最も好ましくは、約2  $\mu\text{m}$  ~ 約3  $\mu\text{m}$ の範囲の粒径を有する。

10

20

30

40

50

#### 【0160】

ジェットまたは超音波のいずれかの、噴霧器を用いる使用のために適切な少なくとも1の抗CD22抗体の製剤は、典型的には、溶液mlあたり、約0.1mg ~ 約100mgの濃度の少なくとも1の抗CD22抗体タンパク質を含む。この製剤は、賦形剤、緩衝剤、等張剤、保存剤、界面活性剤、および好ましくは、亜鉛などの剤を含むことができる。この製剤はまた、緩衝剤、還元剤、バルクタンパク質、または炭水化物などの、賦形剤、または少なくとも1の抗CD22抗体組成物タンパク質の安定化のための剤を含むこともできる。少なくとも1の抗CD22抗体組成物タンパク質を製剤する際に有用なバルクタンパク質は、アルブミン、プロタミンなどを含む。少なくとも1の抗CD22抗体を製剤する際に有用な典型的な炭水化物は、スクロース、マンニトール、ラクトース、トレハロース、グルコースなどを含む。少なくとも1の抗CD22抗体製剤はまた、エアロゾルを形成する際に溶液の噴霧化によって引き起こされる少なくとも1の抗CD22抗体の表面誘導性凝集を減少または防止できる、界面活性剤も含むことができる。ポリオキシエチレン脂肪酸エステルおよびアルコール、ならびにポリオキシエチレンソルビタン(sorbitol)脂肪酸エステルなどの様々な従来の界面活性剤が利用できる。量は、一般的に、製剤の0.001から4重量%の間の範囲である。本発明の目的のためのとりわけ好ましい界面活性剤は、ポリオキシエチレンソルビタンモノ-オレエート、ポリソルベート80、ポリソルベート20などである。抗体タンパク質などのタンパク質の製剤のための当該分野において公知のさらなる剤もまた、製剤において含められることができる。

#### 【0161】

##### 定量用量吸入器によるCD22抗体組成物の投与

定量用量吸入器(MDI)において、推進剤、少なくとも1の抗CD22抗体、および任意の賦形剤または他の添加剤は、液化圧縮ガスを含む混合物としてキャニスターの中に含有される。定量バルブの作動は、好ましくは、約10  $\mu\text{m}$ 未満、好ましくは、約1  $\mu\text{m}$  ~ 約5  $\mu\text{m}$ 、最も好ましくは、約2  $\mu\text{m}$  ~ 約3  $\mu\text{m}$ のサイズ範囲の粒子を含有するエアロゾルとしてダイ(die)混合物を放出する。所望のエアロゾル粒径は、ジェットミリング、スプレー乾燥、臨界点凝縮などを含む、当業者に公知である様々な方法によって製造された抗体組成物タンパク質の製剤を利用することによって得ることができる。好ましい定量用量吸入器に、3MまたはGlaxoによって製造され、ハイドロフルオロカーボン推進剤を利用するものが含まれる。

#### 【0162】

定量用量吸入デバイスを用いる使用のための少なくとも1の抗CD22抗体の製剤は、一般的には、例えば、界面活性剤の補助を伴って推進剤中に懸濁された、非水系媒体中の懸濁物として、少なくとも1の抗CD22抗体を含有する微細に分割された粉末を含む。推進剤は、トリクロロフルオロメタン、ジクロロジフルオロメタン、ジクロロテトラフル



オロエタノール、および 1, 1, 1, 2 - テトラフルオロエタン、HFA - 134a (ハイドロフルオロアルカン - 134a)、HFA - 227 (ハイドロフルオロアルカン - 227) などを含む、クロロフルオロカーボン、ハイドロクロロフルオロカーボン、ハイドロフルオロカーボン、またはハイドロカーボンなどの、この目的のために利用される任意の従来の材料であり得る。好ましくは、推進剤はハイドロフルオロカーボンである。界面活性剤は、推進剤中の懸濁液としての少なくとも 1 の抗 CD22 抗体を安定化するように選択でき、化学分解に対して活性薬剤を保護するなどである。適切な界面活性剤には、ソルビタントリオレート、大豆レシチン、オレイン酸などが含まれる。ある例において、溶液エアロゾルは、エタノールなどの溶媒を使用することが好ましい。タンパク質の製剤のために当該分野において公知のさらなる剤もまた、製剤において含めることができる。

10

#### 【0163】

当業者は、本発明の方法が、本明細書に記載されていないデバイスを介して少なくとも 1 の抗 CD22 抗体組成物の肺投与によって達成できることを認識している。

#### 【0164】

##### 経口製剤および投与

経口投与のための製剤は、腸壁の浸透性を人工的に増加させるためのアジュバント (例えば、レゾルシノール、ならびにポリオキシエチレンオレイルエーテルおよび n - ヘキサデシルポリエチレンエーテルなどの非イオン性界面活性剤) の同時投与、ならびに酵素的分解を阻害するための酵素阻害剤 (例えば、膵臓トリプシンインヒビター、ジイソプロピルフルオロホスフェート (DFP) およびトラジロール) の同時投与に依存する。経口投与のための固形剤形の活性成分化合物は、スクロース、ラクトース、セルロース、マンニトール、トレハロース、ラフィノース、マルチトール、デキストラン、デンプン類、寒天、アルギン酸 (arginate s)、キチン、キトサン、ペクチン、トラガカントガム、アラビアガム、ゼラチン、コラーゲン、カゼイン、アルブミン、合成または半合成ポリマー、およびグリセリドを含む少なくとも 1 の添加剤と混合できる。これらの剤形はまた、他の型の (単数または複数の) 添加剤、例えば、不活性希釈剤、ステアリン酸マグネシウムなどの滑剤、パラベン、ソルビン酸、アスコルビン酸、トコフェロールなどの保存剤、システインなどの抗酸化剤、崩壊剤、結合剤、濃厚剤、緩衝剤、甘味料、香料、芳香剤なども含有する。

20

30

#### 【0165】

錠剤および丸薬はさらに、腸溶コーティング調製物に加工されることができる。経口投与のための液体調製物は、医学用途のために許容可能な、エマルジョン、シロップ、エリキシル、懸濁液、および溶液調製物を含む。これらの調製物は、上記分野において通常使用される不活性希釈剤、例えば、水を含むことができる。リボソームもまた、インスリンおよびヘパリンのための薬物送達系として記載されてきた (米国特許第 4, 239, 754 号明細書)。より最近では、混合アミノ酸の人工ポリマー (プロテイノイド) のミクロスフェアが医薬を送達するために使用されてきた (米国特許第 4, 925, 673 号明細書)。さらに、米国特許第 5, 879, 681 号明細書および同第 5, 5, 871, 753 号明細書に記載されている担体化合物が、当該分野において公知である生物学的に

40

#### 【0166】

##### 粘膜性剤および投与

粘膜表面を通しての吸収のために、少なくとも 1 の抗 CD22 抗体を投与する組成物および方法は、複数のミクロン以下粒子、粘膜付着高分子、生体活性ペプチド、およびエマルジョン粒子の粘膜付着を達成することにより粘膜表面を通して吸収を促進する水性連続相を有するエマルジョンを含む (米国特許第 5, 514, 670 号明細書)。本発明のエマルジョンの適用のために適切な粘膜表面は、角膜、結膜、頬側、舌下、鼻、膣、肺、胃、腸、および直腸の投与の経路を含むことができる。膣または直腸投与のための製剤、例えば、坐剤は、賦形剤として、例えば、ポリアルキレングリコール、ワセリン、ココアバ

50

ターなどを含有することができる。鼻内投与のための製剤は固体であり得、賦形剤として、例えば、ラクトースを含有することができ、または、水系若しくは油系溶液の鼻ドロップであり得る。頬側投与のために、賦形剤は、糖、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、前もってゼラチン化されたデンプン ( p r e g e l i n a t i n e d s t a r c h ) などを含む ( 米国特許第 5 , 8 4 9 , 6 9 5 号明細書 ) 。

#### 【 0 1 6 7 】

##### 経皮製剤および投与

経皮投与のために、少なくとも 1 の抗 C D 2 2 抗体は、リボソームまたはポリマーナノ粒子、微粒子、マイクロカプセル、またはミクロスフェア ( 他に言及されない限り、集合的に微粒子のことをいう ) などの送達デバイス中でカプセル化される。多数の適切なデバイスが知られており、これには、合成ポリマー、例えば、ポリ乳酸などのポリヒドロキシ酸、ポリグリコール酸およびそのコポリマー、ポリオルトエスエル、ポリ無水物、およびポリホスファジン、ならびに天然ポリマー、例えば、コラーゲン、ポリアミノ酸、アルブミン、および他のタンパク質、アルギン酸および他のポリサッカリド、ならびにこれらの組み合わせ ( 米国特許第 5 , 8 1 4 , 5 9 9 号明細書 ) から作製される微粒子が含まれる。

10

#### 【 0 1 6 8 】

##### 長期的な投与および製剤

本発明の化合物を、長期間の間、例えば、単回投与から 1 週間から 1 年間までの期間の間、被験体に到達することが時折所望され得る。様々な遅延放出、デポー、または移植剤形が利用できる。例えば、剤形は、体液中で低い程度の溶解性を有する化合物の薬学的に受容可能な非毒性塩を含有することができ、例えば、( a ) 多塩基酸との酸付加塩、例えば、リン酸、硫酸、クエン酸、酒石酸、タンニン酸、パモン酸、アルギン酸、ポリグルタミン酸、ナフタレンモノ - またジ - スルホン酸、ポリガラクトuron酸など ; ( b ) 多価金属カチオンとの塩、例えば、亜鉛、カルシウム、ビスマス、バリウム、マグネシウム、アルミニウム、銅、コバルト、ニッケル、カドミウムなど、または、例えば、 - ジベンジル - エチレンジアミンまたはエチレンジアミンから形成される有機カチオンとの塩 ; または ( c ) ( a ) および ( b ) の組み合わせ、例えば、タンニン酸亜鉛である。加えて、本発明の化合物、または、好ましくは、比較的不溶性の塩、例えば、ちょうど記載されたものは、ゲル、例えば、モノステアリン酸アルミニウムゲル中で、例えば、注射のために適切なゴマ油とともに製剤できる。特に好ましい塩は、亜鉛塩、タンニン酸亜鉛塩、パモン酸塩などである。注射用の別の型の遅延放出デポー製剤は、例えば米国特許第 3 , 7 7 3 , 9 1 9 号明細書、に記載されるような、ポリ乳酸 / ポリグリコール酸ポリマーなどのゆっくりと分解する非毒性非抗原性ポリマー中にカプセル化されるように分散された化合物または塩を含有する。上記に記載されたものなどの化合物、または好ましくは、比較的不溶性の塩はまた、特に、動物中での使用のために、コレステロールマトリックスシラスティックペレット中で製剤できる。さらなる遅延放出、デポー、または移植剤製剤、例えば、ガスまたは液体リボソームは、文献中で公知である ( 米国特許第 5 , 7 7 0 , 2 2 2 号明細書および「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems」, J . R . Robinson e d . , Marcel Dekker , Inc . , N . Y . , 1 9 7 8 ) 。

20

30

40

#### 【 0 1 6 9 】

##### 略語

B S A - ウシ血清アルブミン

E I A - エンザイムイムノアッセイ

F B S - ウシ胎仔血清

H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - 過酸化水素

H R P - 西洋ワサビペルオキシダーゼ

I g - 免疫グロブリン

C D 2 2 - I C D 2 2

50

I P - 腹腔内  
 I V - 静脈内  
 M a b - モノクローナル抗体  
 O D - 光学密度  
 O P D - o - フェニレンジアミン二塩酸塩  
 P E G - ポリエチレングリコール  
 P S A - ペニシリン、ストレプトマイシン、アムホテリシン  
 R T - 室温  
 S Q - 皮下  
 v / v - 体積あたり体積  
 w / v - 体積あたり重量

10

# 【実施例 1】

## 【0170】

### 実施例 1 . 親和性および定量 E L I S A

N u n c - I m m u n o M a x i S o r p 96 ウェルプレートは、コーティング溶  
 液 ( P B S 中炭酸水素ナトリウム ) 中、 $100\mu\text{l}$  の  $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ 、  
 $0.02\mu\text{g}/\text{ml}$  または  $0.002\mu\text{g}/\text{ml}$  組換え C D 2 2 細胞外ドメイン ( P e p  
 r o T e c h , I n c . カタログ番号 100 - 01 ) でコートされた。プレートはプレ  
 ートシーラーで覆われ、4 で一晩インキュベートされた。プレートは空にされ、残りの液  
 体はペーパータオルにたたいて落とされた。  $200\mu\text{l}$  洗浄溶液 ( P B S 中  $0.05\%$   
 T w e e n - 20 ) が加えられ、室温で 5 分間、 $200\text{RPM}$  にて振盪された。プレート  
 は空にされ、残りの液体はペーパータオルにたたいて落とされた。  $200\mu\text{l}$  のブロッ  
 キング溶液 ( P B S 中  $2\%$  C a r n a t i o n ミルク ) が加えられ、室温で 1 時間、 $200$   
 $\text{RPM}$  にて振盪された。プレートは空にされ、残りの液体はペーパータオルにたたいて落  
 とされた。 E L I S A のための抗体 V M 1000、V M 1001、V M 1002、V M 1  
 003、V M 1004、V M 1005、V M 1006、V M 1007、V M 1008、V  
 M 1009、V M 1010、V M 1011、V M 1012、V M 1013、V M 1014  
 、および V M 1015 を含有する  $100\mu\text{l}$  の希釈サンプルが使用された。サンプルは室  
 温で 1 時間の間、 $200\text{RPM}$  にて振盪され；プレートは空にされ、残りの液体はペー  
 ータオルにたたいて落とされた。  $200\mu\text{l}$  洗浄溶液 ( P B S 中  $0.05\%$  T w e e n -  
 20 ) が加えられ、室温で 5 分間、 $200\text{RPM}$  にて振盪された；プレートは空にされ、  
 残りの液体はペーパータオルにたたいて落とされた。このプロセスは 3 回反復された。ブ  
 ロック溶液 ( P B S 中  $2\%$  C a r n a t i o n ミルク ) 中で希釈された H R P で結合体化  
 された抗ヒト I g G の  $1:2500$  希釈の  $100\mu\text{l}$  がすべてのサンプルに加えられた。  
 ブロック溶液 ( P B S 中  $2\%$  C a r n a t i o n ミルク ) 中で希釈された H R P で結合体  
 化された抗ウサギ I g G の  $1:2500$  希釈の  $100\mu\text{l}$  が対照抗体に加えられた。内容  
 物は室温で 1 時間の間、 $200\text{RPM}$  にて振盪され；プレートは空にされ、残りの液体は  
 ペーパータオルにたたいて落とされた。  $200\mu\text{l}$  洗浄溶液 ( P B S 中  $0.05\%$  T w e e n -  
 20 ) が加えられ、室温で 5 分間、 $200\text{RPM}$  にて振盪された；プレートは空に  
 され、残りの液体はペーパータオルにたたいて落とされた。このプロセスは 3 回反復され  
 た。  $100\mu\text{l}$  T M B 気質溶液が加えられ、室温でインキュベートされた。反応は  $1\text{N}$   
 H C l で停止され、プレートは  $450\text{nm}$  にて読み取られ、相対的な結合親和性を決定  
 した ( 図 17 )。

20

30

40

# 【実施例 2】

## 【0171】

### 定量 E L I S A

### 実施例 2 . C H O - S 細胞トランスフェクション

トランスフェクションの 1 週間前に、C H O - S 細胞 ( I n v i t r o g e n ) が、血  
 清を補充したダルベッコ改変イーグル培地 ( D - M E M ) ( I n v i t r o g e n ) 中の  
 単層に移された。トランスフェクションの 1 日前に、細胞は、96 ウェル形式で、トラン

50

スフェクションサンプルあたり、血清を補充したD-MEMの100 $\mu$ L中0.4 $\times$ 10<sup>5</sup>細胞でプレATINGされる。各トランスフェクションサンプルについて、DNA-リポフェクタミン複合体を調製する。25 $\mu$ L Opti-MEM血清減少培地中で0.25 $\mu$ g DNAを希釈し、穏やかに混合し、そして室温で5分間インキュベートする。0.5 $\mu$ L リポフェクタミン2000 (Invitrogen)を25 $\mu$ L Opti-MEM血清減少培地中で希釈する。穏やかに混合し、そして室温で5分間インキュベートする。希釈したDNAを希釈したリポフェクタミンと合わせる。穏やかに混合し、そして室温で20分間インキュベートする。細胞および培地を含有している各ウェルに、50 $\mu$ L DNA-リポフェクタミン複合体を加える。プレートを揺ることによって穏やかに混合する。5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で、37Cで一晩、細胞をインキュベートする。各ウェルの培地を吸引する。各ウェルに、血清を補充したD-MEM 100 $\mu$ Lを加える。ELISAのために上清を収集し、 $\alpha$ -ガラクトシダーゼアッセイのために細胞溶解物を収集する。

10

### 【実施例3】

#### 【0172】

##### 実施例3.細胞培養上清からの抗体精製

以下の緩衝液が標準様式で調製された。結合緩衝液10mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH7.0。溶出緩衝液:12.5mMクエン酸、pH2.7(Na<sub>3</sub>-クエン酸を使用)。噴霧緩衝液:0.5M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH8.0。20%エタノールおよび水。すべての緩衝液は使用前にろ過された(0.45 $\mu$ m)。上清は、HiTrap(商標)プロテインG Sepharose HP(1mL体積)カラムを装着したAKTA(商標)FPLC(商標)システムを使用して精製された。サンプルローディングのために、ローディングチューブがエタノール(20mL、5mL/分)、次いで、結合緩衝液(20mL、5mL/分)ですすぎれた。プロテインGカラムはシステムに装着され、結合緩衝液(10mL、1mL/分)ですすぎれた。サンプルは1mL/分若しくはそれ以下でローディングされる(一晩ローディングのため)。ローディング後、カラムは取り外され、ローディングチューブは水(20mL、5mL/分)で、次いで、20%エタノール(20mL、5mL/分)ですすぎれる。抗体精製のために、AKTAシステムは結合緩衝液で洗浄される(ポンプAおよびすべてのチューピング)。収集チューブは各チューブに50 $\mu$ L中和緩衝液を加えることによるフラクション収集のために準備されている。プロテインGカラムはこのシステムに接続された。流速は1mL/分に設定され、ベースラインが安定するまで実行した。カラムバルブはポジション3に切り換えられた。カラムは、ベースラインに達するまで、結合緩衝液(最小限10mL)で洗浄された。ポンプは停止され、水で洗浄され、次いで溶出緩衝液で洗浄された。流速は1mL/分に設定され、ベースラインが安定するまで実行した。カラムバルブはポジション3に切り換えられ、フラクションコレクターが開始された(0.5mLフラクション)。フラクションはベースラインに達するまで収集され、その時点で、システムは停止された。溶出プロフィールがクリップボードおよびWORD文書にコピーされた。ポンプは水で洗浄され;次いで結合緩衝液で洗浄された。プロテインGカラムは結合緩衝液(10mL)で洗浄された。ポンプは20%エタノールで洗浄された。カラムは20%エタノール(20mL)で洗浄され、低温室に保存された。

20

30

40

#### 【0173】

抗体は、滅菌1 $\times$ PBS、pH7.4、0.02%アジ化ナトリウム、10mg/mL BSA中で再構成された。抗原は、0.5mg、1mg、0.5mg、および0.5mgの4つの別々のバイアル中のCD22(21,000kDa)であり、滅菌1 $\times$ PBS、pH7.4、0.02%アジ化ナトリウム中で、375 $\mu$ g/mL、1mg/mL、500 $\mu$ g/mL、および500 $\mu$ g/mLに希釈された。標識、Cy5-結合体化AffiniPureヤギ抗ヒトIgG(H+L)、Cy5、1.5 $\mu$ g/mLは、Jackson ImmunoResearch(West Grove, PA)から購入された。標識は、滅菌1 $\times$ PBS、pH7.4、0.02%アジ化ナトリウム中で再構成され、0

50

．500mg/mLに希釈された。実行緩衝液は、滅菌1×PBS、pH7.4、0.02%アジ化ナトリウムであった。サンプル緩衝液は、滅菌1×PBS、pH7.4、0.02%アジ化ナトリウム、1mg/mLウシ血清アルブミン(BSA)であった。PMMABーズ(Part#440197/Lot3257)は、Sapidyne Instruments、Inc.(Boise, ID)によって提供され、以下の様式で捕捉試薬でコートされた。ビーズは200mg部分の乾燥アリコートとされ、1mLコーティング溶液(実行緩衝液中30ug/mL BAP001)中で2時間揺すられた。次いで、ビーズはブロッキング溶液(実行緩衝液中10mg/mL BSA)中で1時間揺すられ、4 で保存された。

#### 【0174】

平衡分析のために、CD22でコートされたPMMABーズは、平衡している受容体(抗CD22抗体)のサンプルとリガンド(抗原; CD22)から遊離の受容体の部分を捕捉するために使用された。各データ点について、リガンドコートされたビーズの新鮮なカラムがフローセルに導入された。平衡サンプルはカラムを過ぎて急速に引き出されて、固定化されたリガンドとの接触時間を最小化した。このことは、固定化されたリガンドとの接触時間が、サンプル平衡を破壊しないことを確実にした。従って、固定化されたリガンドは、溶液中の遊離の受容体を捕捉するためのプローブとして作用した。捕捉された抗体は、蛍光標識された抗ヒト二次抗体を用いて検出された。結合しない試薬は洗浄で除かれ、シグナルを放出し、これは平衡サンプル中での遊離の受容体に比例している。蛍光は電圧に変換され、これは、平衡サンプル中の遊離の受容体(抗体)の量に直接比例している。高濃度受容体と低濃度受容体の両方で実験が実行され、次いで、最適な結果のために、n-曲線分析において一緒に利用された。反応速度論的分析の直接方法のために、同じ固定化リガンド(CD22コートされたPMMAB)が、平衡実験と同様に、反応速度論実験のための捕捉試薬として使用された。サンプル中の遊離の受容体(抗体)の量は、前平衡で測定され、これは、サンプルが平衡に向かって動くときに、経時的に遊離の受容体(抗体)の減少をモニターするデータ点を生じる。図33は、抗IL6抗体BAP001-クローン1~BAP001-クローン10について、BA003(CNT0136)と比較した、上位10ヒットのSapidyne分析からのデータの表を示す。

#### 【実施例4】

#### 【0175】

実施例4．本発明の抗CD22抗体の組換えCD22細胞外ドメインへの親和性定数の表面プラズモン共鳴決定

BIAcore 3000, GE Healthcareは、結合曲線および反応速度論パラメーターを決定するために使用された。抗ヒトFc(1.8mg/mL)がNaOAc緩衝液(10mM、pH4.8)中で50ug/mLの濃度に希釈され、BIAcoreシステムマニュアルに記載されているように、製造業者のアミンカップリング化学を使用して、CM-5センサーチップのカルボキシメチル化デキストランマトリックスにカップリングされた。10000RUに向けられた表面準備ウィザードを使用して、センサー表面上のカルボキシル基がNHSEDCで最初に活性化され、続いて、抗ヒトFcの付加を行った。残りの活性化基は、1Mエタノールアミンの注入によってブロックされた。各々のフローセルは個別にカップリングされた。これらの条件を利用して、抗ヒトFcの7554-9571 RUを含有する4つのフローセル表面が調製された。予備実験において、3回の注入(15uL、30uL/分)100mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>/0.05%CHAPSが結合した免疫グロブリンを効率的に除去し、固定化された抗ヒトFcの結合能力を保存することが決定された。

#### 【0176】

実験は、BIAcore 3000上で、25 および30uL/分の流速で実施された。抗体候補は、HBS(10mM HEPES with 0.15M NaCl、3.4mM EDTA、および0.05%界面活性剤P20、pH7.4)中に5ug/mLで溶解された。分析物、CD22は、0.25、0.125、0.062、0.031

10

20

30

40

50

、および  $0.015 \text{ ug/ml}$  で HBS に溶解された。  $3 \times 30 \text{ ul}$  の  $5 \text{ ug/ml}$  の抗体 BA001 が、そのそれぞれのフローセル上に流され、続いて、  $30 \text{ ul/分}$  で  $240 \text{ ul}$  の各 CD22 濃度の注入（結合フェーズ）、中断しない  $1200$  秒間の緩衝液流（解離フェーズ）を行った。チップの表面は、各  $15 \text{ ul}$  の  $100 \text{ mM H}_3\text{PO}_4 / 0.05\%$  CHAPS の 3 回の逐次的注入によって再生された。HBS の注入は、分析のためのバルク屈折率の減算のための参照（ブランクセンソグラム）として役立つ。BIAevaluation 4.1 の 1:1 モデルを使用して、両方のローカルフィットおよびグローバルフィットが解離 ( $k_d$ 、 $[\text{s}^{-1}]$ ) と結合 ( $k_a$ 、 $[\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}]$ ) の両方について行われ、解離定数 ( $K_D$ 、 $[\text{M}]$ ) が計算された ( $k_d / k_a$ )。

【0177】

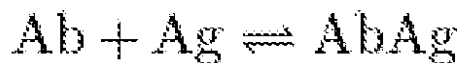
10

分析は BIAevaluation バージョン 3.0 を使用して行われた。反応速度論定数は、実験曲線を、相互作用メカニズムのモデルから誘導された速度式にフィットさせることによってセンソグラムデータから誘導された。ローカル RUm ax フィット、 $k_a$ 、 $k_d$ 、および  $K_D$  とともに 1:1 結合モデルを使用するグローバル分析が決定された。

【0178】

以下の式が利用された：

【数 1】



20

$$K_a = \frac{[\text{AbAg}]}{[\text{Ab}][\text{Ag}]} = \frac{1}{K_d}$$

【0179】

親和性成熟前のヒト化抗 CD22 モノクローナル抗体のための Biacore データは、図 18 に示される (BA006G)。BA600G 親和性成熟および引き続くヒト化の後に、選択されたクローンが、図 18 に示されるように、Biacore 分析によって試験された。

30

【実施例 5】

【0180】

実施例 5 . 抗 CD22 選択された抗 CD22 抗体は、リンパ腫細胞系統において発現された細胞表面 CD22 に結合し、内在化を誘導する

CD22 タンパク質は、David、RAMOS、および RAJI B 細胞系統 (B cell lines) を含む、発生している B 細胞および大部分のヒト非ホジキンリンパ腫系統において発現されていることが示されてきた (Knowles D.M., Chadburn A., Inghirami G. Immunophenotypic markers useful in the diagnosis and classification of hematopoietic neoplasms Knowles D.M. eds. Neoplastic Hematopathology, 73-95, Williams & Wilkins Baltimore 1992)。健常個体および非ホジキンリンパ腫 (NHL) を有する患者からの B 細胞系統または一次 B 細胞への抗 CD22 抗体の結合は、CD22 / 抗体複合体の迅速な内在化を生じる。内在化は、一次 B 細胞および NHL 患者由来 B 細胞よりも細胞系統の早い時点においてより速いようであるが、しかし、到達した最大内在化は、処理の数時間後、すべての B 細胞集団について比較できるものであり、より高い抗体濃度において飽和に達するようである。

40

【0181】

50

本発明において選択される抗CD22モノクローナル抗体、本発明のクローンVM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015は、蛍光活性化セルソーティング分析によって決定されるように、Daudi、RAMOS、およびRAJIBリンパ腫細胞系統において、細胞表面発現されたCD22を結合するそれらの能力について試験された。細胞培養は、分析の前に、10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI 1640培地中で対数増殖期で維持された。抗CD22発現レベルは、フィコエリトリン(PE)に結合体化された市販の抗CD22抗体(Becton Dickinson, catalog number 340708)を使用して、ELISAおよびFACS分析によって決定された。ベースライン(baseline)表面発現について、 $1 \times 10^6$  Daudi細胞(例えば)は、2%FBSおよび12  $\mu\text{g}/\text{ul}$  抗CD22-PE結合体を含有するPBSとともに氷上(once)で45分間インキュベートし、次いで、氷冷PBS-FBS溶液で洗浄された。次いで、細胞は、標準的な手順を使用してFACSによって分析され、標的細胞集団における表面結合を定量した。

10

20

30

#### 【0182】

並行して、Daudi細胞、 $1 \times 10^6$ は、PBS-FBS溶液中の同様の濃度の選択された本発明の抗CD22 MabクローンVM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015で、37°Cで20時間処理されて、結合および内在化を可能にした。この期間後、細胞は洗浄され、次いで、氷上のPBS-FBS溶液中の12  $\mu\text{g}/\text{ml}$  抗CD22-PE結合体に曝露された。これらの条件(conditions)下で、残りの表面CD22は、上記のようなFACS分析を使用して検出および定量される。本発明の抗CD22抗体の典型的な結果は図19Aに示される。20時間の曝露後、より低い検出のレベルを示す、蛍光集団の左へのシフトとして測定される表面CD22発現の減少が存在する。CD22表面発現の相対量の減少は、2つの集団の割当量として表現できる。37°Cで20時間の曝露の間にCD22受容体を内在化する能力についての、抗CD22抗体のパネルの評価の結果が図19Bに示され、これは、前の曝露後の抗CD22-PE結合体のパーセンテージシフトによって決定される。CD22発現の変化のスペクトルは、CD22ポジティブ集団の左へのシフトによって可視化されたものとして検出される。内在化の程度の定量は図20に示される。個々の抗CD22クローン、本発明の選択された抗CD22 MabクローンVM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015は、上記のように分析され、CD22内在化の想定の程度は、抗体曝露後のベースラインを超えた集団の中のパーセントシフトとして表現された。

#### 【実施例6】

#### 【0183】

実施例6. リンパ腫細胞系統における定量的共焦点免疫蛍光顕微鏡法による本発明の抗CD22抗体の迅速な内在化の測定。

#### 【0184】

Daudi細胞は、10%FBAを含有するRPMI 1640培地中での37°Cでの対数増殖の条件下で維持され、次いで、分析のために収穫された。選択された本発明の抗CD22 MabクローンVM1000、VM1001、VM1002、VM1003、VM1004、VM1005、VM1006、VM1007、VM1008、VM1009、VM1010、VM1011、VM1012、VM1013、VM1014、およびVM1015は、製造業者の推奨する手順を使用して、Zenon標識複合体(Molecular Probes)を使用して、FITCに直接結合体化された。約 $1 \times 10^6$

50

7 D a u d i 細胞は、5 u g / m l 標識抗 C D 2 2 抗体を含有する P B S 中に再懸濁され、氷上で 4 5 分間インキュベートされた。次いで、細胞は、0 C の P B S - F B S 溶液で 2 回洗浄された。次いで、細胞は、3 7 C にて、様々な期間の間、1 0 % F B S を含有する R P M I 1 6 4 0 培地中でインキュベートされ、収穫され、そして 0 C の P B S で洗浄された。次いで、細胞は、室温で 5 分間、4 % パラホルムアルデヒド中で手短に固定され、次いで、0 . 0 5 % T r i t o n X - 1 0 0 を含有する P B S 中で洗浄した。細胞ペレットは遠心分離により収集され、最小量の P B S ニート中に再懸濁され、次いで顕微鏡用ガラスプレートに適用された。分析の前に、スライドは、核染色 D A P I を含有するマウント溶液で処理され、次いで、カバースリップが適用された。共焦点画像は、A C A S U l t i m a 共焦点顕微鏡 ( M e r i d i a n I n s t r u m e n t s , I n c . , O k e m o s , M I ) を使用して記録され、1 0 0 x 油浸対物レンズを使用して、焦点面の中心を通して 1 μ m 切片を表示した。

10

#### 【 0 1 8 5 】

抗 C D 2 2 モノクローナル抗体、選択された本発明のクローン V M 1 0 0 0 、 V M 1 0 0 1 、 V M 1 0 0 2 、 V M 1 0 0 3 、 V M 1 0 0 4 、 V M 1 0 0 5 、 V M 1 0 0 6 、 V M 1 0 0 7 、 V M 1 0 0 8 、 V M 1 0 0 9 、 V M 1 0 1 0 、 V M 1 0 1 1 、 V M 1 0 1 2 、 V M 1 0 1 3 、 V M 1 0 1 4 、 および V M 1 0 1 5 は、細胞内エンドサイトーシス区画に対する細胞表面上の免疫蛍光シグナルによって判断されるように、細胞内区画への迅速な内在化されるそれらの能力について分析された。本発明の抗体は、マウスモノクローナル抗体 L L 2 のヒト化バージョンである B A 0 0 6 H と比較された。この例、図 2 1 A において、本発明の抗 C D 2 2 抗体は、相対平均蛍光 ( R M F ) によって判断されるように、B A 0 0 6 H と比較して約 2 0 倍 D a u d i 細胞の表面上に発現された C D 2 2 タンパク質に結合し、そして 9 0 分以内に、実質的に完全に細胞内に内在化され、核周辺ゴルジ装置および付随するリソソームの中に優先的に局在する。本発明の個々の抗 C D 2 2 抗体について、この様式で得られた R M F 表面結合値のチャートが図 2 1 B に示される。

20

#### 【 実施例 7 】

#### 【 0 1 8 6 】

実施例 7 . 抗 C D 2 2 モノクローナル抗体、選択された本発明のクローン V M 1 0 0 0 、 V M 1 0 0 1 、 V M 1 0 0 2 、 V M 1 0 0 3 、 V M 1 0 0 4 、 V M 1 0 0 5 、 V M 1 0 0 6 、 V M 1 0 0 7 、 V M 1 0 0 8 、 V M 1 0 0 9 、 V M 1 0 1 0 、 V M 1 0 1 1 、 V M 1 0 1 2 、 V M 1 0 1 3 、 V M 1 0 1 4 、 および V M 1 0 1 5 で処理後の C D 2 2 ポジティブリンパ腫細胞系統の C D 2 2 チロシンリン酸化の刺激。抗 C D 2 2 抗体は、C D 2 2 を発現する細胞に結合し、受容体の細胞質領域のチロシンリン酸化を刺激することが以前に示されてきた ( C a r n a h a n e t a l , C l i n C a n c e r R e s S e p t e m b e r 1 , 2 0 0 3 9 ; 3 9 8 2 s ) 。抗 C D 2 2 抗体のこの生物活性は、リンパ腫細胞の増殖の減少および細胞死の誘導を生じる B C R シグナル伝達複合体のネガティブ調節と関連付けられてきた。従って、選択された抗 C D 2 2 抗体は、受容体を発現する細胞系統への曝露の際に C D 2 2 チロシンリン酸化を刺激するそれらの能力について分析された。D a u d i 細胞は、収穫および抗 C D 2 2 抗体を用いる処理の前に、1 0 % F B S を含有する R P M I 1 6 4 0 中で培養することによって対数増殖に維持された。次いで、処理された細胞は界面活性剤緩衝液で溶解され、C D 2 2 は抗 C D 2 2 B A 0 0 6 H を使用して免疫沈殿され、次いで、S D S - P A G E およびウェスタンブロット分析に供された。次いで、得られたプロットは、抗ホスホチロシン抗体 ( 4 G 1 0 ) またはウサギポリクローナル抗 C D 2 2 抗体 ( S a n t a C r u z , C a t a l o g n u m b e r S C - 7 9 3 2 でプローブされた。図 2 2 A および B は、これらの分析の結果を示す。チロシンリン酸化 C D 2 2 タンパク質対総 C D 2 2 の比率は、各抗体処理の下に示される。対照として、D a u d i 細胞が、抗 I g M 抗体で処理され、C D 2 2 細胞質ドメインをトランスリン酸化する潜在能力を飽和させるための手段として、B 細胞受容体複合体を関与させかつ刺激する。

30

40

#### 【 実施例 8 】

50



## 【 0 1 8 7 】

実施例 8 . 交差反応性。表面タンパク質 C D 2 2 は、B 細胞系統から誘導されたリンパ腫および白血病細胞上で B 細胞を発生させる表面上で発現されることが知られている。本発明の抗 C D 2 2 抗体は、マウスおよび齧歯類 B 細胞上で発現される C D 2 2 と交差反応する能力について評価された。結果は、齧歯類型のタンパク質に対する結合は認められないことを示す。本発明の抗 C D 2 2 抗体はまた、霊長類種、カニクイザル マカクザル ( *Macaca fascicularis* ) に対する交差反応性についても評価された。カニクイザル マカクザル ( 供給源 *Primate Biologicals, Inc.* , *Bethesda, MD* ) から単離された末梢血リンパ球 ( *PBMC* ) ( C D 2 2 陽性 B 細胞で富化されている ) が分析された。本発明の抗 C D 2 2 抗体 ( 本明細書中のデータにおいて「*VM101*」と称する抗 C D 2 2 抗体 ) は蛍光分子フィコエリトリン ( *PE* ) で直接標識された。陽性染色を試験するために、各試験条件について約  $2.5 \times 10^6$  *PBMC* が *PBS* 中で洗浄され、次いで、10 % ウシ胎仔血清 ( *FBS* ) を含有する *PBS* 中に再懸濁された。次いで、細胞は、抗体なし、抗 C D 2 2 *PE* 標識抗体 (  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$  )、またはカニクイザル C D 2 0 と交差反応性を示した抗ヒト C D 2 0 - *FITC* 結合体化抗体 ( *Miltenyl Biotech, catalog number 130-091-108*、ストック試薬の 1 : 10 希釈 ) のいずれかに曝露され、次いで、0 °C で 60 分間インキュベートされた。各試験条件の細胞は *PBS* 中で洗浄され、次いで、*PBS* 中 4 % ホルムアルデヒドを用いて、室温で 10 分間固定された。次いで、細胞は、2 % *FBS* を含有する 0 . 5 ml *PBS* に再懸濁され、次いで、蛍光活性化セルソーティング ( *FACS* ) 分析によって C D 2 2 および C D 2 0 表面染色について分析された ( 図 1 )。抗体で処理されなかった細胞は、*FITC* または *PE* のいずれのチャンネルでも蛍光強度の見かけのシフトを有さなかったのに対して ( 図 1 A )、*VM101-PE* で染色された細胞は C D 2 2 ポジティブ集団を含んだ ( 図 1 B )。同様に、抗 C D 2 0 - *FITC* で染色された細胞は、C D 2 0 ポジティブ集団を含んだ ( 図 1 C )。*VM101-PE* 抗体と C D 2 0 - *FITC* 抗体の両方で染色された細胞は、*PBMC* 中の両方の抗原の発現パターンに基づいて予測されるように、二重標識集団を有した ( 図 1 D )。*VM101* は、特異的に、カニクイザル C D 2 2 タンパク質を認識する。

10

20

## 【 実施例 9 】

## 【 0 1 8 8 】

実施例 9 . 抗 C D 2 2 抗体の相対的発現。本発明の抗 C D 2 2 抗体は、哺乳動物細胞中で発現され、臨床的研究のための材料を産生するための製造プロセスにおける高いレベルの産生と一貫している特性をこれらが有しているか否かを決定した。本発明の抗 C D 2 2 抗体 ( 抗体 1、抗体 2、および抗体 3 ) の発現は、対照抗体 ( 「対照」 )、ヒト化 C D 2 2 抗体と比較された。各 C D 2 2 抗体を発現する得られた細胞は、哺乳動物細胞培養条件において等価な期間の間培養され、馴化培地が、モノクローナル抗体の存在および収率について試験された。結果は、これらの条件の間に高レベルで発現される市販の抗体 ( *トラスツズマブ*、*ハーセプチン* としても知られる ) と比較され、これは比較対照として役立った。表 1 は、これらの条件下での発現および製造性のためのこの試験の結果を示す。

30

【図 1】

配列ID番号: 1  
VM1001 LC  
GAAATTTGGTTTGACACAGHCTCCAGCCACCTTGCTTTGGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCC  
TGC AAGHCTCAGTCAAGHGTITATACAGTGCAGTGGAGAGAACTACTTGGCTTGGTATCAGCA  
GAAACCTGGGCAAGCTTCTAAGCTCTTGATCTATTTGGGCTATCTAGGGAAAGGGGGTCTCTAT  
CAAGGTTCACTGAGTGGAGTGGATCTGGAGAGATTTTACTTTTCACCTACAGCACTTGCAGCTTGAA  
GATATTCACACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCTGGGAGCTTCGGCTAAGGG

配列ID番号: 17  
VM1001 LC  
EIVLTQSPATHLSIPGERATHSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPRIIYWASTRIRGVPSPRIS  
GSGSGTDFTHIHSRLPEDEFAVYYCKQYLSNWITGQG

配列ID番号: 33  
VM1001 HC  
CAGGTTCAAGCTGGTGCAGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTCTGGGGCTCAGTGAAGGCTCTCTG  
CAAGGCTTCTGGCTACGTTTATCTAGCTACTGGCTGCACCTGGATCAGGCAGTCTCCATCAGAGGG  
CTTTGAGTGGCTGGGTTACATTAAATCTAGGAAATGATTAATCTGAGTACAACTGGATTTTCAAGGG  
GAGATCTACCACTCAAGGCAACCTCAAAACCTAGGTTGCTTACCAAGGCTCACTGGGCT  
CTGTGACACAGCTCAGTATATCTTGTGCAAGAAGGGGGATTACTACGTTCTACTGGGGCTAGGGA

配列ID番号: 49  
VM1001 HC  
QVQLVQSGALEYKKPGASVKVSCKASGYVETSYWLIHWIRQSPSRGLWLGYNPRNDYTEYNRIKGR  
LTSKDTSKNQVVLMTNSMDPVDIATYYCARRGTHFWYWGQG

FIGURE 1

【図 2】

配列ID番号: 2  
VM1001 LC  
GAAATTTGGTTTGACACAGHCTCCAGCTACCTTGCTTTGGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCC  
TGC AAGHCTCAGTCAAGHGTITATACAGTGCAGTGGAGAGAACTACTTGGCTTGGTATCAGCA  
GAAACCTGGGCAAGCTTCTAAGCTCTTGATCTATTTGGGCTATCTAGGGAAAGGGGGTCTCTAT  
CAAGGTTCACTGAGTGGAGTGGATCTGGAGAGATTTTACTTTTCACCTACAGCACTTGCAGCTTGAA  
GATATTCACACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCTGGGAGCTTCGGCTAAGGG

配列ID番号: 18  
VM1001 LC  
EIVLTQSPATHLSIPGERATHSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRIIYWASTRIRGHPDRIS  
GSGSGTDFTHIHSRLPEDEFAVYYCKQYLSNWITGQG

配列ID番号: 34  
VM1001 HC  
CAGGTTCAAGCTGGTGCAGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTCTGGGGCTCAGTGAAGGCTCTCTG  
CAAGGCTTCTGGCTACGTTTATCTAGCTACTGGCTGCACCTGGATCAGGCAGTCTCCATCAGAGGG  
CTTTGAGTGGCTGGGTTACATTAAATCTAGGAAATGATTAATCTGAGTACAACTGGATTTTCAAGGG  
GAGATCTACCACTCAAGGCAACCTCAAAACCTAGGTTGCTTACCAAGGCTCACTGGGCT  
CTGTGACACAGCTCAGTATATCTTGTGCAAGAAGGGGGATTACTACGTTCTACTGGGGCTAGGGA

配列ID番号: 50  
VM1001 HC  
QVQLVQSGALEYKKPGASVKVSCKASGYVETSYWLIHWIRQSPSRGLWLGYNPRNDYTEYNRIKGR  
LTSKDTSKNQVVLMTNSMDPVDIATYYCARRGTHFWYWGQG

FIGURE 2

【図 3】

配列ID番号: 3  
VM1002 LC  
GAAATTTGGTTTGACACAGHCTCCAGCTACCTTGCTTTGGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCC  
TGC AAGHCTCAGTCAAGHGTITATACAGTGCAGTGGAGAGAACTACTTGGCTTGGTATCAGCA  
GAAACCTGGGCAAGCTTCTAAGCTCTTGATCTATTTGGGCTATCTAGGGAAAGGGGGTCTCTAT  
CAAGGTTCACTGAGTGGAGTGGATCTGGAGAGATTTTACTTTTCACCTACAGCACTTGCAGCTTGAA  
GATATTCACACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCTGGGAGCTTCGGCTAAGGG

配列ID番号: 19  
VM1002 LC  
EIVLTQSPATHLSIPGERATHSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPRIIYWASTRIRGHPDRIS  
GSGSGTDFTHIHSRLPEDEFAVYYCKQYLSNWITGQG

配列ID番号: 35  
VM1002 HC  
GAGGTTCAAGCTGGTGCAGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTCTGGGGCTCAGTGAAGGCTCTCTG  
TAAGGCTTCTGGCTACGTTTATCTAGCTACTGGCTGCACCTGGATCAGGCAGTCTCCATCAGAGGG  
CTTTGAGTGGCTGGGTTACATTAAATCTAGGAAATGATTAATCTGAGTACAACTGGATTTTCAAGGG  
GAGATCTACCACTCAAGGCAACCTCAAAACCTAGGTTGCTTACCAAGGCTCACTGGGCT  
CTGTGACACAGCTCAGTATATCTTGTGCAAGAAGGGGGATTACTACGTTCTACTGGGGCTAGGGA

配列ID番号: 51  
VM1002 HC  
EVQLVQSGALEYKKPGASVKVSCKASGYVETSYWLIHWIRQSPSRGLWLGYNPRNDYTEYNRIKGR  
VITADKSTNTAYMHSHSRISDFAVYYCARRGTHFWYWGQG

FIGURE 3

【図 4】

配列ID番号: 4  
VM1003 LC  
GAAATTTGGTTTGACACAGHCTCCAGCTACCTTGCTTTGGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCC  
TGC AAGHCTCAGTCAAGHGTITATACAGTGCAGTGGAGAGAACTACTTGGCTTGGTATCAGCA  
GAAACCTGGGCAAGCTTCTAAGCTCTTGATCTATTTGGGCTATCTAGGGAAAGGGGGTCTCTAT  
CAAGGTTCACTGAGTGGAGTGGATCTGGAGAGATTTTACTTTTCACCTACAGCACTTGCAGCTTGAA  
GATATTCACACATATTACTGTAAGCAATACCTCTCTCTGGGAGCTTCGGCTAAGGG

配列ID番号: 20  
VM1003 LC  
EIVLTQSPATHLSIPGERATHSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGKAPRIIYWASTRIRGHPDRIS  
GSGSGTDFTHIHSRLPEDEFAVYYCKQYLSNWITGQG

配列ID番号: 36  
VM1003 HC  
GAGGTTCAAGCTGGTGCAGCTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTCTGGGGCTCAGTGAAGGCTCTCTG  
CAAGGCTTCTGGCTACGTTTATCTAGCTACTGGCTGCACCTGGATCAGGCAGTCTCCATCAGAGGG  
CTTTGAGTGGCTGGGTTACATTAAATCTAGGAAATGATTAATCTGAGTACAACTGGATTTTCAAGGG  
GAGATCTACCACTCAAGGCAACCTCAAAACCTAGGTTGCTTACCAAGGCTCACTGGGCT  
CTGTGACACAGCTCAGTATATCTTGTGCAAGAAGGGGGATTACTACGTTCTACTGGGGCTAGGGA

配列ID番号: 52  
VM1003 HC  
EVQLVQSGALEYKKPGATVKISKVSGYVETSYWLIHWIRQSPSRGLWLGYNPRNDYTEYNRIKGRF  
VSLSDVSTAYLQISLKALDFAVYYCARRGTHFWYWGQG

FIGURE 4

## 【 図 5 】

配列ID番号: 5  
VM1004 LC  
GAAATGTGTTGACACAGCTCCAGCCACCTTGCTTTGTGTCCTCAGGGGAAAGAGCCACCTC TCC  
TGCAAGTCCAGTCAAAAGTGTTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAATCTACTTGACCTGGTATCAGCA  
GAAACCAGGGAAAGTCTCTAAGCTCTGATCTATTTGGGATCTCACTAGGGGAAAGGGGATCTCAG  
ACAGGTTCAAGTGGCAAGTGGGTCTGGGACAGACTTCCTCTCCACTCAGCAGACCTGGGCTCGAA  
GATTTTGACAGTGATATAC TGTAAAGCAATACCTCTCCCTCTGGACGTTCTGGCCAAAGGG

配列ID番号: 21  
VM1004 LC  
LIVLTQSPATLSLSPGLRAITLSCKSSQSVLYSAVERKLYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTIRRGHPDRIS  
GSGSGFDFTLTISRLPEDFAVYYCKQYLSSTFGQG

配列ID番号: 37  
VM1004 HC  
GAGGTCCAGCTGGTACAGCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCTTGGGCTTACAGTGAAGAAATCTCTG  
CAAGGTTTCTGGCTACGTTTCTTACTAGCTACTGGCTGGCACTGGATCAGGCAGTCCCCTCAGAGAGG  
CTCTGAGTGGCTGGGTTACATTAATCTCAGGAATGATTAATAC TGAATACAACTGAGATTTTCAAGGG  
GAGATTTTCTCTCTTGGACACTCTGTGACGACGGCATCTCTGAGATCTGAGCTTAAAGGCT  
TGAGGACACTGGCTGTGATATCTGTGCGAGAGGGGGATTAATAGTTCTACTTGGGCTCAGGGA

配列ID番号: 53  
VM1004 HC  
EVQLVQSGAIVKKPGATVKISKVSGYVFTSYWLIHWIRQSPSRGLEWLGYNPRNDYIETYNRIKGRF  
VLSLDTSVSTAYLQRI SLKALDITAVYYCARRGHTFTYWGGQ

FIGURE 5

## 【 図 6 】

配列ID番号: 6  
VM1005 LC  
GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTGTGCAITCTGAGGAGACAGAGTCACTCATCT  
TGCAAGTCCAGTCAAAAGTGTTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAATCTACTTGGCTTGGTACCAGCA  
GAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCC TCACTATTTGGGCACTCACTAGGGAAAGGGGGTCTCCAT  
CAAGGTTTCAAGCAGGAGTGGATCTGGAGCAGATTTCACTCTCCACTCACTAGCAGCTTGAAGCTTGA  
GATTTTGCAACTTATTAATCTGTAAGCAATACCTCTCTCTGTGGACGTTCTGGCCAAAGGG

配列ID番号: 22  
VM1005 LC  
ARQLTQSPSSLASVGDRTVITCKSSQSVLYSAVERKLYLAWYQQKPGAPRLLIYWASTIRRGVPSRPS  
GSGSGFDFTLTISRLQFEDATYYCKQYLSSTFGQG

配列ID番号: 38  
VM1005 HC  
GAGGHTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCTTGGGCTTACAGTGAAGAAATCTCTG  
CAGGGTTTCTGGTAAGTTTCTTACTAGCTACTGGCTTGCCTGGATCAGGCAAGTCCCTCATCGAAGG  
CTCTGGAGTGGCTGGGTTACATTAATCTCAGGAATGATTAATAC TGAATACAACTGAGATTTTCAAGGG  
GAGATTTTCTCTCTTGGACACTCTGTGACGACGGCAATCTGAGATCTTGGAGCTTAAAGGCT  
TGAGGACACTGGCTGTGATTAATCTGTGCGAGAGGGGGATTAATAGTTCTACTTGGGCTCAGGGA

配列ID番号: 54  
VM1005 HC  
EVQLVQSGAIVKKPGATVKISKVSGYVFTSYWLIHWIRQSPSRGLEWLGYNPRNDYIETYNRIKGRF  
VLSLDTSVSTAYLQRI SLKALDITAVYYCARRGHTFTYWGGQ

FIGURE 6

## 【 図 7 】

配列ID番号: 7  
VM1006 LC  
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTG TGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACTCATCT  
TGCAAGTCCAGTCAAAAGTGTTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAATCTACTTGGCTTGGTATCAGCA  
GAAACCAGGGAAAGCTCTTAAGCTCTCTGATCTATTTGGGCACTCACTAGGGAAAGGGGGATCTCAG  
ACAGGTTCAAGTGGCAAGTGGGTCTGGGACAGACTTACTCTCTCACTATCAGGAGAACTGGAGCTGAA  
GATTTTGAGTGTATATCTGTAAAGCAATACCTCTCTCTGGGACGTTCTGGCCAAAGGG

配列ID番号: 23  
VM1006 LC  
DRQMISPSNLSASVGDRTVITCKSSQSVLYSAVERKLYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTIRRGHPDRIS  
GSGSGFDFTLTISRLPEDFAVYYCKQYLSSTFGQG

配列ID番号: 39  
VM1006 HC  
CAGGTCTCACTTGGTCTAGCTTGGAGCTGAGGTGAAGAAGCTTGGGCTTCAAGTGAAGGTTCTCTG  
CAAGGCTTCTGGCTAGGTTTACTTGGCTACTTGGCTGCACTGGATCAGGCTGCTCTATCAGAGG  
CTCTGAGTGGCTGGGTTACATTAATCTTAGGATGATTAATCTGAGTACAACTGGATTTTCAAGGG  
GAGATTTTCTCTCTTGGACACTCTGTGACGACGGCATCTCTGAGATCTGAGCTTAAAGGCT  
TGAGGACACTGGCTGTGATATCTGTGCGAGAGGGGGATTAATAGTTCTACTTGGGCTCAGGGA

配列ID番号: 55  
VM1006 HC  
QVQLVQSGAIVKKPGASVKVSCASGYVFTSYWLIHWIRQSPSRGLEWLGYNPRNDYIETYNRIKGR  
FVLSLDTSVSTAYLQRI SLKALDITAVYYCARRGHTFTYWGGQ

FIGURE 7

## 【 図 8 】

配列ID番号: 8  
VM1007 LC  
GCCATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTCCCTGTGTGCAITCTGAGGAGACAGAGTCACTCATCT  
TGCAAGTCCAGTCAAAAGTGTTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAATCTACTTGGCTTGGTACCAGCA  
GAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCC TCACTATTTGGGCACTCACTAGGGAAAGGGGGTCTCCAT  
CAAGGTTTCAAGCAGGAGTGGATCTGGAGCAGATTTCACTCTCCACTCACTAGCAGCTTGAAGCTGAA  
GATTTTGCAACTTATTAATCTGTAAGCAATACCTCTCTCTGTGGACGTTCTGGCCAAAGGG

配列ID番号: 24  
VM1007 LC  
ARQLTQSPSSLASVGDRTVITCKSSQSVLYSAVERKLYLAWYQQKPGKAPKLLIYWASTIRRGVPSRPS  
GSGSGFDFTLTISRLPEDFAVYYCKQYLSSTFGQG

配列ID番号: 40  
VM1007 HC  
CAGGHTCCAGCTGGTACAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCTTGGGCTTACAGTGAAGGTTCTCTG  
CAAGGCTTCTGGCTAGGTTTACTAGCTACTTGGCTTGCCTGGATCAGGCAAGTCCCTCATCGAAGG  
CTCTGGAGTGGCTGGGTTACATTAATCTTAGGAATGATTAATCTGAGTACAACTGGATTTTCAAGGG  
GAGAGTCAAGATTAATCTGGGCAAAATCCAGGACAGCTTACTATGGAGCTGAGCACTTGAAT  
CTGAGGACAGGCTGTGATTAATCTGTGCGAGAGGGGGATTAATAGTTCTACTTGGGCTCAGGGA

配列ID番号: 56  
VM1007 HC  
QVQLVQSGAIVKKPGASVKVSCASGYVFTSYWLIHWIRQSPSRGLEWLGYNPRNDYIETYNRIKGR  
FVLSLDTSVSTAYLQRI SLKALDITAVYYCARRGHTFTYWGGQ

FIGURE 8

【図 9】

配列ID番号: 9  
VM1009 LC  
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCTCTCTGCTGCTCTGTAAGGAGACAGAGTCACCAATCAC1  
TGCAAGTCCAGTCAAAATGTTTTATACAGTGCAGTGGAGGAAGAACTACTTGGCTTGGTACCAAGCA  
GAAACCTGRCUAGGCTCCAGGACTCTCTATTAATGGRATCTACTAGGCAAAAGGCAATCTCAG  
ACAGTCTAGTGGCTAGGCTCTGGAGAGACTTCACTCTCACATGAGCAAGAGTGGAGCTGAA  
GATTTTGCAGTGTATCTGTAAGCAATACCCTCTCTCTGAGAGCTTCGGCTCAAGGG

配列ID番号: 25  
VM1008 LC  
DROATQSSSLASVGRDVTITCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQKPGQAPRLIYWASTRLRGTPDRIS  
GSGSGTDFHTISRLIPEDEAVYYCKQYLSSTWTHGQG

配列ID番号: 41  
VM1008 HC  
CAGGTCACGCTGGTGGAGCTGGAGCTGAAGGAGCTTGGGCTCTAGTGAAGGCTCTCTG  
CAAGGCTCTTGGCTAGCTTTTACTAGCTACTGGCTGCACTGGGCTGAGAGGCTCTGAGCAAGCT  
CTTGGAGTGGAGTGGTATCAATTAATCTAGGAGAGATTAATCTAGTACAGTGGTGGTCTCAAGGG  
GAGAGTCAAGATTAATCTGGAGCAATCTAGGAGCAAGCTTACATGGAGCTGGAGAGCTTGGAGT  
CTGAGGCACTGGCTGGTATTAATCTGGTGGAGAGGAGGATTAATCTAGCTTACTGGGCTCAAGGA

配列ID番号: 57  
VM1008 HC  
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCASGYSYFISYWLHWIRQARGRLIHWIGYNPNNDYILYNRIKGI  
RVHTADKSTISATMELSLRSEDTAVYYCARRGHTIFYWQGQ

FIGURE 9

【図 10】

配列ID番号: 10  
VM1009 LC  
GAAATTTGTTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGCTTTTGCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCC  
TGCAAGTCTCAGTCAAGTGTTTTATATACAGTGCAGTGGAGGAAGCACTTGGCTTGGTATCAGCA  
GAAACCAAGGGAAGCTCTTAAGCTCTCTGATCTATTGGGCAATCACTAGGGAAGGGGGTCTCT  
CGAGGCTCTAGTGGAGTGGATCTGGAGACAGATTTACCTTTACCACTAGAGCTTGGAGCTGAA  
GATGCTGCAATATAATTACTGTAAAGCAATACCTCTCTCTGGGAGCTTGGCTCAAGGG

配列ID番号: 26  
VM1009 LC  
EIVLTQSPAFLSLSPGERAFLSCSSQSVLYSAVEKNYLAWYQKPGKAPKLIYWASTRLRGTPDRIS  
GSGSGTDFHTISSLALDAATYYCKQYLSSTWTHGQG

配列ID番号: 42  
VM1009 HC  
CAGGTCACGCTGGTGGAGCTGGAGCTGAGGCTGAAGAGCTCTGGGCTCTAGTGAAGGCTCTCTG  
CAAGGCTCTTGGCTAGCTTTTACTAGCTACTGGCTGCACTGGATCAGGCACTCTCTAGAGAGG  
CTTGGAGTGGCTGGGATCAATTAATCTAGGAGAGATTAATCTAGGATCAATCTGGATTTCAAGGG  
GAGATTTGCTTTCTCTGGAGCACTCTGTCAGCAAGGATATCTAGAGCTTGGAGCTTAAGGCT  
TGAAGCACTGCTGGTATTAATCTGGTGGAGAGGAGGATTAATCTAGCTTACTGGGCTCAAGGA

配列ID番号: 58  
VM1009 HC  
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCASGYSYFISYWLHWIRQSPRGGLIHWIGYNPNNDYILYNRIKGRV  
IHTADKSTISATMELSLRSEDTAVYYCARRGHTIFYWQGQ

FIGURE 10

【図 11】

配列ID番号: 11  
VM1010 LC  
GAAATTTGTTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGCTTTTGCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCC  
TGCAAGTCTCAGTCAAAATGTTTTATACAGTGCAGTGGAGGAAGAACTACTTGGCTTGGTATCAGCA  
GAAACCAAGGGAAGCTCTTAAGCTCTCTGATCTATTGGGCAATCACTAGGGAAGGGGGGTCTCCA  
CAAGGCTCTAGTGGAGTGGATCTGGGCAAGATTTACTTTTCACTACATCAGAGCTTGGAGCTGAA  
GATATTCACCAATATACTGTGAAGCAATACCTCTCTCTGAGAGCTTGGCTCAAGGG

配列ID番号: 27  
VM1010 LC  
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSSQSVLYSAVEKNYLAWYQKPGKAPKLIYWASTRLRGTPDRIS  
GSGSGTDFHTISLQPEDAATYYCKQYLSSTWTHGQG

配列ID番号: 43  
VM1010 HC  
GAAGTGCAGCTGGTGGAGCTTGGAGCAGAGGTTGAAAAGCTCTGGGAGGCTCTTGAAGATCTCTG  
TAAGGTTTCTGGCTAGCTTTTACTAGCTACTGGCTGCACTGGATCAGGCACTCTCTAGGAGAGG  
CTTGGAGTGGCTGGGATACATTAATCTAGGAACTGATTAATCTAGGATCAATCTGATTTCAAGGG  
GAGATTCACCACTCTAGAGCAAGCTCAAGAACTCACTGTATCTGCAAAATGCAACAGCTTGGAGG  
CTGAGGCACTGGCTGGTATTAATCTGGTGGAGAGGAGGATTAATCTAGCTTACTGGGCTCAAGGA

配列ID番号: 59  
VM1010 HC  
EVQLVQSGAEVKKPGASVRSCKVSGYSYFISYWLHWIRQSPRGGLIHWIGYNPNNDYILYNRIKGRVT  
ISRDNAKSSLYLQMSLSRLSDTAVYYCARRGHTIFYWQGQ

FIGURE 11

【図 12】

配列ID番号: 12  
VM1011 LC  
GAAATTTGTTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGCTTTTGCTCCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCC  
TGCAAGTCTCAGTCAAGTGTTTTATATACAGTGCAGTGGAGGAAGCACTTGGCTTGGTATCAGCA  
GAAACCTGGCAAGGCTCTCAAGGCTCTCACTAATTTGGGCAATCACTAGGGAAGGGGATCTCAG  
ACAGGCTCAGTGGCTGGTGGCTCTGGGCAAGACTTCACTCTCACTATCAGAGCTTGGAGCTGAA  
GATTTTGCAGTGTATTAATCTGTAAGCAATACCTCTCTCTGGAGCTTGGCTCAAGGG

配列ID番号: 28  
VM1011 LC  
EIVLTQSPAFLSLSPGERATLSCKSSQSVLYSAVEKNYLAWYQKPGQAPRLIYWASTRLRGTPDRIS  
GSGSGTDFHTISRLIPEDEAVYYCKQYLSSTWTHGQG

配列ID番号: 44  
VM1011 HC  
CAGGTCACGCTGGAGGAGCTGGGCTCAGGACTGGTGAAGCTTCAAGAGCTCTGCTCTCACTTG  
CACTGCTCTCTGGCTAGCTTTTACTAGCTACTGGCTGCACTGGATCTGGCAAGCTCTCAGGGAAGGG  
GCTGGAGTGGATTTGGTATCAATTAATCTAGGAAATGATTAATCTAGGATCAATCTGGATTTCAAGGG  
GAGAGTCAAGATTAATCTGGAGCAATCTAGGAGCAAGCTTACTAGGAGTGAAGAGCTTGGAGT  
CTGGAGCACTGGCTGGTATTAATCTGGTGGAGAGGAGGATTAATCTAGCTTACTGGGCTCAAGGA

配列ID番号: 60  
VM1011 HC  
QVQLVQSGGLVRRPQSLSLCTCTVSGYSYFISYWLHWIRQPPGKGLIHWIGYNPNNDYILYNRIKGRVT  
IADKSTISATMELSLRSEDTAVYYCARRGHTIFYWQGQ

FIGURE 12

【 図 1 4 】

配列ID番号: 14

VM10131C

GCATCTCAGTGTGACCTAGTCTCCATCTCTCCCTGCTGCTATCTGTAGGAGACAGAGTCACCACTACT  
TGCAGGTCAGTCAAAGTGTCTTATACAGTGCAGTGGAGAAGAACTACTTGGCTCTGTATCAGCA  
GAAACTTGGCTAGGCTCTCAGGCTCTCTATCTATCTGGGCACTCAATAGGGAAGATGGGGGCTCTCAT  
CAAGGTCAGTGGGAGTGGGATCTGGGAGAGTTTCACTCACTCAAGCAAGCTCTGTAGCTTGAA  
GATTTTGCAACTTAACTGTAAAGCAATACCTCTCTCTGGAGCTTGGGCAAGGG

配列ID番号: 30

VM1013 LC

AIQLIQSPSSLSASVGDRTITTCSSQSVLYSAVEKNYLAWYQQKPGQAPRIILYWASTREIRGVPSRI  
GSGSGIDFTLTSSLQPLEDFATYYCKQYLSSWTFGQG

配列ID番号: 46

VM1013 EK

CAGTGTGACAGTGTACAGATGTCGGGCCACGAGTATGCTGAAGCTTCTACAGACCTTGTCTCCACTGTG  
 CACTGTGTTCTGGCTACGTTTCTACAGCTATCTGGCTGCATCGGATGCCAGCCCTCCACGGGAAGGCG  
 GCTGGAGTGGATGTGTATACATTATCTACGGAATGATTATACAGATGATCAATCGGATTTCTACAGGG  
 GAGATTCACCAATCTACAGAGCAACGCCAAGCACTCATCTGTATGTGCAAAATGAACAGCTGTGAGAG  
 CCGACGACACAGCTTGTGTATTAATCTGTGTGAGGAGGGGATTAATACAGTCTTACTTGGGCTCAGGGA

配列ID番号: 62

SYMULSER  
COMPLING

QVQIQISGRGHVKPSQHSLSLCTVSGYVPLSYWLIHWIROPPIKGLIEWGIGYNKNDYIEYNRIKGRF  
ISRDNAKNSLYIQMNSIRAEIHAVYYCARRGLITFYWGQG

FIGURE 14

## 【 図 1 6 】

配列ID番号: 16

VM1015 LC<sup>+</sup>

GAAATGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCTTGGCTTGTCCTTGGGGAAAAAGCTCCCTCTCC  
TGGAAATCCAGTCAAAGTGTTTATATACAGTGGAGTGGAAAAAGCACTCTTGGCTTGGHATACAGCA  
GAAACACAGGGAAGACTCTTAAGCTCTGATCTATAGGCAATCCACTAGGGGAAGGGGGGCTCCCT  
CTACGCTACAGTGGCAGTGGATCTGGGAGAGATTTCTACTCTACCTATAGCAAGCTTGAAGCTGAA  
GATTTGCAACTTATTACTGTAAAGCAATACCTCTCTGTGGAGCTTGGGCAAGGG

配列ID番号: 32

VM1015LC

ELVL TQSPATHALSPGK KAPL SWKSSQSVLYSGV LKNYLAWYQQKIGKAPKLIYWA STRIRGVFSRI  
SGSGSGFTDFILTISSILQALDFATYYCKQYI LSSWTFGGQ

配列ID番号: 48

YMI015IK

[illegible]

配列ID番号: 64

VM1015 HC

LVQLVQSGPIVKKPGHSLRISCKGSGYVITSYWLHWRQAPGQGLLWMGYINPRNDYTLNRRHKGR  
VHSADKSLNTAYLQWSSLKASDIAMYYCARRGLHFYWGQG

FIGURE 16

【 図 1 7 】

クローン	ELISA OD 450
VM1000	0.5174
VM1001	0.3856
VM1002	0.4953
VM1003	0.5600
VM1004	0.4437
VM1005	0.3725
VM1006	0.6377
VM1007	0.5379
VM1008	0.6700
VM1009	0.5968
VM1010	0.6998
VM1011	0.1500

FIGURE 17

【 図 1 8 】

クローン	ELISA OD 450
VM006G	20.00
VM006H	5.00
VM1000	0.50
VM1001	0.22
VM1002	0.33
VM1003	0.34
VM1004	0.80
VM1005	19.30
VM1006	0.30
VM1007	1.00
VM1008	1.50
VM1009	0.45
VM1010	4.80
VM1011	0.25
VM1012	1.50
VM1013	2.40
VM1014	0.40
VM1015	0.80

FIGURE 18

【 図 1 9 】

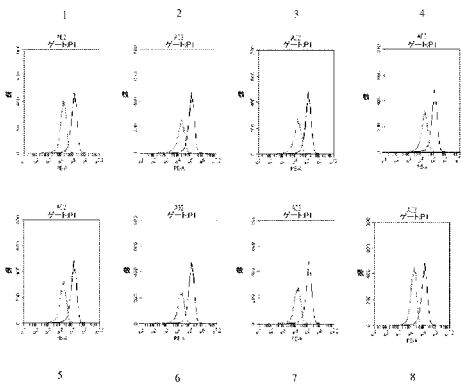


FIGURE 19

【 図 2 0 】

クローン	FACS%シフトによる Daudi内在化
BA006G	74.21%
VM1000	85.93%
VM1001	86.42%
VM1002	84.60%
VM1003	70.80%
VM1004	87.07%
VM1005	86.39%
VM1006	88.33%
VM1007	85.00%
VM1008	69.44%
VM1009	69.44%
VM1010	65.73%
VM1011	87.13%
VM1012	87.51%
VM1013	88.82%
VM1014	85.38%
VM1015	86.60%

FIGURE 20

【 図 2 1 】

クローン	KD (nM)	共焦点によるDaudi内在化 (RMF)
LL2 (マウスMab)	20.00	ND
対照	5.00	~10
VM1000	0.50	~100
VM1001	0.22	~100
VM1002	0.33	~150
VM1003	0.34	~150
VM1004	0.80	~100
VM1006	2.70	~200
VM1007	1.00	~200
VM1011	0.26	~200

FIGURE 21

【 図 2 2 A 】

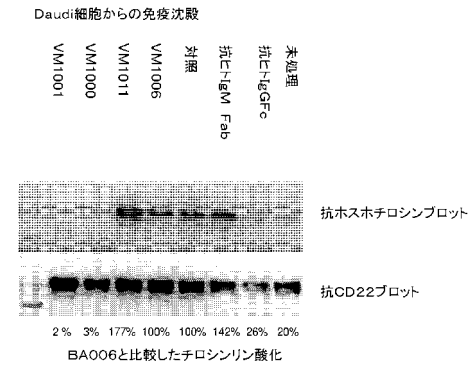


FIGURE 22A

【 図 2 2 B 】

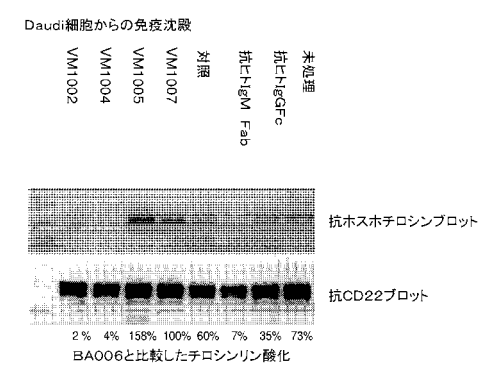


FIGURE 22B

【 図 2 3 】

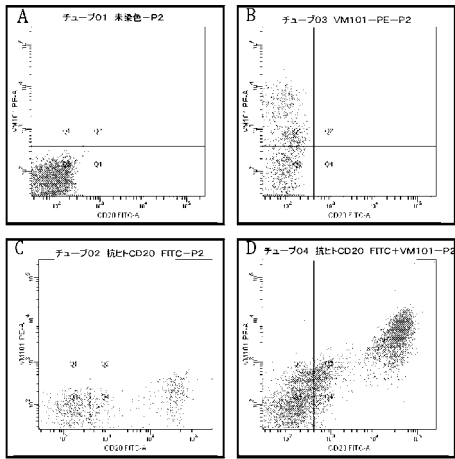


FIGURE 23



## 【 図 2 4 】

抗体	収率(mg/l)
対照	276.2
抗体1	219.8
抗体2	255.4
抗体3	221.7
トラスツマブ	265

FIGURE 24



## 【 国際調査報告 】

<b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b>		International application No. <b>PCT/US2013/038370</b>
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<b>C07K 16/28(2006.01)i, A61K 39/395(2006.01)i, A61P 35/00(2006.01)i</b>		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C07K 16/28; A61K 39/395; C07K 16/46; C12N 15/13; A61P 35/00</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: anti-CD22 antibody, rheumatoid, arthritis, cancerous disorder		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5789554 A (LEUNG, SHUI-ON et al.) 04 August 1998 See claim 1, column 27 and 28.	1-8, 16-25, 27-34
A	WO 03-093320 A2 (CELLTECH R&D LIMITED) 13 November 2003 See claim 1.	1-8, 16-25, 27-34
A	ARNDT, MICHAELA A. E. et al., 'Generation of a highly stable, internalizing anti-CD22 single-chain Fv fragment for targeting non-Hodgkin's lymphoma', Int. J. Cancer, 10 December 2003, Vol. 107, No. 5, pp. 822-829 See abstract.	1-8, 16-25, 27-34
A	GenBank accession no. AAC92903.1 (10 December 1998) See the whole document.	1-8, 16-25, 27-34
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"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</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 24 September 2013 (24.09.2013)		Date of mailing of the international search report <b>25 September 2013 (25.09.2013)</b>
Name and mailing address of the ISA/KR  Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon Metropolitan City, 302-701, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-472-7140		Authorized officer HEO Joo Hyung Telephone No. +82-42-481-8150 

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/US2013/038370****Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item I.c of the first sheet)**

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of:

a. a sequence listing filed or furnished

☐

on paper

☒

in electronic form

b. time of filing or furnishing

☐

contained in the international application as filed

☒

filed together with the international application in electronic form

☐

furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2013/038370

**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.: 9-15,26  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
Claims 9-15 and 26 pertain to methods for treatment of the human, and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under Article 17(2)(a)(i) of the PCT and Rule 39.1(iv) of the Regulations under the PCT, to search.
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:

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

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2013/038370**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 05789554 A	04/08/1998	CA 2195557 A1	22/02/1996
		CA 2195557 C	17/10/2006
		EP 0771208 A1	05/06/2002
		EP 0771208 B1	19/10/2005
		JP 03053873 B2	19/06/2000
		JP 10-505231 A	26/05/1998
		US 2002-0102254 A1	01/08/2002
		US 2004-0013607 A1	22/01/2004
		US 2005-0106108 A1	19/05/2005
		US 2007-0172920 A1	26/07/2007
		US 6187287 B1	13/02/2001
		WO 96-04925 A1	22/02/1996
WO 03-093320 A2	13/11/2003	AT 462729 T	15/04/2010
		AU 2003-223007 A1	17/11/2003
		AU 2003-223007 B2	16/07/2009
		AU 2003-223007 C1	11/02/2010
		CA 2484420 A1	13/11/2003
		CN 101134779 A0	05/03/2008
		CN 101134779 B	13/03/2013
		CN 103172742 A	26/06/2013
		CN 1662558 A	31/08/2005
		CO 5631451 A2	28/04/2006
		DE 60331910 D1	12/05/2010
		DK 1504035 T3	07/06/2010
		EC SP045470 A	28/01/2005
		EP 1504035 A2	09/02/2005
		EP 1504035 B1	31/03/2010
		ES 2341708 T3	25/06/2010
		GB 0210121 D0	12/06/2002
		HK 1071762 A1	22/10/2010
		IL 164923 A	29/03/2012
		IL 164923 D0	18/12/2005
		JP 04486494 B2	23/06/2010
		JP 2006-506955 A	02/03/2006
		JP 2010-022372 A	04/02/2010
		KR 10-1156796 B1	21/06/2012
		KR 10-1238970 B1	04/03/2013
		KR 10-2012-0127513 A	21/11/2012
		MX PA04010787 A	07/03/2005
		NO 20044742 A	22/12/2004
		NZ 536757 A	30/06/2006
		PL 373277 A1	22/08/2005
		PT 1504035 E	07/06/2010
		RU 2004135103 A	27/10/2005
		RU 2342401 C2	27/12/2008
		SG 161744A1	29/06/2010
		SI 1504035T1	30/07/2010
		TW I324161B	01/05/2010

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No.

**PCT/US2013/038370**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 2003-0235869 A1	25/12/2003
		US 2007-0059307 A1	15/03/2007
		US 2010-0021995 A1	28/01/2010
		US 2011-0165659 A1	07/07/2011
		US 2012-0302739 A1	29/11/2012
		US 7355011 B2	08/04/2008
		US 7919606 B2	05/04/2011
		WO 2003-093320 A3	05/02/2004
		ZA 200408851A	10/11/2005

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 1/04 (2006.01)	A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)	A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)	A 6 1 P 27/02	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 9/08 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 K 47/10 (2006.01)	A 6 1 K 9/08	
A 6 1 K 47/16 (2006.01)	A 6 1 K 47/10	
A 6 1 K 47/08 (2006.01)	A 6 1 K 47/16	
A 6 1 K 47/02 (2006.01)	A 6 1 K 47/08	
A 6 1 K 47/12 (2006.01)	A 6 1 K 47/02	
A 6 1 K 47/18 (2006.01)	A 6 1 K 47/12	
A 6 1 K 9/19 (2006.01)	A 6 1 K 47/18	
	A 6 1 K 9/19	

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

(72)発明者 チャン、ファイ、ウェン

アメリカ合衆国、 9 2 0 6 9 カリフォルニア州、サン マルコス、 1 3 1 8 シャドウ ヒルズ  
ドライブ

(72)発明者 ボイル、ウィリアム

アメリカ合衆国、 9 0 2 6 5 - 6 6 2 8 カリフォルニア州、マリブ、 2 3 6 2 9 マリブ コロ  
ニー ロード

F ターム(参考) 2B030 AA02 AB04 AD08 CA14  
4B024 AA01 AA12 BA46 CA04 CA09 DA02 EA04 GA13  
4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01 DA14  
4C076 AA12 AA29 BB11 BB13 BB15 BB16 BB22 BB25 BB27 BB29  
BB30 CC05 CC07 CC10 CC27 DD19 FF68  
4C085 AA14 CC23 EE01 GG01 GG02 GG03 GG04 GG06 GG10  
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 DA76 EA22 EA28 EA51 FA74