

(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2009-538629

(P2009-538629A)

(43) 公表日 平成21年11月12日(2009.11.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 5 4
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 2 4
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 B	4 B O 6 4
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	4 B O 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 D	4 C O 8 5
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 206 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2009-513419 (P2009-513419)	(71) 出願人	596168317 ジェネンテック・インコーポレーテッド GENENTECH, INC. アメリカ合衆国カリフォルニア・9408 0-4990・サウス・サン・フランシス コ・ディーエヌエー・ウェイ・1
(86) (22) 出願日	平成19年5月29日 (2007.5.29)	(74) 代理人	100109726 弁理士 園田 吉隆
(85) 翻訳文提出日	平成21年2月2日 (2009.2.2)	(74) 代理人	100101199 弁理士 小林 義教
(86) 国際出願番号	PCT/US2007/069889	(72) 発明者	エベンス, アレン, ジェイ., ジュ ニア. アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 70, サン カルロス, アロヨ アベ ニュー 1932
(87) 国際公開番号	W02007/140371		最終頁に続く
(87) 国際公開日	平成19年12月6日 (2007.12.6)		
(31) 優先権主張番号	60/809, 328		
(32) 優先日	平成18年5月30日 (2006.5.30)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/908, 941		
(32) 優先日	平成19年3月29日 (2007.3.29)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	60/911, 829		
(32) 優先日	平成19年4月13日 (2007.4.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

(54) 【発明の名称】 抗体およびイムノコンジュゲートとこれらの使用方法

(57) 【要約】

抗CD22抗体およびそのイムノコンジュゲートが提供される。抗CD22抗体およびそのイムノコンジュゲートの使用方法が提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 配列番号：9、10、19から23、32および33から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(b)

(1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、

(2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、

(3) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3、

(4) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、および、

(5) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのHVRとを含んでなる、CD22に結合する抗体。

10

【請求項 2】

配列番号：10のコンセンサス配列に一致するアミノ酸配列を含むHVR-L1を含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

さらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、及び配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3を含んでなる、請求項2に記載の抗体。

【請求項 4】

HVR-L1が配列番号：9を含み、抗体がさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

20

【請求項 5】

HVR-L1が配列番号：19を含み、抗体がさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 6】

HVR-L1が配列番号：20を含み、抗体がさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

30

【請求項 7】

HVR-L1が配列番号：21を含み、抗体がさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 8】

HVR-L1が配列番号：22を含み、抗体がさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 9】

HVR-L1が配列番号：23を含み、抗体がさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

40

【請求項 10】

HVR-L1が配列番号：32を含み、抗体がさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 11】

HVR-L1が配列番号：33を含み、抗体がさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

50

【請求項 1 2】

さらに、VHサブグループIIIコンセンサスフレームワークおよびVLサブグループIコンセンサスフレームワークから選択される少なくとも1つのフレームワークを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 1 3】

抗体が、配列番号：16から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 1 4】

抗体が、配列番号：17から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

10

【請求項 1 5】

抗体が、配列番号：18から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 1 6】

抗体が、配列番号：1、3、5及び7から選択される1つ、2つ、3つ又は4つのフレームワークアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 1 7】

抗体が、配列番号：8、11、13及び15から選択される1つ、2つ、3つ又は4つのフレームワークアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

20

【請求項 1 8】

さらに、配列番号：17から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項13に記載の抗体。

【請求項 1 9】

さらに、配列番号：18から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項13に記載の抗体。

【請求項 2 0】

抗体が、配列番号：88から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖を含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 2 1】

抗体が、配列番号：87から選択されるアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含んでなる、請求項1に記載の抗体。

30

【請求項 2 2】

抗体が、配列番号：88のアミノ酸配列を有する重鎖と配列番号：87のアミノ酸配列を有する軽鎖を含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 2 3】

配列番号：16のアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる、CD22に結合する抗体。

【請求項 2 4】

さらに、配列番号：17のアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項23に記載の抗体。

40

【請求項 2 5】

さらに、配列番号：18のアミノ酸配列に少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる、請求項23に記載の抗体。

【請求項 2 6】

抗体が、ハイブリドーマATCC受託番号PTA-7621(10F4.4.1)によって産生される抗体の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含んでなる、請求項1に記載の抗体。

【請求項 2 7】

抗体が、ハイブリドーマATCC受託番号PTA-7620(5E8.1.8)によって

50

産生される抗体の1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含んでなる抗体。

【請求項28】

抗体がヒト化されている、請求項1に記載の抗体。

【請求項29】

抗体がヒト化されている、請求項23に記載の抗体。

【請求項30】

CD22が哺乳類のCD22である、請求項1に記載の抗体。

【請求項31】

CD22が齧歯目のCD22および霊長類のCD22から選択される、請求項30に記載の抗体。

10

【請求項32】

CD22がヒトのCD22である、請求項31に記載の抗体。

【請求項33】

CD22が哺乳類のCD22である、請求項23に記載の抗体。

【請求項34】

CD22が齧歯目のCD22および霊長類CD22から選択される、請求項33に記載の抗体。

【請求項35】

CD22がヒトのCD22である、請求項34に記載の抗体。

【請求項36】

請求項1に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

20

【請求項37】

請求項23に記載の抗体をコードするポリヌクレオチド。

【請求項38】

請求項36に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項39】

請求項37に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項40】

請求項38に記載のベクターを含む宿主細胞。

【請求項41】

請求項39に記載のベクターを含む宿主細胞。

30

【請求項42】

宿主細胞が真核細胞である、請求項40に記載の宿主細胞。

【請求項43】

宿主細胞がCHO細胞である、請求項42に記載の宿主細胞。

【請求項44】

宿主細胞が真核細胞である、請求項41に記載の宿主細胞。

【請求項45】

宿主細胞がCHO細胞である、請求項44に記載の宿主細胞。

【請求項46】

a) 抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で請求項38に記載の宿主細胞を培養し、b) 抗体を単離することを含んでなる、抗CD22抗体の作製方法。

40

【請求項47】

a) 抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で請求項39に記載の宿主細胞を培養し、b) 抗体を単離することを含んでなる、抗CD22抗体の作製方法。

【請求項48】

CD22が細胞の表面に発現される、請求項28に記載の抗体。

【請求項49】

細胞がB細胞である、請求項48に記載の抗体。

【請求項50】

50

C D 2 2 が細胞の表面に発現される、請求項 2 9 に記載の抗体。

【請求項 5 1】

C D 2 2 が B 細胞である、請求項 5 0 に記載の抗体。

【請求項 5 2】

抗体が配列番号：27のアミノ酸22-240のCD22の領域内のエピトープに結合する、請求項1に記載の抗体。

【請求項 5 3】

抗体が配列番号：27のアミノ酸22-240のCD22の領域内のエピトープに結合する、請求項23に記載の抗体。

【請求項 5 4】

B細胞がB細胞増殖性疾患と関係している、請求項49に記載の抗体。

【請求項 5 5】

B細胞増殖性疾患が癌である、請求項54に記載の抗体。

【請求項 5 6】

B細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項54に記載の抗体。

【請求項 5 7】

B細胞がB細胞増殖性疾患と関係している、請求項51に記載の抗体。

【請求項 5 8】

B細胞増殖性疾患が癌である、請求項57に記載の抗体。

【請求項 5 9】

B細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項57に記載の抗体。抗体がモノクローナル抗体である、請求項1から14、16から23及び30から33のいずれかーに記載の抗体。

【請求項 6 0】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項1に記載の抗体。

【請求項 6 1】

抗体がFab、Fab'-SH、Fv、scFv又は(Fab')₂断片から選択される抗体断片である、請求項60に記載の抗体。

【請求項 6 2】

抗体がヒト化されている、請求項60に記載の抗体。

【請求項 6 3】

抗体がヒトである、請求項60に記載の抗体。

【請求項 6 4】

抗体がモノクローナル抗体である、請求項23に記載の抗体。

【請求項 6 5】

抗体がFab、Fab'-SH、Fv、scFv又は(Fab')₂断片から選択される抗体断片である、請求項64に記載の抗体。

【請求項 6 6】

抗体がヒト化されている、請求項64に記載の抗体。

【請求項 6 7】

抗体がヒトである、請求項64に記載の抗体。

【請求項 6 8】

抗体が、ATCC PTA-7621(10F4.4.1); ATCC PTA-7620(

10

20

30

40

50

5 E 8 . 1 . 8) ; 及び、配列番号 : 8 8 の重鎖配列と配列番号 : 8 7 の軽鎖配列を含む抗体から選択した抗体と同じエピトープに結合する、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6 9】

抗体が、A T C C P T A - 7 6 2 1 (1 0 F 4 . 4 . 1) ; A T C C P T A - 7 6 2 0 (5 E 8 . 1 . 8) ; 及び、配列番号 : 8 8 の重鎖配列と配列番号 : 8 7 の軽鎖配列を含む抗体から選択した抗体と同じエピトープに結合する、請求項 2 3 に記載の抗体。

【請求項 7 0】

C D 2 2 への抗体の結合に許容される条件下で請求項 1 に記載の抗体に生体試料を接触させ、抗体と C D 2 2 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、生体試料中の C D 2 2 の存在を検出する方法。

10

【請求項 7 1】

生体試料が B 細胞増殖性疾患があると疑われる患者のものである、請求項 7 0 に記載の方法。

【請求項 7 2】

B 細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (N H L)、中悪性度 N H L、再発性中悪性度 N H L、再発性低悪性度 N H L、抵抗性 N H L、抵抗性低悪性度 N H L、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病 (H C L)、急性リンパ球性白血病 (A L L) およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項 7 1 に記載の抗体。

【請求項 7 3】

20

C D 2 2 への抗体の結合に許容される条件下で請求項 2 3 に記載の抗体に生体試料を接触させ、抗体と C D 2 2 との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、生体試料中の C D 2 2 の存在を検出する方法。

【請求項 7 4】

生体試料が B 細胞増殖性疾患があると疑われる患者のものである、請求項 7 3 に記載の方法。

【請求項 7 5】

B 細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫 (N H L)、中悪性度 N H L、再発性中悪性度 N H L、再発性低悪性度 N H L、抵抗性 N H L、抵抗性低悪性度 N H L、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病 (H C L)、急性リンパ球性白血病 (A L L) およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項 7 4 に記載の抗体。

30

【請求項 7 6】

細胞障害性剤に共有結合的に付着した請求項 1 に記載の抗体を含んでなるイムノコンジュゲート。

【請求項 7 7】

細胞障害性剤に共有結合的に付着した請求項 2 3 に記載の抗体を含んでなるイムノコンジュゲート。

【請求項 7 8】

細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、請求項 7 6 に記載のイムノコンジュゲート。

40

【請求項 7 9】

イムノコンジュゲートが、式 $A b - (L - D) p$ を有し、

(a) A b が請求項 1 に記載の抗体であり、

(b) L がリンカーであり、

(c) D が薬剤成分である、請求項 7 8 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 8 0】

L は、6-マレイミドカプロイル (M C)、マレイミドプロパノイル (M P)、バリン - シトルリン (v a l - c i t)、アラニン - フェニルアラニン (a l a - p h e)、p-アミノベンジルオキシカルボニル (P A B)、N-スクシンイミジル 4 (2 - ピリジルチオ) ペンタ

50

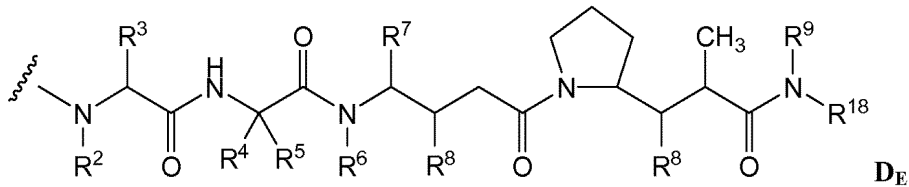
ノエート(S P P)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(S M C C)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(S I A B)から選択される、請求項79に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項81】

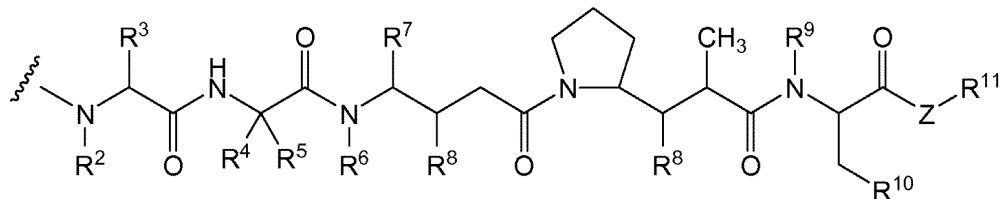
Dがアウリスタチン類およびドロスタチン類から選択される、請求項79に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項82】

Dが以下の式D_E又はD_Fの薬剤成分であり、



10



20

ここにおいて、R²およびR⁶は各々メチルであり、R³およびR⁴は各々イソプロピルであり、R⁷は*sec*-ブチルであり、各々のR⁸はCH₃、O-CH₃、OHおよびHから独立して選択され、R⁹はHであり、R¹⁰はアリールであり、Zは-O-又は-NHであり、R¹¹は、H、C₁-C₈アルキル、又は-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃であり、そしてR¹⁸は-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-アリールであり、そして、

30

(d) pはおよそ1から8まで変動する、
請求項81に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項83】

インビトロ又はインビボの細胞殺傷活性を有する、請求項76に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項84】

リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項79に記載のイムノコンジュゲート。

40

【請求項85】

リンカーがプロテアーゼによって切断される、請求項79に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項86】

リンカーがval-citジペプチドを含む、請求項80に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項87】

リンカーがp-アミノベンジルユニットを含む、請求項79に記載のイムノコンジュゲート。

50

- 【請求項 88】
リンカーが 6-マレイミドカプロイルを含む、請求項 80 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 89】
薬剤が MMAE および MMAF から選択される、請求項 82 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 90】
薬剤が MMAE である、請求項 89 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 91】
薬剤が MMAF である、請求項 89 に記載のイムノコンジュゲート。 10
- 【請求項 92】
細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、請求項 77 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 93】
イムノコンジュゲートが、式 $Ab - (L - D)_p$ を有し、
(a) Ab が請求項 23 に記載の抗体であり、
(b) L がリンカーであり、
(c) D が薬剤成分である、
請求項 92 に記載のイムノコンジュゲート。 20
- 【請求項 94】
L は、6-マレイミドカプロイル(MC)、マレイミドプロパノイル(MP)、バリン - シトルリン(val-cit)、アラニン - フェニルアラニン(ala-phe)、p-アミノベンジルオキシカルボンイル(PAB)、N-スクシンイミジル 4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(SMCC)、及び N-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(SIAB)から選択される、請求項 93 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 95】
リンカー、L がプロテアーゼによって切断される、請求項 93 に記載のイムノコンジュゲート。 30
- 【請求項 96】
L が val-cit ジペプチドを含む、請求項 94 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 97】
L が p-アミノベンジルユニットを含む、請求項 93 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 98】
p-アミノベンジルユニットが p-アミノベンジルオキシカルボンイル(PAB)を含む、請求項 97 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 99】
L が 6-マレイミドカプロイル(MC)を含む、請求項 94 に記載のイムノコンジュゲート。 40
- 【請求項 100】
リンカーが 6-マレイミドカプロイルおよび p-アミノベンジルオキシカルボンイルを含む、請求項 94 に記載のイムノコンジュゲート。 40
- 【請求項 101】
イムノコンジュゲートが式 $Ab - (L - MMAE)_p$ を有し、このとき L はリンカーであり、p は 2 から 5 まで変動する、請求項 79 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 102】
L が val-cit を含む、請求項 101 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 103】
L が MC を含む、請求項 101 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 104】 50

- L が P A B を含む、請求項 1 0 1 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 0 5】
L が M C - P A B を含む、請求項 1 0 1 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 0 6】
イムノコンジュゲートが式 $A b - (L - M M A E) p$ を有し、このとき L はリンカーであり、p は 2 から 5 まで変動する、請求項 9 3 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 0 7】
L が v a l - c i t を含む、請求項 1 0 6 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 0 8】
L が M C を含む、請求項 1 0 6 に記載のイムノコンジュゲート。 10
- 【請求項 1 0 9】
L が P A B を含む、請求項 1 0 6 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 1 0】
L が M C - P A B を含む、請求項 1 0 6 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 1 1】
イムノコンジュゲートが式 $A b - (L - M M A F) p$ を有し、このとき L はリンカーであり、p は 2 から 5 まで変動する、請求項 7 9 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 1 2】
L が v a l - c i t を含む、請求項 1 1 1 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 1 3】
L が M C を含む、請求項 1 1 1 に記載のイムノコンジュゲート。 20
- 【請求項 1 1 4】
L が P A B を含む、請求項 1 1 1 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 1 5】
L が M C - P A B を含む、請求項 1 1 1 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 1 6】
イムノコンジュゲートが式 $A b - (L - M M A F) p$ を有し、このとき L はリンカーであり、p は 2 から 5 まで変動する、請求項 9 3 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 1 7】
L が v a l - c i t を含む、請求項 1 1 6 に記載のイムノコンジュゲート。 30
- 【請求項 1 1 8】
L が M C を含む、請求項 1 1 6 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 1 9】
L が P A B を含む、請求項 1 1 6 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 2 0】
L が M C - P A B を含む、請求項 1 1 6 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 2 1】
D がメイタンシノイドである、請求項 7 9 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 2 2】
D が D M 1、D M 3 および D M 4 から選択される、請求項 1 2 1 に記載のイムノコンジュゲート。 40
- 【請求項 1 2 3】
インビトロ又はインビボの細胞殺傷活性を有する、請求項 1 2 1 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 2 4】
リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項 1 2 1 に記載のイムノコンジュゲート。
- 【請求項 1 2 5】
リンカー L は、N-スクシンイミジル 4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(S P P)、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(S 50

M C C)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(S I A B)から選択される、請求項121に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項126】

薬剤がDM1である、請求項122に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項127】

LがSPPを含む、請求項122に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項128】

LがSMCCを含む、請求項122に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項129】

pが2から4である、請求項122に記載のイムノコンジュゲート。

10

【請求項130】

pが3から4である、請求項122に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項131】

Dがメイタンシノイドである、請求項93に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項132】

DがDM1、DM3およびDM4から選択される、請求項131に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項133】

インビトロ又はインビボの細胞殺傷活性を有する、請求項131に記載のイムノコンジュゲート。

20

【請求項134】

リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項131に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項135】

リンカーLは、N-スクシンイミジル4(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(SPP)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(SMCC)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(SIAB)から選択される、請求項131に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項136】

薬剤がDM1である、請求項132に記載のイムノコンジュゲート。

30

【請求項137】

LがSPPを含む、請求項136に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項138】

LがSMCCを含む、請求項136に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項139】

pが2から4である、請求項136に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項140】

pが3から4である、請求項136に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項141】

請求項79に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体を含有してなる製薬的組成物。

40

【請求項142】

個体に請求項141に記載の製薬的組成物の有効量を投与することを含む、B細胞増殖性疾患を治療する方法。

【請求項143】

B細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項142に記載の方法。

50

【請求項 1 4 4】

請求項 9 3 に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体を含有してなる製薬的組成物。

【請求項 1 4 5】

個体に請求項 1 4 4 に記載の製薬的組成物の有効量を投与することを含む、B 細胞増殖性疾患を治療する方法。

【請求項 1 4 6】

B 細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度 NHL、再発性中悪性度 NHL、再発性低悪性度 NHL、抵抗性 NHL、抵抗性低悪性度 NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項 1 4 5 に記載の方法。

10

【請求項 1 4 7】

請求項 7 6、7 7、7 8 又は 9 2 に記載のイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体を含有してなる製薬的組成物。

【請求項 1 4 8】

個体に請求項 1 4 7 に記載の製薬的組成物の有効量を投与することを含む、B 細胞増殖性疾患を治療する方法。

【請求項 1 4 9】

B 細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度 NHL、再発性中悪性度 NHL、再発性低悪性度 NHL、抵抗性 NHL、抵抗性低悪性度 NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項 1 4 8 に記載の方法。

20

【請求項 1 5 0】

CD 2 2 へのイムノコンジュゲートの結合に許容される条件下で細胞を請求項 7 9 に記載のイムノコンジュゲートに曝すことを含む、B 細胞増殖を阻害する方法。

【請求項 1 5 1】

B 細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度 NHL、再発性中悪性度 NHL、再発性低悪性度 NHL、抵抗性 NHL、抵抗性低悪性度 NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項 1 5 0 に記載の方法。

30

【請求項 1 5 2】

B 細胞が異種移植片である、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 3】

インビトロで曝す、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 4】

インビボで曝す、請求項 1 5 0 に記載の方法。

【請求項 1 5 5】

抗体が 0.6 から 1.0 の範囲のチオール反応値を有する一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含むシステイン改変抗体であり、該システイン改変抗体は、親抗体の一又は複数のアミノ酸残基をシステインに置換することを含む方法によって調製される、請求項 1 に記載の抗体。

40

【請求項 1 5 6】

システイン改変抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬との反応性が高い、請求項 1 5 5 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 1 5 7】

前記方法が、チオール反応試薬とシステイン改変抗体を反応させることによってシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを更に含み、

50

該システイン改変抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬との反応性が高い、請求項 155 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 158】

一又は複数の遊離システインアミノ酸残基が軽鎖に位置する、請求項 155 のシステイン改変抗体。

【請求項 159】

抗体が共有結合で細胞障害性剤に付着したシステイン改変抗体を含むイムノコンジュゲートである、請求項 155 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 160】

細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、請求項 159 に記載のシステイン改変抗体。 10

【請求項 161】

抗体が、キャプチャ標識、検出標識又は固体担体に共有結合して付着される、請求項 155 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 162】

抗体がビオチンキャプチャ標識に共有結合して付着される、請求項 161 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 163】

抗体が蛍光色素検出標識に共有結合して付着される、請求項 161 に記載のシステイン改変抗体。 20

【請求項 164】

蛍光色素が、フルオレセインタイプ、ローダミンタイプ、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサスレッドおよびこれらのアナログから選択される、請求項 163 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 165】

抗体が³H、¹¹C、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³Xe、¹⁷⁷Lu、²¹¹Atおよび²¹³Biから選択される放射性核種検出標識に共有結合して付着される、請求項 161 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 166】 30

抗体がキレートリガンドによって検出標識に共有結合して付着される、請求項 161 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 167】

キレートリガンドがDOTA、DOTP、DOTMA、DTPAおよびTETAから選択される、請求項 166 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 168】

抗体が0.6から1.0の範囲のチオール反応値を有する一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含むシステイン改変抗体であり、該システイン改変抗体は、親抗体の一又は複数のアミノ酸残基をシステインに置換することを含む方法によって調製される、請求項 23 に記載の抗体。 40

【請求項 169】

システイン改変抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬との反応性が高い、請求項 168 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 170】

前記方法が、チオール反応試薬とシステイン改変抗体を反応させることによってシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを更に含み、該システイン改変抗体が親抗体よりもチオ反応性試薬との反応性が高い、請求項 168 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 171】

一又は複数の遊離システインアミノ酸残基が軽鎖に位置する、請求項 168 のシステイ 50

ン改変抗体。

【請求項 172】

抗体が共有結合で細胞障害性剤に付着したシステイン改変抗体を含むイムノコンジュゲートである、請求項 168 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 173】

細胞障害性剤が、毒素、化学療法剤、薬剤成分、抗生物質、放射性同位体および核酸分解酵素から選択される、請求項 172 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 174】

抗体が、キャプチャ標識、検出標識又は固体担体に共有結合して付着される、請求項 168 に記載のシステイン改変抗体。

10

【請求項 175】

抗体がビオチンキャプチャ標識に共有結合して付着される、請求項 174 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 176】

抗体が蛍光色素検出標識に共有結合して付着される、請求項 174 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 177】

蛍光色素が、フルオレセインタイプ、ローダミンタイプ、ダンシル、リサミン、シアニン、フィコエリトリン、テキサスレッドおよびこれらのアナログから選択される、請求項 176 に記載のシステイン改変抗体。

20

【請求項 178】

抗体が³H、¹¹C、¹⁴C、¹⁸F、³²P、³⁵S、⁶⁴Cu、⁶⁸Ga、⁸⁶Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹²³I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹³³Xe、¹⁷⁷Lu、²¹¹Atおよび²¹³Biから選択される放射性核種検出標識に共有結合して付着される、請求項 174 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 179】

抗体がキレートリガンドによって検出標識に共有結合して付着される、請求項 178 に記載のシステイン改変抗体。

【請求項 180】

キレートリガンドがDOTA、DOTP、DOTMA、DTPAおよびTETAから選択される、請求項 179 に記載のシステイン改変抗体。

30

【請求項 181】

リンカーが抗体上のチオール基によって抗体に付着される、請求項 93 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 182】

アルブミン結合ペプチドを含む請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 183】

アルブミン結合ペプチドが配列番号：42 から 46 の中から選択される、請求項 182 に記載の抗体。

【請求項 184】

アルブミン結合ペプチドを含む請求項 23 に記載の抗体。

40

【請求項 185】

アルブミン結合ペプチドが配列番号：42 から 46 の中から選択される、請求項 184 に記載の抗体。

【請求項 186】

抗体がさらに、カバット番号付け慣例法による軽鎖の15、43、110、144、168および205、及びEU番号付け慣例法による重鎖の41、88、115、118、120、171、172、282、375および400から選択される一又は複数の位置にシステインを含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 187】

50

システインが軽鎖の位置 205 にある、請求項 186 に記載の抗体。

【請求項 188】

システインが重鎖の位置 118 にある、請求項 186 に記載の抗体。

【請求項 189】

システインが重鎖の位置 400 にある、請求項 186 に記載の抗体。

【請求項 190】

抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体およびヒト化抗体から選択される、請求項 186 に記載の抗体。

【請求項 191】

抗体断片である、請求項 186 に記載の抗体。

10

【請求項 192】

抗体断片が Fab 断片である、請求項 191 に記載の抗体。

【請求項 193】

キメラ抗体、ヒト抗体又はヒト化抗体から選択される、請求項 186 に記載の抗体。

【請求項 194】

細菌内で産生される、請求項 186 に記載の抗体。

【請求項 195】

CHO 細胞内で産生される、請求項 186 に記載の抗体。

【請求項 196】

CD22 タンパク質を含むことが予測される試料中の CD22 タンパク質の存在を決定する方法であって、請求項 186 に記載の抗体に該試料を曝し、該試料中の該 CD22 タンパク質への該抗体の結合を決定することを含み、このとき該タンパク質に抗体が結合した場合に該試料中の該タンパク質の存在が示される方法。

20

【請求項 197】

前記試料が、前記 CD22 タンパク質を発現することが予測される細胞を含む、請求項 196 に記載の方法。

【請求項 198】

前記細胞が B 細胞である、請求項 196 に記載の方法。

【請求項 199】

抗体が、蛍光色素、放射性同位体、ビオチン又は金属-複合体形成リガンドから選択される標識に共有結合して付着される、請求項 196 に記載の方法。

30

【請求項 200】

請求項 186 に記載の抗 CD22 抗体と薬学的に許容可能な希釈液、担体又は賦形剤を含有してなる製薬的製剤。

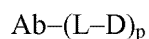
【請求項 201】

抗体が、アウリスタチンないしはメイタンシノイドの薬剤成分に共有結合して付着され、その結果抗体薬剤コンジュゲートが形成される、請求項 186 に記載の抗体。

【請求項 202】

抗体 (Ab) とアウリスタチン又はメイタンシノイドの薬剤成分 (D) とを含んでなり、このとき該システイン改変抗体はリンカー成分 (L) によって一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を介して D に付着しており、該化合物は以下の式 I を有し、

40



I

p が 1、2、3 又は 4 である、

請求項 201 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート。

【請求項 203】

p が 2 である、請求項 201 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 204】

50

L が、以下の式を有し、



ここで、

A はシステイン改変抗体 (A b) のシステインチオールに共有結合して付着されるストレッチャーユニットであり、

a は 0 又は 1 であり、

各々の W はそれぞれアミノ酸ユニットであり、

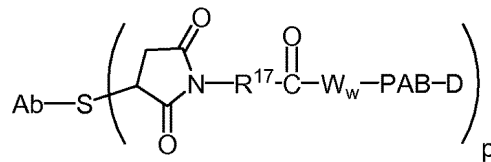
w は 0 から 12 まで変動する整数であり、

Y は薬剤成分に共有結合して付着されるスペーサーユニットであり、そして、y は 0、1 又は 2 である、

請求項 201 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 205】

以下の式を有し、



このとき P A B がパラ-アミノベンジルカルバモイルであり、R¹⁷ が、(C H₂)_r、C₃-C₈カルボサイクリル、O-(C H₂)_r、アリーレン、(C H₂)_r-アリーレン、-アリーレン-(C H₂)_r-、(C H₂)_r-(C₃-C₈カルボサイクリル)、(C₃-C₈カルボサイクリル)-(C H₂)_r、C₃-C₈ヘテロサイクリル、(C H₂)_r-(C₃-C₈ヘテロサイクリル)、-(C₃-C₈ヘテロサイクリル)-(C H₂)_r-、-(C H₂)_rC(O)N R^b(C H₂)_r-、-(C H₂ C H₂ O)_r-、-(C H₂ C H₂ O)_r-C H₂-、-(C H₂)_rC(O)N R^b(C H₂ C H₂ O)_r-、-(C H₂)_rC(O)N R^b(C H₂ C H₂ O)_r-C H₂-、-(C H₂ C H₂ O)_rC(O)N R^b(C H₂ C H₂ O)_r-、-(C H₂ C H₂ O)_rC(O)N R^b(C H₂ C H₂ O)_r-C H₂-、及び-(C H₂ C H₂ O)_rC(O)N R^b(C H₂)_r-から選択される二価のラジカルであり、R^bがH、C₁-C₆アルキル、フェニル又はベンジルであり、そして、rはそれぞれ1から10まで変動する整数である、請求項 204 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 206】

W_w がバリン-シトルリンである、請求項 204 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 207】

R¹⁷ が(C H₂)₅又は(C H₂)₂である、請求項 204 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 208】

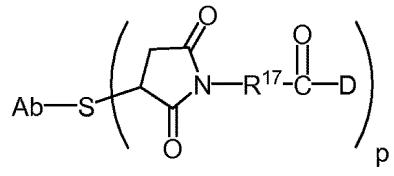
以下の式を有する、請求項 204 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

10

20

30

40



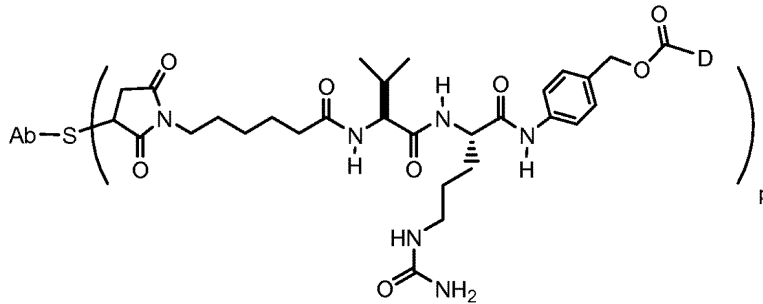
【請求項 209】

R¹⁷ が (CH₂)₅ 又は (CH₂)₂ である、請求項 208 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

10

【請求項 210】

以下の式を有する、請求項 204 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。



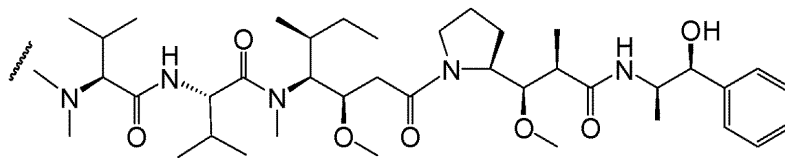
20

【請求項 211】

L が SMCC、SPP 又は BMPEO である、請求項 202 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 212】

D が以下の構造を有する MMAE であり、

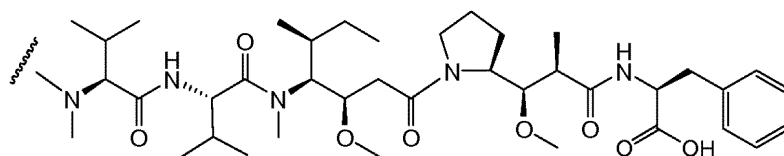


30

ここで波線はリンカー L への付着部位を示す、請求項 202 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

【請求項 213】

D が以下の構造を有する MMAF であり、



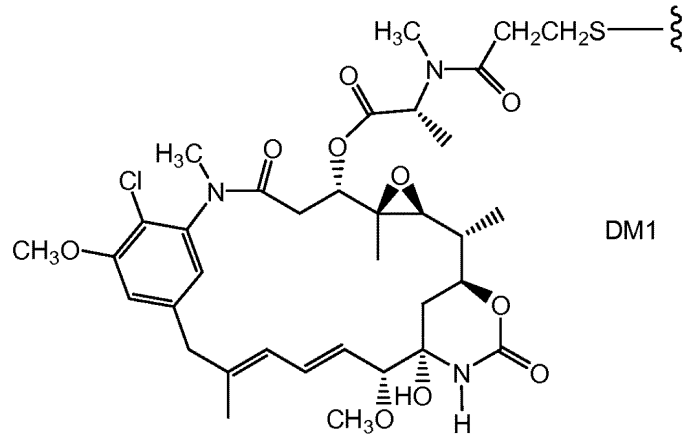
40

ここで波線はリンカー L への付着部位を示す、請求項 202 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

50

【請求項 2 1 4】

D が以下の構造を有する D M 1 であり、



10

ここで波線はリンカー L への付着部位を示す、請求項 2 0 2 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

20

【請求項 2 1 5】

親抗 C D 2 2 抗体が、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体および抗体断片から選択される、請求項 2 0 1 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

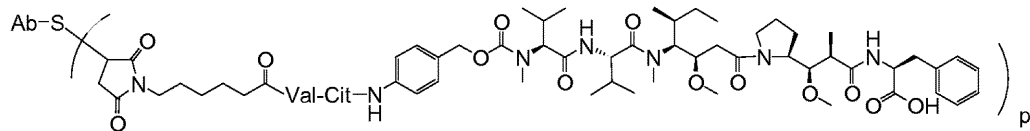
【請求項 2 1 6】

抗体断片が F a b 断片である、請求項 2 0 1 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物。

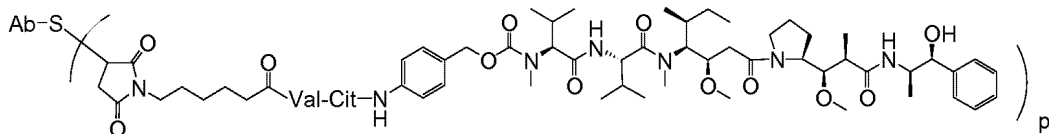
【請求項 2 1 7】

以下の構造から選択される抗体-薬剤コンジュゲート化合物であって、

30



Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE

40

ことを含むアッセイ。

【請求項 2 2 1】

細胞培養物培地中の哺乳類の癌性 B 細胞を請求項 2 0 1 に記載の抗体-薬剤コンジュゲート化合物によって処置することを含み、それによって癌性 B 細胞の増殖が抑制される、細胞の増殖を抑制する方法。

【請求項 2 2 2】

請求項 2 0 1 に記載の抗体-薬剤コンジュゲートと薬学的に許容可能な希釈液、担体又は賦形剤を含有してなる製薬的製剤。

【請求項 2 2 3】

患者に請求項 2 2 2 に記載の製薬的製剤を投与することを含む、癌の治療方法。

10

【請求項 2 2 4】

癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度 NHL、再発性中悪性度 NHL、再発性低悪性度 NHL、抵抗性 NHL、抵抗性低悪性度 NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項 2 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

患者に、抗体-薬剤コンジュゲート化合物と組み合わせた細胞障害性剤が投与される、請求項 2 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

20

請求項 2 2 0 に記載の製薬的製剤と、
容器と、

CD22 ポリペプチドの過剰発現に特徴がある癌を治療するために化合物が用いられることを示しているパッケージ挿入物又はラベルとを具備する製造品。

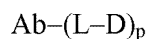
【請求項 2 2 7】

癌が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度 NHL、再発性中悪性度 NHL、再発性低悪性度 NHL、抵抗性 NHL、抵抗性低悪性度 NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項 2 2 6 に記載の製造品。

30

【請求項 2 2 8】

抗体-薬剤コンジュゲート化合物の作製方法であって、請求項 1 8 6 に記載の抗 CD 2 2 抗体(Ab)とアウリスタチン又はメイタンシノイドの薬剤成分(D)とを含んでなり、このとき抗体はリンカー成分(L)によって一又は複数の改変したシステインアミノ酸を介して D に付着しており、該化合物は以下の式 I を有し、



I

このとき p は 1、2、3 又は 4 であり、

40

(a) 抗体の改変したシステイン基をリンカー試薬と反応させて、抗体-リンカー中間生成物 Ab-L を形成させる工程と、

(b) Ab-L を活性化された薬剤成分 D と反応させ、それによって抗体-薬剤コンジュゲートが形成される工程

を含んでなるか、

または、

(c) 薬剤成分の求核基をリンカー試薬と反応させて、薬剤-リンカー中間生成物 D-L を形成する工程と、

(d) D-L を抗体の改変されたシステイン基と反応させて、それによって抗体-薬剤コンジュゲートが形成される工程

50

を含んでなる方法。

【請求項 2 2 9】

さらに、チャイニーズハムスター卵巣 (C H O) 細胞において抗体を発現させる工程を含んでなる、請求項 2 2 8 に記載の方法。

【請求項 2 3 0】

さらに、発現された抗体を還元剤にて処理する工程を含んでなる、請求項 2 2 9 に記載の方法。

【請求項 2 3 1】

還元剤が T C E P および D T T から選択される、請求項 2 3 0 に記載の方法。

【請求項 2 3 2】

さらに、還元剤にて処理した後に、発現された抗体を酸化剤で処理する工程を含んでなる、請求項 2 3 0 に記載の方法。

【請求項 2 3 3】

酸化剤が、硫酸銅、デヒドロアスコルビン酸および空気から選択される、請求項 2 3 2 に記載の方法。

【請求項 2 3 4】

抗体が、配列番号：8 8、9 2 又は 9 3 のいずれか一から選択される重鎖配列を含む、請求項 1 8 6 に記載の抗体。

【請求項 2 3 5】

抗体が配列番号：8 7 又は 9 1 から選択される軽鎖配列を含む、請求項 1 8 6 に記載の抗体。

【請求項 2 3 6】

抗体が、配列番号：8 7 の軽鎖配列と配列番号：9 2 の重鎖配列を含む、請求項 1 8 6 に記載の抗体。

【請求項 2 3 7】

抗体が、配列番号：8 7 の軽鎖配列と配列番号：9 3 の重鎖配列を含む、請求項 1 8 6 に記載の抗体。

【請求項 2 3 8】

抗体が、配列番号：9 1 の軽鎖配列と配列番号：8 8 の重鎖配列を含む、請求項 1 8 6 に記載の抗体。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

これは、米国特許法規則 1 . 5 3 (b) (1) に基づき出願した非仮出願であり、米国特許法 1 1 9 条 (e) に基づき、2 0 0 6 年 5 月 3 0 日に出願の米国仮特許出願第 6 0 / 8 0 9 3 2 8 号、2 0 0 7 年 3 月 2 9 日出願の米国仮特許出願第 6 0 / 9 0 8 9 4 1 号、及び 2 0 0 7 年 4 月 1 3 日出願の米国仮特許出願第 6 0 / 9 1 1 8 2 9 号の優先権を主張するものであり、その全体の開示内容が出典明記により本明細書に援用される。

本発明は抗 C D 2 2 抗体およびそのイムノコンジュゲートに関する。本発明はさらに、抗 C D 2 2 抗体およびそのイムノコンジュゲートを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

リンパ球は、造血過程の間に骨髄において生産される多種ある白血球のうちの 1 つである。リンパ球の 2 つの主な分類は、B リンパ球 (B 細胞) と T リンパ球 (T 細胞) である。ここで特に対象とするリンパ球は B 細胞である。

B 細胞は骨髄内で成熟して、その細胞表面上に抗原結合抗体を発現する骨髄を放出する。ナイーブ B 細胞がその膜結合性抗体に特異的な抗原と初めて遭遇すると、細胞は速やかに分化し、その子孫はメモリー B 細胞と「プラズマ細胞 (形質細胞、plasma cell) 」と呼ばれるエフェクター細胞に分化する。メモリー B 細胞は長い寿命を持ち、本来の親細胞と同じ特異性を有する膜結合性抗体を発現し続ける。プラズマ細胞は、膜結合性抗体を発現

10

20

30

40

50

する代わりに、分泌型抗体を産生する。分泌された抗体は、体液性免疫の主要なエフェクター分子である。

【 0 0 0 3 】

B細胞関連の疾患には、悪性のリンパ腫(非ホジキンリンパ腫、NHL)、多発性骨髄腫、及び慢性リンパ球性白血病(CLL、B細胞白血病(CD5+Bリンパ球))が含まれるが、これらに限定されるものではない。主にBリンパ球から生じる癌の異種のグループである非ホジキンリンパ腫(NHL)は、すべての新しく診断された癌のおよそ4%を占める(Jemal, A.等, CA-Cancer J Clin, 52: 23-47, (2002))。中悪性度NHLは、成人NHLのおよそ30~40%をしめており(Harris, N.L.等, Hematol. J. 1:53-66 (2001))、びまん性大B細胞リンパ腫(DLBCL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、末梢性T細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫が含まれる。最前線の組合せ化学療法により、中悪性度NHL患者の半分未満が治癒し、ほとんどの患者は結局この疾患により死亡する(Fisher, R.I. Semin. Oncol. 27(suppl 12): 2-8 (2000))。

また、B細胞関連の疾患には自己免疫性疾患が含まれる。自己免疫性疾患は以前としてヒトの臨床的に重要な疾患である。その名の通り、自己免疫性疾患は身体自体の免疫系により作用する。病理学的メカニズムは自己免疫性疾患の個々の種類で異なるが、ある一般的なメカニズムは、身体の内臓タンパク質に対する特定の抗体(本明細書中では自己反応性抗体又は自己抗体と称する)の結合を伴う。医師および科学者は、関節リウマチ、多発性硬化症、血管炎、免疫媒介性の糖尿病、及び全身性エリテマトーデスなどの狼瘡を含む70以上の臨床的に異なった自己免疫性疾患を同定している。多くの自己免疫性疾患は、全部で200000足らずの個体に罹患しているほど稀であるが、これらの疾患は何百万ものアメリカ人、つまり集団の約5パーセントを苦しめており、多くの疾患は女性に偏って発症している。これらの疾患は長引くため、社会的及び財政的に莫大な負担が生じる。

【 0 0 0 4 】

B細胞表面抗原を標的とする細胞障害性剤はB細胞関連の癌治療の重要な焦点である。あるB細胞表面抗原はCD20である。キメラ(マウス/ヒト)抗CD20モノクローナル抗体であるリツキシマブ(リツキサン; Genentech, Inc. (South San Francisco, CA)およびIDEC Pharmaceutical Corp. (San Diego, CA))は、再発性又は抵抗性の軽度又は濾胞性NHL (Leonard, J.P.等, Clin. Canc. Res. 10: 5327-5334 (2004))の治療のために米国食品医薬品局の承認を得た第一治療抗体であった。

他のB細胞抗原、例としてCD19、CD22およびCD52は、リンパ腫の治療となりうる治療の標的を表す(Grillo-Lopez A.J.等, Curr Pharm Biotechnol, 2:301-11, (2001))。CD22は、分化の成熟した段階のみにB細胞表面に発現される135kDaのB細胞に限定されるシアロ糖タンパク質である(Dorken, B.等, J. Immunol. 136:4470-4479 (1986))。ヒトのCD22の主な形態は、細胞外ドメインに7つのイムノグロブリンスーパーファミリドメインを含むCD22である(図1)(Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991))。変異形態であるCD22は、イムノグロブリンスーパーファミリドメイン3および4を欠いている(Stamenkovic, I. and Seed, B., Nature 345:74-77 (1990))。ヒトのCD22に対するリガンド結合は、イムノグロブリンスーパーファミリドメイン1および2(エピトープ1および2とも称する)と関係していることが示されている(Engel, P.等, J. Exp. Med. 181: 1581-1586, 1995)。

【 0 0 0 5 】

B細胞NHLにおいて、CD22発現は、中悪性度及び低悪性度の集団ではそれぞれ91%から99%まで変動する(Cesano, A.等, Blood 100:350a (2002))。CD22は、B細胞活性化複合体の構成成分として(Sato, S.等, Semin. Immunol. 10:287-296 (1998))、そして、接着分子として機能しうる(Engel, P.等, J. Immunol. 150:4719-4732 (1993))。CD22欠損マウスのB細胞は寿命がより短く、アポトーシスを亢進することから、B細胞生存におけるこの抗原の重要な役割が示唆される(Otipoby, K.L.等, Nature (Lond) 384:634-637 (1996))。その天然のリガンド(一又は複数)又は抗体との結合の後、CD

22 は急速に内部移行され、原発性 B 細胞の強力な共刺激シグナルと腫瘍性 B 細胞のプロアポトーシスシグナルを生じさせる (Sato, S. 等, *Immunity* 5:551-562 (1996))。

抗 CD 22 抗体は、B 細胞癌や他の B 細胞増殖性疾患のための可能性のある治療方法として研究されている。このような抗 CD 22 抗体には、RF B 4 (Mansfield, E. 等, *Blood* 90:2020-2026 (1997))、CMC-544 (DiJoseph, J.F., *Blood* 103:1807-1814 (2004)) および LL 2 (Pawlak-Byczkowska, E.J. 等, *Cancer Res.* 49: 4568-4577 (1989)) が含まれる。LL 2 抗体 (以前は HPB-2 と呼ばれる) は、CD 22 抗原に対する Ig G 2 a マウスモノクローナル抗体である (Pawlak-Byczkowska, E.J. 等 (1989), *supra*)。インビトロ免疫組織学的な評価により、LL 2 抗体が 51 の試験した B 細胞 NHL 試料のうちの 50 と反応するが、他の悪性腫瘍又は正常な非リンパ腫組織とは反応しないことが示された。

10

【0006】

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、つまり、癌の治療において腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局所運搬のために抗体-薬剤コンジュゲートを使う (Syrigos and Epinetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26: 151-172; 米国特許第 4 9 7 5 2 7 8 号) と、薬剤成分を腫瘍へ目的通りに運搬して、そこで細胞内蓄積させることが可能となる。コンジュゲートさせていない薬剤を全身投与すると、排除しようとする腫瘍細胞だけでなく正常な細胞に許容されないレベルの毒性が生じうる (Baldwin 等, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986): 603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pinchera 等 (ed.s), pp. 475-506)。したがって、毒性を最小限にした最大限の有効性が追求される。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はこれらの計画に有用であることが報告されている (Rowland 等, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。これらの方法に用いる薬剤には、ダウノマイシン、ドキソルピシン、メトトレキサートおよびビンデシンが含まれる (Rowland 等, *Cancer Immunol. Immunother.* 21:183-87 (1986))。抗体-毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、リシンなどの植物毒、ゲルダナマイシン (Kerr 等 (1997) *Bioconjugate Chem.* 8(6): 781-784; Mandler 等 (2000) *Journal of the Nat. Cancer Inst.* 92(19): 1573-1581; Mandler 等 (2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandler 等 (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、メイタンシノイド (欧州特許第 1 3 9 1 2 1 3 号; Liu 等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン (Lode 等, (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman 等, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342) などの小分子毒素が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA 結合又はトポイソメラーゼ阻害などの機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる (Meyer, D.L. and Senter, P.D. "Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy" in *Annual Reports in Medicinal Chemistry*, Vol 38 (2003) Chapter 23, 229-237)。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

20

30

【0007】

ゼバリン (ZEVALIN™) (イブリツモマブチウキセタン (ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idc) は正常及び悪性の B リンパ球の細胞表面上にみられる CD 20 抗原に対する マウス Ig G 1 モノクローナル抗体と ^{111}In 又は ^{90}Y 放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体-放射性同位体コンジュゲートである (Wiseman 等, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman 等, (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig 等, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig 等, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。ゼバリンは B 細胞非ホジキンリンパ球 (NHL) に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症かつ長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結した hu CD 33 抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートである マイロターゲット M (MYLOTARG) (登録商標) (ゲムツズマブオゾガミシン (gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Phar

40

50

maceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(Drugs of the Future (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号; 同第5585089号; 同第5606040号; 同第5693762号; 同第5739116号; 同第5767285号; 同第5773001号)。ジスルフィドリンカーSPPを介してメイタンシノイド薬剤成分DM1と連結しているhuc242抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immunogen, Inc.)は、CanAg抗原を発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に開発されている。メイタンシノイド薬剤成分DM1と連結している抗前立腺特異的膜抗原(PSMA)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるMLN-2704(Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。同じメイタンシノイド薬剤成分であるDM1は非ジスルフィドリンカーであるSMCCを介してマウスモノクローナル抗体であるTA.1に連結した(Chari等 (1992) Cancer Research 52:127-131)。このコンジュゲートは、対応するジスルフィドリンカーコンジュゲートの200分の1の強度であることが報告された。SMCCリンカーは本明細書中で「切断可能でない」と考えた。

10

【0008】

いくつかの短いペプチド化合物は海洋軟体類であるタツナミガイ(Dolabella auricularia)から単離され、生物学的な活性があることが明らかとされている(Pettit等 (1993) Tetrahedron 49:9151; Nakamura等 (1995) Tetrahedron Letters 36:5059-5062; Sone等 (1995) Journal Org Chem. 60:4474)。これらの化合物のアナログも調製されており、いくつかは生物学的な活性を有することが明らかとされた(概要については、Pettit等 (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277を参照のこと)。例えば、アウリスタチンE(米国特許第5635483号)は、海洋天然生成物ドラスタチン10(抗癌薬ピンクリスチンと同じチューブリン上の部位に結合してチューブリン重合を阻害する薬剤)の合成類似体である(G. R. Pettit, (1997) Prog. Chem. Org. Nat. Prod. 70:1-79)。ドラスタチン10、アウリスタチンPEおよびアウリスタチンEは4つのアミノ酸を有する直鎖状ペプチドであり、これらのうちの3つは化合物のドラスタチン類およびC末端アミドに特有である。

20

【0009】

アウリスタチンペプチドである、アウリスタチンE(AE)とドラスタチンの合成類似体であるモノメチルアウリスタチン(MMAE)は、(i) キメラモノクローナル抗体cBR96(カルチノーマ上のルイスYに特異的)、(ii) 血液の悪性腫瘍上のCD30に特異的であるcAC10(Klussman, 等 (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773; Doronina等 (2003) Nature Biotechnology 21(7): 778-784; "Monomethylvaline Compounds Capable of Conjugation to Ligands"; Francisco等 (2003) Blood 102(4): 1458-1465; 米国公開特許2004/0018194)、(iii) CD20発現癌および免疫不全の治療のためのリツキサ(登録商標)(リツキシマブ)(国際公開第04/032828号)などの抗CD20抗体、(iv) 結腸直腸癌の治療のための抗EphB2抗体2H9及び抗IL-8(Mao, 等 (2004) Cancer Research 64(3): 781-788)、(v) Eセレクチン抗体(Bhaskar等 (2003) Cancer Res. 63: 6387-6394)、及び(vi) 他の抗CD30抗体(国際公開第03/043583号)にコンジュゲートした。モノメチルアウリスタチン(MMAE)もまた、マウスとヒトの間で近い相同性を有するタイプ1TMチロシンキナーゼレセプターであり、結腸直腸癌細胞で過剰発現されるEphB2Rに対する抗体である2H9にコンジュゲートされた(Mao等 (2004) Cancer Res. 64: 781-788)。

30

40

C末端にフェニルアラニン(Phenylalanine)を有するアウリスタチンE(MMAE)の変異体であるモノメチルアウリスタチンMMAF(米国特許第5767237号; 米国特許第6124431号)は、MMAEより弱いですが、モノクローナル抗体にコンジュゲートした場合により強いことが報告されている(Senter等, Proceedings for the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004)。アウリスタチンFフェニレンジアミン(AFP); MMAEのフェニルアラニン変異体は、フェニレ

50

ンジアミンSpacerにより1F6のC末端を介して抗CD70mAbである1F6に連結した(Law等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 625, presented March 28, 2004)。

【0010】

また、抗CD22抗体-毒素コンジュゲートも可能性のある治療用化合物として研究されている。例えば、初期の報告では、潜在的な抗癌剤としての抗CD22に対するリシンA鎖を含有するイムノトキシンが記載された(May, R.D.等, Chemical Abstracts 106(21): 168656x pages 35-36 (1987); Ghetie, M.A.等, Cancer Research 48:2610-2617 (1988); 及びAmiot, P.L.等, Blood 82(9): 2624-2633 (1993))。毒素が放射性同位体である場合、LL2のヒト化(CDRを移植した)IgG1型であるエピラツズマブは、ラジオイ

10

【0011】

非ホジキンリンパ腫などのリンパ腫及び他のB細胞増殖性疾患などのB細胞関連の癌を治療するための更なる薬剤に対して当分野では需要がある。この目的のために特に有用な薬剤には、有意に毒性が低いが、有益な治療的有効性がある、B細胞を標的とした抗CD22抗体-薬剤コンジュゲートが含まれる。これら及び他の制限ないしは過去の問題点は本発明によって解決される。

20

本出願中のすべての文献の引用は、この文献が本出願の先行技術であることを認めるものではない。特許、特許出願および刊行物を含む本明細書中で引用したすべての文献は、出典明記によってこれらの全体を援用する。

【発明の概要】

【0012】

本発明は抗CD22抗体およびその使用方法を提供する。

一態様では、CD22に結合する抗体であって、

- (1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (3) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (4) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (5) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、
- (6) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

30

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含んでなる抗体が提供される。

他の態様では、CD22に結合する抗体は、(a) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(b)

- (1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (3) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (4) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、
- (6) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

40

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのHVRとを含んでなる。

【0013】

他の態様では、CD22に結合する抗体は、(a) 配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(b)

- (1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (3) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (4) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、

50

(6) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのHVRとを含んでなる。

他の態様では、CD22に結合する抗体は、(a) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(b)

(1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、

(2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、

(3) 配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、

(4) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、

(5) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのHVRとを含んでなる。

他の態様では、CD22に結合する抗体は、(a) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(b)

(1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、

(2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、

(3) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-L1、

(4) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、

(5) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのHVRとを含んでなる。

【0014】

一実施態様では、抗体は、配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-L1を含んでなる。一実施態様では、抗体はさらに、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2とを含んでなる。一実施態様では、抗体はさらに、配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含んでなる。

ある実施態様では、前記の抗体のいずれかはさらに、VHサブグループIIIコンセンサスフレームワークおよびVLサブグループIコンセンサスフレームワークから選択される少なくとも1つのフレームワークを含んでなる。

一態様では、CD22に結合する抗体であって、配列番号：16のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインを含んでなる抗体が提供される。一実施態様では、抗体は配列番号：16の重鎖可変ドメインを含んでなる。

一態様では、抗体はさらに、配列番号：17のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は配列番号：17の軽鎖可変ドメインを含んでなる。

一態様では、抗体はさらに、配列番号：18のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%又は少なくとも99%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は配列番号：18の軽鎖可変ドメインを含んでなる。

一実施態様では、抗体は、配列番号：16のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：17のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、抗体は、配列番号：16のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なく

10

20

30

40

50

とも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列同一性を有する重鎖可変ドメインと、配列番号：18のアミノ酸配列に、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列同一性を有する軽鎖可変ドメインを含んでなる。一実施態様では、重鎖可変ドメインは配列番号：16のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号：17のアミノ酸配列を含む。一実施態様では、重鎖可変ドメインは配列番号：16のアミノ酸配列を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号：18のアミノ酸配列を含む。

10

【0015】

ある実施態様では、前記の抗体のいずれかをコードするポリヌクレオチドが提供される。一実施態様では、ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。一実施態様では、ベクターを含む宿主細胞が提供される。一実施態様では、宿主細胞は真核細胞である。一実施態様では、宿主細胞はチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞である。一実施態様では、抗体をコードするポリヌクレオチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、抗体を単離することを含んでなる、抗CD22抗体の作製方法が提供される。

一態様では、細胞の表面に発現されるCD22に結合する抗体が提供される。一実施態様では、抗体は、ドメイン1又はドメイン2又はドメイン1と2を含むヒト又はマウスのCD22の領域内のエピトープに結合する。一実施態様では、細胞は哺乳類の細胞である。一実施態様では、細胞はヒト細胞である。一実施態様では、細胞は癌細胞である。一実施態様では、細胞はB細胞である。一実施態様では、癌細胞はB細胞である。

20

ある実施態様では、前記いずれかの抗体はモノクローナル抗体である。一実施態様では、抗体は、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv又は(Fab')₂断片から選択される抗体断片である。一実施態様では、抗体はヒト化される。一実施態様では、抗体はヒトである。

【0016】

一態様では、CD22への抗体の結合に許容される条件下で前記いずれかの抗体に生体試料を接触させ、抗体とCD22との間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む、生体試料中のCD22の存在を検出する方法が提供される。一実施態様では、生体試料はB細胞を含む。一実施態様では、生体試料は、B細胞障害及び/又はB細胞増殖性疾患、例えば限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマンツル細胞リンパ腫に罹っている哺乳動物又は罹っていると疑われる哺乳動物のものである。

30

一態様では、CD22の発現増加と関係している細胞増殖性疾患を診断する方法であって、前記いずれかの抗体に試験細胞を接触させ、CD22への抗体の結合を検出することによってCD22の発現レベルを決定し、そして、試験細胞によるCD22の発現のレベルをコントロール細胞によるCD22の発現のレベルと比較することを含み、コントロール細胞と比較して試験細胞によるCD22の発現レベルが高い場合に、CD22の発現増加と関係する細胞増殖性疾患の存在が示される方法が提供される。一実施態様では、試験細胞は、B細胞増殖性疾患などの細胞増殖性疾患があると疑われる患者のものである。一実施態様では、細胞増殖性疾患は、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマンツル細胞リンパ腫などの、B細胞障害から選択される。一実施態様では、前記方法は、試験細胞の表面上のCD22の発現レベルを決定して、試験細胞の表面上のCD22の発現レベルをコントロール細胞の表面上のCD22の発現レベルと比較することを含んでなる。

40

50

【 0 0 1 7 】

一態様では、C D 2 2 を発現する B 細胞などの細胞の増加に関連する細胞増殖性疾患を診断する方法であって、生体試料中の試験細胞を前記いずれかの抗体と接触させて、C D 2 2 への抗体の結合を検出することによって、試料中の試験細胞に結合した抗体のレベルを決定し、そして、コントロール試料中の細胞に結合した抗体のレベルを比較することを含み、結合した抗体のレベルを、試験試料とコントロール試料中の C D 2 2 発現細胞の数に正規化し、コントロール試料と比較して試験試料中で結合した抗体のレベルが高い場合に、C D 2 2 を発現する細胞と関連する細胞増殖性疾患の存在が示される方法が提供される。

一態様では、血液又は血清中の可溶性 C D 2 2 を検出する方法であって、B 細胞増殖性疾患に罹っていることが疑われる哺乳動物の血液又は血清の試験試料を本発明の抗 C D 2 2 抗体と接触させ、そして、正常哺乳動物の血液又は血清のコントロール試料と比べて試験試料中の可溶性 C D 2 2 が増加していることを検出することを含む方法が提供される。ある実施態様では、検出する方法は、哺乳動物の血液又は血清中の可溶性 C D 2 2 の増加と関連する B 細胞増殖性疾患を診断する方法として有用である。

【 0 0 1 8 】

一態様では、本発明の抗体は、国際公開第 2 0 0 6 / 0 3 4 4 8 8 (本明細書において出典明記によって全体が援用される)に開示されるように、親抗体の一又は複数のアミノ酸が遊離したシステインアミノ酸に置換されるシステイン改変抗体を包含する。したがって、抗 C D 2 2 抗体のいずれかの形態が改変、すなわち変異されてもよい。例えば、親 F a b 抗体断片を改変して、本明細書中で「T h i o F a b」と称するシステイン改変 F a b を形成してもよい。同様に、親のモノクローナル抗体を改変して、「T h i o M a b」を形成してもよい。単一の部位突然変異により T h i o F a b の単一の改変したシステイン残基が生じるのに対して、I g G 抗体の二量体の性質のために T h i o M a b では、単一の部位突然変異により 2 つの改変したシステイン残基が生じる。本発明のシステイン改変抗 C D 2 2 抗体には、主に細胞関連の C D 2 2 ポリペプチドを結合するモノクローナル抗体、ヒト化ないしはキメラのモノクローナル抗体、および抗体の抗原結合断片、融合ポリペプチドおよびアナログが含まれる。あるいは、システイン改変抗体は、必ずしも親抗体を変える必要はなく、例えばファージディスプレイ抗体の設定や選別によって、又は軽鎖及び/又は重鎖フレームワーク配列と定常領域のデノボ設定によって、抗体の配列設定及び/又は選別により生じる、抗体又は F a b の本明細書において開示される位置にシステインを含む抗体を包含する。システイン改変抗体は、0 . 6 ~ 1 . 0、0 . 7 ~ 1 . 0 又は 0 . 8 ~ 1 . 0 の範囲のチオール反応値を有する一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含む。遊離したシステインアミノ酸は、親抗体内で改変されているシステイン残基であり、ジスルフィド架橋の一部でない。システイン改変抗体は、例えばマレイミド又はハロアセチルによる改変されたシステインの部位での、細胞障害性化合物および/または造影(イメージング)化合物の接着に有用である。C y s 残基のチオール官能基のマレイミド基に対する求核反応性は、リジン残基のアミノ基又は N 末端アミノ基などのタンパク質の任意の他のアミノ酸官能基の、およそ 1 0 0 0 倍である。ヨードアセチルおよびマレイミド試薬のチオール特異的官能基はアミン基と反応するが、より高い p H (> 9 . 0) およびより長い反応時間が必要とされるであろう必要かもしれない(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。

【 0 0 1 9 】

ある実施態様では、本発明のシステイン改変抗 C D 2 2 抗体は以下のいずれか一の位置に改変したシステインを含み、この位置は、軽鎖ではカバット等(Kabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MDを参照)に従った、重鎖(Fc領域を含む)では E U 番号付け(上掲のKabat等(1991)を参照)に従った数であり、図 1 7 A の下線で示す軽鎖定常領域は位置 1 0 8 (カバット番号付け)で始まり、図 1 7 B および 1 7 C の下線で示す重鎖定常領域は位置 1 1 8 (E U 番号付け)で始まる。また、位置は、図 1 7 A ~ 1 7 C に

10

20

30

40

50

示す完全長軽鎖ないしは重鎖のアミノ酸を順次番号付けする際にその位置で表されてもよい。本発明の一実施態様では、抗CD22抗体は、LC-V205Cに改変されたシステインを含む(カバット番号：Val205、図17Aの順次番号210はその位置でCysになるように改変される)。軽鎖の改変されたシステインを図17Aにおいて太字の二重線で示す。一実施態様では、抗CD22抗体は、HC-A118Cに改変されたシステインを含む(EU番号：A1a118、図17Bの順次番号121はその位置でCysになるように改変される)。重鎖の改変されたシステインを図17Bにおいて太字の二重線で示す。一実施態様では、抗CD22抗体は、Fc-S400Cに改変されたシステインを含む(EU番号：Ser400、図17Cの順次番号403はその位置でCysになるように改変される)。重鎖のFc領域の改変されたシステインを図17Cにおいて太字の二重下線で示す。他の実施態様では、重鎖(Fc領域を含む)の改変したシステインは、(EU番号付けによる)41、88、116、118、120、171、282、375又は400のうちいずれか一の位置にある。ゆえに、本発明の親の抗CD22抗体のこれらの位置のアミノ酸の変化は、A41C、A88C、S116C、A118C、T120C、A171C、V282C、S375C又はS400Cである。他の実施態様では、軽鎖の改変されたシステインは、(カバット番号付けによる)15、43、110、144、168、205のいずれか一の位置にある。ゆえに、本発明の親の抗CD22抗体のこれらの位置のアミノ酸の変化は、V15C、A43C、V110C、A144C、S168C又はV205Cである。

10

20

【0020】

システイン改変抗CD22抗体は一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を含み、該システイン改変抗CD22抗体がCD22ポリペプチドに結合するものであり、親の抗CD22抗体の一又は複数のアミノ酸残基をシステインに置換することを含む方法によって調製され、このとき該親抗体が以下から選択される少なくとも一つのHVR配列を含むものである。

- (a) HVR-L1配列 RSSQSIVHSNGNTFLE(配列番号：9)又は配列 RSSQSIVHSVGNNTFLE(配列番号：10)(図2B)、
- (b) HVR-L2配列 KVS N R F S 配列番号：12(図2B)、
- (c) HVR-L3配列 FQGSQFPYT(配列番号：14)(図2B)、
- (d) HVR-H1配列 GYEF S R S W M N(配列番号：2)(図2A)、
- (e) HVR-H2配列 GRIYPGDGDTNYS GKFKG(配列番号：4(図2A)、及び(f) HVR-H3配列 DGS SWD W Y F D V(配列番号：6)(図2A)。

30

ある態様では、本発明は、本明細書において開示した完全長アミノ酸配列を有するシステイン改変抗体、又は本明細書において開示したシグナルペプチドを欠くシステイン改変抗体アミノ酸配列に対して、少なくともおよそ80%のアミノ酸配列同一性、あるいは少なくともおよそ81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、システイン改変抗CD22抗体に関する。

【0021】

40

より更なる態様では、本発明は、(a) 本明細書に開示した完全長アミノ酸配列を有するシステイン改変抗体、(b) 本明細書に開示したシグナルペプチドを欠くシステイン改変抗体アミノ酸配列、(c) 本明細書に開示した、シグナルペプチドを持つ又は持たない、膜貫通型システイン改変抗体タンパク質の細胞外ドメイン、(d) 本明細書に開示したいずれかの核酸配列によってコードされるアミノ酸配列、又は(e) 本明細書に開示した完全長システイン改変抗体アミノ酸配列の任意の他の特異的に定義される断片、をコードするDNA分子の相補鎖にハイブリダイズするヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列を含む、単離されたシステイン改変抗CD22抗体に関する。

特定の態様では、本発明は、N末端シグナル配列を持たないおよび/または開始メチオニンを持たない単離されたシステイン改変抗CD22抗体を提供し、この抗体は本明細書

50

中に記載のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列によってコードされる。本明細書中ではまた、前記抗体を産生する方法を記載しており、これらの方法は、システイン改変抗体の発現に適切な条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からシステイン改変抗体を回収することを含んでなる。

本発明の他の態様では、膜貫通ドメインを削除するか膜貫通ドメインを不活性化してある単離されたシステイン改変抗CD22抗体を提供する。本明細書中ではまた、前記抗体を産生する方法を記載しており、これらの方法は、システイン改変抗体の発現に適切な条件下で適切なコード化核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞を培養し、細胞培養物からシステイン改変抗体を回収することを含んでなる。

【0022】

他の実施態様では、本発明は、異種性(非CD22)のポリペプチドに融合させた、本明細書中に記載したいずれかのシステイン改変抗体を含む、単離された抗CD22キメラシステイン改変抗体を提供する。このようなキメラ分子の例は、例えばエピトープタグ配列又はイムノグロブリンのFc領域などの異種性のポリペプチドに融合させた、本明細書中に記載したいずれかのシステイン改変抗体を含む。

システイン改変抗CD22抗体は、それぞれの抗原エピトープへの抗CD22ポリペプチド抗体の結合を競合的に阻害するモノクローナル抗体、抗体断片、キメラ抗体、ヒト化抗体、単鎖抗体又は抗体であってもよい。本発明の抗体は場合によって、例えばアウリスタチン、抗生物質、放射性同位体、核酸分解性の酵素などを含む毒素などの増殖阻害性剤ないしは細胞障害性剤にコンジュゲートさせてもよい。本発明の抗体は場合によって、CHO細胞又は細菌内で産生され、結合する細胞の成長ないし増殖を阻害するか、又は死を誘導することが好ましい。診断目的のために、本発明の抗体は、固体担体などに付着して検出可能に標識されてもよい。

本発明の他の実施態様では、本発明は、本明細書中に記載したいずれかの抗CD22抗体及び抗CD22システイン改変抗体をコードするDNAを含むベクターを提供する。また、このいずれかのベクターを含む宿主細胞も提供される。例として、宿主細胞は、CHO細胞、大腸菌細胞又は酵母であってもよい。さらに、本明細書中に記載のいずれかのポリペプチドを産生するための方法が提供され、所望のポリペプチドの発現に適切な条件下で宿主細胞を培養し、細胞培養物から所望のポリペプチドを回収することを含んでなる。

【0023】

システイン改変抗体は癌の治療において有用であり、細胞表面および膜貫通型レセプター、および腫瘍関連抗原(TAA)に特異的な抗体が含まれる。このような抗体は、ネイキッド抗体(薬剤又は標識成分にコンジュゲートしていない)として、あるいは抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)として用いられてもよい。本発明のシステイン改変抗体は、チオール反応性の試薬と、部位特異的かつ効率的にカップリングしうる。チオール反応性の試薬は、多機能リンカー試薬、キャプチャー標識試薬、蛍光体試薬又は薬剤-リンカー中間生成物であってもよい。システイン改変抗体は、検出可能な標識により標識され、固相担体に固定され、および/または、薬剤成分とコンジュゲートされもよい。L-10からL-20、L-38からL-48、L-105からL-115、L-139からL-149、L-163からL-173のアミノ酸範囲から選択される軽鎖の範囲内、及びH-35からH-45、H-83からH-93、H-114からH-127、及びH-170からH-184のアミノ酸範囲から選択される重鎖の範囲内、及びH-268からH-291、H-319からH-344、H-370からH-380、及びH-395からH-405から選択される範囲内のFc領域において、反応性のシステインアミノ酸によるアミノ酸の置換を持つ抗体に対してチオール反応が生じうる。このとき、アミノ酸位の番号付けはカバット番号付けシステム(Kabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)の位置1から始め、その後は国際公開第2006034488号に開示されるように、順次続ける。また、チオール反応は、抗体の特定のドメイン、例えば軽鎖定常ドメイン(CL)および重鎖定常ドメイン、CH1、CH2およびCH3に対して生じうる。0.6以上のチオール反応値となるシステイ

10

20

30

40

50

ン置換は、インタクト抗体、つまり I g G サブクラス I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A および I g A 2 を含む I g A、I g D、I g E、I g G および I g M の重鎖定常ドメイン、および μ にあってもよい。このような抗体およびそれらの使用は、国際公開第 2 0 0 6 / 0 3 4 4 8 8 号に開示される。

【 0 0 2 4 】

本発明のシステイン改変抗体は、それらの野生型、親抗体相当物の抗原結合能を保持するのが好ましい。ゆえに、システイン改変抗体は、抗原へ結合することができる、好ましくは抗原に特異性がある。このような抗原には、例えば、腫瘍関連抗原 (T A A)、細胞表面レセプタータンパク質および他の細胞表面分子、膜貫通タンパク質、シグナル伝達タンパク質、細胞生存調節因子、細胞増殖調節因子、組織発達又は分化に関連する(例えば機能的に寄与することが公知であるか又は予測される)分子、リンホカイン、サイトカイン、細胞周期調節に伴う分子、脈管形成に伴う分子、および血管新生に関連する(例えば機能的に寄与することが公知であるか又は予測される)分子が含まれる。腫瘍関連抗原は、クラスター分化因子(すなわち、C D 2 2 を含むがこれに限定しない C D タンパク質)であってもよい。本発明のシステイン改変抗 C D 2 2 抗体は、それらの親抗 C D 2 2 抗体相当物の抗原結合能を保持する。ゆえに、本発明のシステイン改変抗 C D 2 2 抗体は、B 細胞などの細胞の表面上に抗原が発現される場合を含め、ヒトの抗 C D 2 2 アイソフォームおよび/または を含む C D 2 2 抗原に結合することができ、好ましくはそれに対して特異性を有する。

本発明の抗体は、反応基が例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性のコンジュゲートパートナーである場合に、他のチオール反応性剤にコンジュゲートされもよい(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。パートナーは、細胞障害性剤(例えばドキシソルピシン又は百日咳毒素などの毒素)、蛍光体、例としてフルオレセイン又はローダミンのような蛍光色素、造影又は放射線治療用金属のためのキレート剤、ペプチジル又は非ペプチジル標識又は検出用タグ、又は様々なアイソフォームのポリエチレングリコールなどのクリアランス-改善剤、第三成分に結合するペプチド、又は他の炭水化物又は親油性剤であってもよい。

【 0 0 2 5 】

一態様では、本発明の抗体は、反応性成分、活性化成分、又は反応性システインチオール基によって抗体に共有結合して付着されうる標識成分とコンジュゲートされてもよい(Singh等 (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL)。付着された標識は、(i) 検出可能なシグナルを提供する、(ii) 第二標識と反応して、例えば F R E T (蛍光共鳴エネルギー転移)が生じるように第一又は第二標識によって生じる検出可能なシグナルを改変する、(iii) 抗原又はリガンドとの相互作用を安定させるかまたは結合の親和性を増加する、(iv) 電荷、疎水性、形状又は他の物理学的なパラメータによって可動性、例えば電気泳動易動度又は細胞透過性に作用する、又は(v) キャプチャー成分を与えて、リガンド親和性、抗体/抗原結合又はイオン錯体形成を調節する、ように機能しうる。

【 0 0 2 6 】

標識したシステイン改変抗体は、例えば、特定の細胞、組織又は血清における対象の抗原の発現を検出するための診断的検査法に有用となりうる。診断用適用のために、抗体は一般的に検出可能な成分により標識されるであろう。多くの標識が利用可能であり、通常、以下のカテゴリに分類することができる：

ラジオアイソトープ(放射性核種)、例えば ^3H 、 ^{11}C 、 ^{14}C 、 ^{18}F 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{147}Sm 、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 、 ^{227}Ac 、 ^{228}Ac 、 ^{228}Ra 、 ^{228}Th 、 ^{232}Th 、 ^{235}U 、 ^{238}U 、 ^{241}Am 、 ^{244}Cm 、 ^{252}Cf 、 ^{254}Cf 、 ^{255}Cf 、 ^{256}Cf 、 ^{257}Cf 、 ^{258}Cf 、 ^{259}Cf 、 ^{260}Cf 、 ^{261}Cf 、 ^{262}Cf 、 ^{263}Cf 、 ^{264}Cf 、 ^{265}Cf 、 ^{266}Cf 、 ^{267}Cf 、 ^{268}Cf 、 ^{269}Cf 、 ^{270}Cf 、 ^{271}Cf 、 ^{272}Cf 、 ^{273}Cf 、 ^{274}Cf 、 ^{275}Cf 、 ^{276}Cf 、 ^{277}Cf 、 ^{278}Cf 、 ^{279}Cf 、 ^{280}Cf 、 ^{281}Cf 、 ^{282}Cf 、 ^{283}Cf 、 ^{284}Cf 、 ^{285}Cf 、 ^{286}Cf 、 ^{287}Cf 、 ^{288}Cf 、 ^{289}Cf 、 ^{290}Cf 、 ^{291}Cf 、 ^{292}Cf 、 ^{293}Cf 、 ^{294}Cf 、 ^{295}Cf 、 ^{296}Cf 、 ^{297}Cf 、 ^{298}Cf 、 ^{299}Cf 、 ^{300}Cf 、 ^{301}Cf 、 ^{302}Cf 、 ^{303}Cf 、 ^{304}Cf 、 ^{305}Cf 、 ^{306}Cf 、 ^{307}Cf 、 ^{308}Cf 、 ^{309}Cf 、 ^{310}Cf 、 ^{311}Cf 、 ^{312}Cf 、 ^{313}Cf 、 ^{314}Cf 、 ^{315}Cf 、 ^{316}Cf 、 ^{317}Cf 、 ^{318}Cf 、 ^{319}Cf 、 ^{320}Cf 、 ^{321}Cf 、 ^{322}Cf 、 ^{323}Cf 、 ^{324}Cf 、 ^{325}Cf 、 ^{326}Cf 、 ^{327}Cf 、 ^{328}Cf 、 ^{329}Cf 、 ^{330}Cf 、 ^{331}Cf 、 ^{332}Cf 、 ^{333}Cf 、 ^{334}Cf 、 ^{335}Cf 、 ^{336}Cf 、 ^{337}Cf 、 ^{338}Cf 、 ^{339}Cf 、 ^{340}Cf 、 ^{341}Cf 、 ^{342}Cf 、 ^{343}Cf 、 ^{344}Cf 、 ^{345}Cf 、 ^{346}Cf 、 ^{347}Cf 、 ^{348}Cf 、 ^{349}Cf 、 ^{350}Cf 、 ^{351}Cf 、 ^{352}Cf 、 ^{353}Cf 、 ^{354}Cf 、 ^{355}Cf 、 ^{356}Cf 、 ^{357}Cf 、 ^{358}Cf 、 ^{359}Cf 、 ^{360}Cf 、 ^{361}Cf 、 ^{362}Cf 、 ^{363}Cf 、 ^{364}Cf 、 ^{365}Cf 、 ^{366}Cf 、 ^{367}Cf 、 ^{368}Cf 、 ^{369}Cf 、 ^{370}Cf 、 ^{371}Cf 、 ^{372}Cf 、 ^{373}Cf 、 ^{374}Cf 、 ^{375}Cf 、 ^{376}Cf 、 ^{377}Cf 、 ^{378}Cf 、 ^{379}Cf 、 ^{380}Cf 、 ^{381}Cf 、 ^{382}Cf 、 ^{383}Cf 、 ^{384}Cf 、 ^{385}Cf 、 ^{386}Cf 、 ^{387}Cf 、 ^{388}Cf 、 ^{389}Cf 、 ^{390}Cf 、 ^{391}Cf 、 ^{392}Cf 、 ^{393}Cf 、 ^{394}Cf 、 ^{395}Cf 、 ^{396}Cf 、 ^{397}Cf 、 ^{398}Cf 、 ^{399}Cf 、 ^{400}Cf 、 ^{401}Cf 、 ^{402}Cf 、 ^{403}Cf 、 ^{404}Cf 、 ^{405}Cf 、 ^{406}Cf 、 ^{407}Cf 、 ^{408}Cf 、 ^{409}Cf 、 ^{410}Cf 、 ^{411}Cf 、 ^{412}Cf 、 ^{413}Cf 、 ^{414}Cf 、 ^{415}Cf 、 ^{416}Cf 、 ^{417}Cf 、 ^{418}Cf 、 ^{419}Cf 、 ^{420}Cf 、 ^{421}Cf 、 ^{422}Cf 、 ^{423}Cf 、 ^{424}Cf 、 ^{425}Cf 、 ^{426}Cf 、 ^{427}Cf 、 ^{428}Cf 、 ^{429}Cf 、 ^{430}Cf 、 ^{431}Cf 、 ^{432}Cf 、 ^{433}Cf 、 ^{434}Cf 、 ^{435}Cf 、 ^{436}Cf 、 ^{437}Cf 、 ^{438}Cf 、 ^{439}Cf 、 ^{440}Cf 、 ^{441}Cf 、 ^{442}Cf 、 ^{443}Cf 、 ^{444}Cf 、 ^{445}Cf 、 ^{446}Cf 、 ^{447}Cf 、 ^{448}Cf 、 ^{449}Cf 、 ^{450}Cf 、 ^{451}Cf 、 ^{452}Cf 、 ^{453}Cf 、 ^{454}Cf 、 ^{455}Cf 、 ^{456}Cf 、 ^{457}Cf 、 ^{458}Cf 、 ^{459}Cf 、 ^{460}Cf 、 ^{461}Cf 、 ^{462}Cf 、 ^{463}Cf 、 ^{464}Cf 、 ^{465}Cf 、 ^{466}Cf 、 ^{467}Cf 、 ^{468}Cf 、 ^{469}Cf 、 ^{470}Cf 、 ^{471}Cf 、 ^{472}Cf 、 ^{473}Cf 、 ^{474}Cf 、 ^{475}Cf 、 ^{476}Cf 、 ^{477}Cf 、 ^{478}Cf 、 ^{479}Cf 、 ^{480}Cf 、 ^{481}Cf 、 ^{482}Cf 、 ^{483}Cf 、 ^{484}Cf 、 ^{485}Cf 、 ^{486}Cf 、 ^{487}Cf 、 ^{488}Cf 、 ^{489}Cf 、 ^{490}Cf 、 ^{491}Cf 、 ^{492}Cf 、 ^{493}Cf 、 ^{494}Cf 、 ^{495}Cf 、 ^{496}Cf 、 ^{497}Cf 、 ^{498}Cf 、 ^{499}Cf 、 ^{500}Cf 、 ^{501}Cf 、 ^{502}Cf 、 ^{503}Cf 、 ^{504}Cf 、 ^{505}Cf 、 ^{506}Cf 、 ^{507}Cf 、 ^{508}Cf 、 ^{509}Cf 、 ^{510}Cf 、 ^{511}Cf 、 ^{512}Cf 、 ^{513}Cf 、 ^{514}Cf 、 ^{515}Cf 、 ^{516}Cf 、 ^{517}Cf 、 ^{518}Cf 、 ^{519}Cf 、 ^{520}Cf 、 ^{521}Cf 、 ^{522}Cf 、 ^{523}Cf 、 ^{524}Cf 、 ^{525}Cf 、 ^{526}Cf 、 ^{527}Cf 、 ^{528}Cf 、 ^{529}Cf 、 ^{530}Cf 、 ^{531}Cf 、 ^{532}Cf 、 ^{533}Cf 、 ^{534}Cf 、 ^{535}Cf 、 ^{536}Cf 、 ^{537}Cf 、 ^{538}Cf 、 ^{539}Cf 、 ^{540}Cf 、 ^{541}Cf 、 ^{542}Cf 、 ^{543}Cf 、 ^{544}Cf 、 ^{545}Cf 、 ^{546}Cf 、 ^{547}Cf 、 ^{548}Cf 、 ^{549}Cf 、 ^{550}Cf 、 ^{551}Cf 、 ^{552}Cf 、 ^{553}Cf 、 ^{554}Cf 、 ^{555}Cf 、 ^{556}Cf 、 ^{557}Cf 、 ^{558}Cf 、 ^{559}Cf 、 ^{560}Cf 、 ^{561}Cf 、 ^{562}Cf 、 ^{563}Cf 、 ^{564}Cf 、 ^{565}Cf 、 ^{566}Cf 、 ^{567}Cf 、 ^{568}Cf 、 ^{569}Cf 、 ^{570}Cf 、 ^{571}Cf 、 ^{572}Cf 、 ^{573}Cf 、 ^{574}Cf 、 ^{575}Cf 、 ^{576}Cf 、 ^{577}Cf 、 ^{578}Cf 、 ^{579}Cf 、 ^{580}Cf 、 ^{581}Cf 、 ^{582}Cf 、 ^{583}Cf 、 ^{584}Cf 、 ^{585}Cf 、 ^{586}Cf 、 ^{587}Cf 、 ^{588}Cf 、 ^{589}Cf 、 ^{590}Cf 、 ^{591}Cf 、 ^{592}Cf 、 ^{593}Cf 、 ^{594}Cf 、 ^{595}Cf 、 ^{596}Cf 、 ^{597}Cf 、 ^{598}Cf 、 ^{599}Cf 、 ^{600}Cf 、 ^{601}Cf 、 ^{602}Cf 、 ^{603}Cf 、 ^{604}Cf 、 ^{605}Cf 、 ^{606}Cf 、 ^{607}Cf 、 ^{608}Cf 、 ^{609}Cf 、 ^{610}Cf 、 ^{611}Cf 、 ^{612}Cf 、 ^{613}Cf 、 ^{614}Cf 、 ^{615}Cf 、 ^{616}Cf 、 ^{617}Cf 、 ^{618}Cf 、 ^{619}Cf 、 ^{620}Cf 、 ^{621}Cf 、 ^{622}Cf 、 ^{623}Cf 、 ^{624}Cf 、 ^{625}Cf 、 ^{626}Cf 、 ^{627}Cf 、 ^{628}Cf 、 ^{629}Cf 、 ^{630}Cf 、 ^{631}Cf 、 ^{632}Cf 、 ^{633}Cf 、 ^{634}Cf 、 ^{635}Cf 、 ^{636}Cf 、 ^{637}Cf 、 ^{638}Cf 、 ^{639}Cf 、 ^{640}Cf 、 ^{641}Cf 、 ^{642}Cf 、 ^{643}Cf 、 ^{644}Cf 、 ^{645}Cf 、 ^{646}Cf 、 ^{647}Cf 、 ^{648}Cf 、 ^{649}Cf 、 ^{650}Cf 、 ^{651}Cf 、 ^{652}Cf 、 ^{653}Cf 、 ^{654}Cf 、 ^{655}Cf 、 ^{656}Cf 、 ^{657}Cf 、 ^{658}Cf 、 ^{659}Cf 、 ^{660}Cf 、 ^{661}Cf 、 ^{662}Cf 、 ^{663}Cf 、 ^{664}Cf 、 ^{665}Cf 、 ^{666}Cf 、 ^{667}Cf 、 ^{668}Cf 、 ^{669}Cf 、 ^{670}Cf 、 ^{671}Cf 、 ^{672}Cf 、 ^{673}Cf 、 ^{674}Cf 、 ^{675}Cf 、 ^{676}Cf 、 ^{677}Cf 、 ^{678}Cf 、 ^{679}Cf 、 ^{680}Cf 、 ^{681}Cf 、 ^{682}Cf 、 ^{683}Cf 、 ^{684}Cf 、 ^{685}Cf 、 ^{686}Cf 、 ^{687}Cf 、 ^{688}Cf 、 ^{689}Cf 、 ^{690}Cf 、 ^{691}Cf 、 ^{692}Cf 、 ^{693}Cf 、 ^{694}Cf 、 ^{695}Cf 、 ^{696}Cf 、 ^{697}Cf 、 ^{698}Cf 、 ^{699}Cf 、 ^{700}Cf 、 ^{701}Cf 、 ^{702}Cf 、 ^{703}Cf 、 ^{704}Cf 、 ^{705}Cf 、 ^{706}Cf 、 ^{707}Cf 、 ^{708}Cf 、 ^{709}Cf 、 ^{710}Cf 、 ^{711}Cf 、 ^{712}Cf 、 ^{713}Cf 、 ^{714}Cf 、 ^{715}Cf 、 ^{716}Cf 、 ^{717}Cf 、 ^{718}Cf 、 ^{719}Cf 、 ^{720}Cf 、 ^{721}Cf 、 ^{722}Cf 、 ^{723}Cf 、 ^{724}Cf 、 ^{725}Cf 、 ^{726}Cf 、 ^{727}Cf 、 ^{728}Cf 、 ^{729}Cf 、 ^{730}Cf 、 ^{731}Cf 、 ^{732}Cf 、 ^{733}Cf 、 ^{734}Cf 、 ^{735}Cf 、 ^{736}Cf 、 ^{737}Cf 、 ^{738}Cf 、 ^{739}Cf 、 ^{740}Cf 、 ^{741}Cf 、 ^{742}Cf 、 ^{743}Cf 、 ^{744}Cf 、 ^{745}Cf 、 ^{746}Cf 、 ^{747}Cf 、 ^{748}Cf 、 ^{749}Cf 、 ^{750}Cf 、 ^{751}Cf 、 ^{752}Cf 、 ^{753}Cf 、 ^{754}Cf 、 ^{755}Cf 、 ^{756}Cf 、 ^{757}Cf 、 ^{758}Cf 、 ^{759}Cf 、 ^{760}Cf 、 ^{761}Cf 、 ^{762}Cf 、 ^{763}Cf 、 ^{764}Cf 、 ^{765}Cf 、 ^{766}Cf 、 ^{767}Cf 、 ^{768}Cf 、 ^{769}Cf 、 ^{770}Cf 、 ^{771}Cf 、 ^{772}Cf 、 ^{773}Cf 、 ^{774}Cf 、 ^{775}Cf 、 ^{776}Cf 、 ^{777}Cf 、 ^{778}Cf 、 ^{779}Cf 、 ^{780}Cf 、 ^{781}Cf 、 ^{782}Cf 、 ^{783}Cf 、 ^{784}Cf 、 ^{785}Cf 、 ^{786}Cf 、 ^{787}Cf 、 ^{788}Cf 、 ^{789}Cf 、 ^{790}Cf 、 ^{791}Cf 、 ^{792}Cf 、 ^{793}Cf 、 ^{794}Cf 、 ^{795}Cf 、 ^{796}Cf 、 ^{797}Cf 、 ^{798}Cf 、 ^{799}Cf 、 ^{800}Cf 、 ^{801}Cf 、 ^{802}Cf 、 ^{803}Cf 、 ^{804}Cf 、 ^{805}Cf 、 ^{806}Cf 、 ^{807}Cf 、 ^{808}Cf 、 ^{809}Cf 、 ^{810}Cf 、 ^{811}Cf 、 ^{812}Cf 、 ^{813}Cf 、 ^{814}Cf 、 ^{815}Cf 、 ^{816}Cf 、 ^{817}Cf 、 ^{818}Cf 、 ^{819}Cf 、 ^{820}Cf 、 ^{821}Cf 、 ^{822}Cf 、 ^{823}Cf 、 ^{824}Cf 、 ^{825}Cf 、 ^{826}Cf 、 ^{827}Cf 、 ^{828}Cf 、 ^{829}Cf 、 ^{830}Cf 、 ^{831}Cf 、 ^{832}Cf 、 ^{833}Cf 、 ^{834}Cf 、 ^{835}Cf 、 ^{836}Cf 、 ^{837}Cf 、 ^{838}Cf 、 ^{839}Cf 、 ^{840}Cf 、 ^{841}Cf 、 ^{842}Cf 、 ^{843}Cf 、 ^{844}Cf 、 ^{845}Cf 、 ^{846}Cf 、 ^{847}Cf 、 ^{848}Cf 、 ^{849}Cf 、 ^{850}Cf 、 ^{851}Cf 、 ^{852}Cf 、 ^{853}Cf 、 ^{854}Cf 、 ^{855}Cf 、 ^{856}Cf 、 ^{857}Cf 、 ^{858}Cf 、 ^{859}Cf 、 ^{860}Cf 、 ^{861}Cf 、 ^{862}Cf 、 ^{863}Cf 、 ^{864}Cf 、 ^{865}Cf 、 ^{866}Cf 、 ^{867}Cf 、 ^{868}Cf 、 ^{869}Cf 、 ^{870}Cf 、 ^{871}Cf 、 ^{872}Cf 、 ^{873}Cf 、 ^{874}Cf 、 ^{875}Cf 、 ^{876}Cf 、 ^{877}Cf 、 ^{878}Cf 、 ^{879}Cf 、 ^{880}Cf 、 ^{881}Cf 、 ^{882}Cf 、 ^{883}Cf 、 ^{884}Cf 、 ^{885}Cf 、 ^{886}Cf 、 ^{887}Cf 、 ^{888}Cf 、 ^{889}Cf 、 ^{890}Cf 、 ^{891}Cf 、 ^{892}Cf 、 ^{893}Cf 、 ^{894}Cf 、 ^{895}Cf 、 ^{896}Cf 、 ^{897}Cf 、 ^{898}Cf 、 ^{899}Cf 、 ^{900}Cf 、 ^{901}Cf 、 ^{902}Cf 、 ^{903}Cf 、 ^{904}Cf 、<

^{55}S 、 ^{64}Cu 、 ^{68}Ga 、 ^{86}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{123}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{133}Xe 、 ^{177}Lu 、 ^{211}At 、又は ^{213}Bi 。放射性同位体標識抗体は、レセプター標的撮像実験において有用である。抗体は、Immunology, Volume 1 and 2, Coligen等, Ed. Wiley-Interscience, New York, New York, Pubs. (1991)のCurrent Protocolsに記載される技術を用いて、リガンド試薬が抗体の改変システインチオールと反応性がある場合に、キレートを結合するか、あるいはラジオアイソトープ金属と複合化する該リガンド試薬により標識することができる。金属イオンを複合化するキレートリガンドには、DOTA、DOTP、DOTMA、DTPAおよびTETA (Macrocyclics, Dallas, TX)が含まれる。放射性核種は、本発明の抗体-薬剤コンジュゲートとの複合体化によりターゲティングされうる(Wu等 (2005) Nature Biotechnology 23(9): 1137-1146)。 10

【0027】

DOTA-マレイミド(4-マレイミドブチルアミドベンジル-DOTA)などのリンカー試薬は、イソプロピルクロロフォルメート(Aldrich)によって活性化される4-マレイミド酪酸(Fluka)とアミノベンジル-DOTAを反応させて、その後Axworthy等 (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4): 1802-1807の手順によって調製されうる。DOTA-マレイミド試薬は、システイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸と反応して、抗体上の金属錯体形成リガンドを提供する(Lewis等 (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86)。DOTA-NHS(1,4,7,10-テトラアザシクロドデカン-1,4,7,10-四酢酸モノ(N-ヒドロキシスクシンイミドエステル)などのキレート化リンカー標識試薬は市販されている(Macrocyclics, Dallas, TX)。放射性核種標識抗体によるレセプター標的造影は、腫瘍組織の抗体の進行性蓄積の検出および定量化によって経路活性化のマーカーとなりうる(Albert等 (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210)。コンジュゲートした放射性金属はリソソーム分解後に細胞内に残りうる。 20

造影実験のための抗体標識として好適な金属-キレート複合体は以下に開示される。米国特許第5342606号、米国特許第5428155号、米国特許第5316757号、米国特許第5480990号、米国特許第5462725号、米国特許第5428139号、米国特許第5385893号、米国特許第5739294号、米国特許第5750660号、米国特許第5834456号、Hnatowich等 (1983) J. Immunol. Methods 65: 147-157; Meares等 (1984) Anal. Biochem. 142:68-78; Mirzadeh等 (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65; Meares等 (1990) J. Cancer 1990, Suppl. 10:21-26; Izzard等 (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350; Nikula等 (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis等 (1998) J. Nucl. Med. 39: 2105-2110; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Camera等 (1994) J. Nucl. Med. 21: 640-646; Ruegg等 (1990) Cancer Res. 50: 4221-4226; Verel等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1663-1670; Lee等 (2001) Cancer Res. 61: 4474-4482; Mitchell,等 (2003) J. Nucl. Med. 44: 1105-1112; Kobayashi等 (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miederer等 (2004) J. Nucl. Med. 45: 129-137; DeNardo等 (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend等 (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula等 (1999) J. Nucl. Med. 40: 166-76; Kobayashi等 (1998) J. Nucl. Med. 39: 82 9-36; Mardirossian等 (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli等 (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20。 30 40

【0028】

(b) 蛍光標識、例えば希有土類キレート(ユウロピウムキレート)、FITC、5-カルボキシフルオレセイン、6カルボキシフルオレセインを含むフルオレセイン種; TAMRAを含むローダミン種; ダンシル; リサミン; シアニン; フィコエリトリン; テキサスレッド; 及びこれらの類似体。蛍光標識は、例えば、上記のImmunologyのCurrent Protocolsに開示される技術を用いて抗体にコンジュゲートすることができる。蛍光色素および蛍光標識試薬には、Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR)およびPierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL)から市販されているものが含まれる。 40

【 0 0 2 9 】

(c) 様々な酵素基質標識は利用可能であり、開示されてもいる(米国特許第 4 2 7 5 1 4 9 号)。一般に、酵素は、様々な技術を用いて測定することができる色素生産性基質の化学変化を触媒する。例えば、酵素は、分光測光法で測定することができる基質の変色を触媒するかもしれない。あるいは、酵素は、基質の蛍光又は化学発光を変えうる。蛍光の変化を定量化する技術は上記の通りである。化学発光基質は、化学反応によって電子的に励起され、測定することができる(例えば化学ルミノメーターを用いて)か、またはエネルギーを蛍光受容基に与える光を発しうる。酵素標識の例には、ルシフェラーゼ(例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ; 米国特許第 4 7 3 7 4 5 6 号)、ルシフェリン、2, 3-ジヒドロフタルアジネジオン(dihydrophthalazinediones)、リンゴ酸酵素、ウレアーゼ、西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)などのペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ(AP)、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ(例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼおよびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)、複素環のオキシダーゼ(例えばウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼ)、ラクトペルオキシダーゼ、ミクロペルオキシダーゼなどが含まれる。抗体に酵素をコンジュゲートする技術は、O'Sullivan等, Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay, in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic press, New York, 73:147-166 (1981)に記載されている。

10

【 0 0 3 0 】

酵素基質の組合せの例には、例えば以下のものが含まれる：

20

(i) 基質として水素ペルオキシダーゼを有する西洋わさびペルオキシダーゼ(HRP)、ここで水素ペルオキシダーゼが染料前駆(例えば、オルソフェニレン(orthophenylene)ジアミン(OPD)又は3, 3', 5, 5'テトラメチルのベンジジン塩酸塩(TMB))を酸化する；

(ii) 色素生産性基質としてリン酸パラグラフ-ニトロフェニルを有するアルカリホスファターゼ(AP)；及び

(iii) 色素生産性基質(例えばp-ニトロフェニル- α -D-ガラクトシダーゼ)又は蛍光発生基質4-メチルウンベリフェリル(methylumbelliferyl)- α -D-ガラクトシダーゼを有する α -D-ガラクトシダーゼ(α -D-Gal)。

30

多数の他の酵素基質の組合せは当業者にとって利用可能である。これらの一般的な概要については、米国特許第 4 2 7 5 1 4 9 号および同第 4 3 1 8 9 8 0 号を参照。

【 0 0 3 1 】

標識は、アミノ酸側鎖、活性化されたアミノ酸側鎖、システイン改変抗体などと間接的にコンジュゲートされてもよい。例えば、抗体は、ビオチンとコンジュゲートさせることができ、前述した大きな3つの分類のうちの何れかはアビジン又はストレプトアビジンとコンジュゲートさせることができ、その逆もまた可能である。ビオチンは選択的にストレプトアビジンと結合し、したがって、標識はこの間接的な方法で抗体にコンジュゲートさせることができる。あるいは、ポリペプチド変異体と標識とを間接的にコンジュゲートさせるために、ポリペプチド変異体は小ハプテン(例えばジゴキシン)とコンジュゲートさせ、前述した標識の異なるタイプのうちの1つは抗ハプテンポリペプチド変異体(例えば抗ジゴキシン抗体)とコンジュゲートさせる。したがって、ポリペプチド変異体と標識は間接的にコンジュゲートすることができる(Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego)。

40

【 0 0 3 2 】

本発明の抗体は、任意の公知のアッセイ方法、例えばELISA、競合結合アッセイ、直接および間接的なサンドイッチアッセイおよび免疫沈降アッセイに用いられてもよい(Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.)。

検出標識は、結合又は認識事象を局所化し、視覚化して、数量化するために有用となり

50

うる。本発明の標識抗体は細胞表面レセプターを検出する。検出可能に標識した抗体についての他の使用は、蛍光標識抗体とビーズをコンジュゲートさせ、リガンド結合時の蛍光シグナルを検出することを含む、ビーズに基づく免疫キャプチャの方法である。同様の結合検出方法論は、表面プラスモン共鳴 (S P R) 効果を利用して抗体-抗原相互作用を測定して検出するものである。

蛍光色素および化学発光色素などの検出標識 (Briggs等 (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amines and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058) は検出可能なシグナルを提供し、通常、好ましくは以下のような特性により標識化抗体に応用することができる。(i) 標識抗体は、少量の抗体が無細胞アッセイおよび細胞に基づくアッセイにおいて敏感に検出されるように低いバックグラウンドで非常に高いシグナルを産生するものである、さらに、(ii) 標識抗体は、有意に写真を退色させることなく蛍光シグナルが観察され、モニターされ、記録されるように、光安定性を有するものである。膜又は細胞表面、特に生きている細胞への標識抗体の細胞表面結合を伴う用途では、標識は、(iii) 有効なコンジュゲート濃度と検出感度が達成されるように良好な水溶性であり、(iv) 細胞の正常な代謝過程が破壊されないか、又は早期に細胞死を引き起こさないように生きている細胞に対して毒性がないことが好ましい。

【 0 0 3 3 】

細胞性蛍光強度の直接の定量化と蛍光標識事象、例えば、ペプチド-色素コンジュゲートの細胞表面結合の算出は、生きている細胞又はビーズによる非放射性アッセイである、混合と読み取り (mix-and-read) を自動化するシステム (F M A T (登録商標) 8 1 0 0 H T S システム、Applied Biosystems, Foster City, Calif.) で実施してもよい (Miraglia, "Homogeneous cell- and bead-based assays for high throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4: 193-204)。また、標識抗体の使用には、細胞表面レセプター結合アッセイ、イムノキャプチャアッセイ、蛍光結合免疫吸着アッセイ (F L I S A)、カスパーゼ切断 (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23; 米国特許第 6 3 7 2 9 0 7 号)、アポトーシス (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51) および細胞障害性アッセイが含まれる。蛍光定量的マイクロ体積アッセイ技術を用いて、細胞表面を標識とする分子によって上方制御または下方制御を同定することができる (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using fluorometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51)。

【 0 0 3 4 】

本発明の標識抗体は、様々な方法及び以下のような生医学的かつ分子的撮像法の技術によってバイオマーカーやプローブを造影する際に有用である。(i) M R I (磁気共鳴画像法)、(ii) M i c r o C T (コンピューター断層撮影法)、(iii) S P E C T (単一光子放射型コンピュータ断層撮影法)、(iv) P E T (ポジトロン放出断層撮影) Chen等 (2004) B ioconjugate Chem. 15:41-49、(v) バイオルミネセンス、(vi) 蛍光、及び(vii) 超音波。イムノシンチグラフィは、放射性物質によって標識された抗体が動物又はヒト患者に投与される造影手順であり、画像は抗体が局在する身体の部分のものである (米国特許第 6 5 2 8 6 2 4 号)。造影バイオマーカーは、客観的に測定され、正常な生物学的プロセス、病原性プロセス、又は治療的介入に対する薬理的応答の指標として評価されてもよい。バイオマーカーはいくつかの種類がある。タイプ 0 は、疾患の自然な成長マーカーであって、公知の臨床指標、例えば関節リウマチの滑液炎症の M R I 評価と縦方向に相関する。タイプ I マーカーは、例えばメカニズムが臨床転帰と関係していなくても、作用のメカニズム (mechanism-of-action) の関係として介入の効果を捕らえる。タイプ I I マーカーは代理のエンドポイントとして機能するものであり、該バイオマーカーの変化又は該バ

イオマーカのシグナルから、関節リウマチの骨浸食をCTで測定するなどの目的の応答を「有効と認める」ために臨床的な利点を予測する。したがって、造影バイオマーカは、(i) 標的タンパク質の発現、(ii) 標的タンパク質に対する治療用の結合、すなわち選択性、および(iii) クリアランスおよび半減期の薬物動態学的データについての薬物動態学的(PD)治療的情報を提供しうる。研究室ベースのバイオマーカと比較したときのインビボ造影バイオマーカの利点には、非侵襲性処置、定量化できる、全身評価、反復性投与及び評価、すなわち複数の時点の投与と評価、及び臨床前(小動物)の結果を臨床(ヒト)の結果に潜在的に置き換えることができる結果が含まれる。用途によっては、バイオイメージングは、前臨床研究の多くの動物実験の代替となるかまたは最小化する。

【0035】

ペプチド標識方法は周知である。Haugland, 2003, *Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, *Bioconjugate Chem.* 3:2; Garman, (1997) *Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach*, Academic Press, London; Means (1990) *Bioconjugate Chem.* 1:2; Glazer等 (1975) *Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Elsevier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) *Chemical Reagents for Protein Modification*, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", *Modern Methods in Protein Chemistry*, H. Tschesche, Ed., Walter DeGruyter, Berlin and New York; 及びWong (1991) *Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking*, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez等 (2004) *Chem. Eur. J.* 10:1149-1155; Lewis等 (2001) *Bioconjugate Chem.* 12:320-324; Li等 (2002) *Bioconjugate Chem.* 13:110-115; Mier等 (2005) *Bioconjugate Chem.* 16:240-237を参照。

十分近接した蛍光レポーターとクエンチャーの2つの成分にて標識されたペプチドとタンパク質は、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)を受ける。レポーター基は、一般的に、特定の波長で光に励起され、エネルギーをアクセプター又はクエンチャーに転移して、その結果、最大の明るさで発光するための適切なストークスシフトが生じる蛍光色素である。蛍光色素には、広範な芳香族性を有する分子、例としてフルオレセインおよびローダミン、ないしこれらの誘導体が含まれる。蛍光レポーターは、完全なペプチドのクエンチャー成分によって部分的あるいは有意に失活されうる。ペプチダーゼ又はプロテアーゼによるペプチドの切断時に、蛍光の検出可能な増加が測定されうる(Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", *Methods in Enzymology*, Academic Press, 248:18-34)。

【0036】

また、本発明の標識抗体は親和性精製剤として用いられてもよい。この方法では、標識抗体は、当分野で公知の方法を用いて、セファデックス樹脂又は濾紙などの固相に固定される。固定された抗体は、精製される抗原を含む試料と接触させ、その後、支持体を、精製される抗原以外の試料中の実質的にすべての物質を取り除く適切な溶媒にて洗浄し、固定されたポリペプチド変異体に結合させる。最後に、抗原をポリペプチド変異体から放すように、支持体を他の適切な溶媒、例えばグリシンバッファ、pH 5.0にて洗浄する。

標識化試薬は、一般的に、(i) 標識抗体を形成するためにシステイン改変抗体のシステインチオールと直接、(ii) リンカー-標識中間生成物を形成するためにリンカー試薬と、又は(iii) 標識抗体を形成するためにリンカー抗体と、反応しうる反応官能基を保持する。標識試薬の反応性官能基には、マレイミド、ハロアセチル、ヨードアセトアミドスクシンイミジルエステル(例えば、NHS、N-ヒドロキシスクシンイミド)、イソチオシアネート、スルホニルクロリド、2,6-ジクロロトリアジニル、ペンタフルオロフェニルエステル、およびホスホラミダイトが含まれるが、他の官能基も用いられてよい。

【0037】

例示的な反応性官能基は、検出可能な標識、例えばビオチンや蛍光色素のカルボキシル

10

20

30

40

50

置換基のN-ヒドロキシスクシンイミジルエステル(NHS)である。標識のNHSエステルを予め造っても、単離しても、及び/又は特徴付けてもよく、あるいはインサイトで形成して、抗体の求核基と反応させてもよい。典型的には、標識のカルボキシル型を、カルボジイミド試薬、例としてジシクロヘキシルカルボジイミド、ジイソプロピルカルボジイミド、又はユーロニウム試薬、例としてTSTU (O-(N-スクシンイミジル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム テトラフルオロボレート)、HBTU (O-ベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、又はHATU (O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、標識のNHSエステルを与えるためのアクチベーター、例えば1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、及びN-ヒドロキシスクシンイミドのいくつかの組み合わせと反応させることによって活性化することによって、標識のインサイト活性化と抗体との反応によって標識と抗体をカップリングさせて、一工程で標識-抗体複合体を形成させてもよい。他の活性化試薬及びカップリング試薬には、TBTU (2-(1H-ベンゾトリアゾ-1-イル)-1,3,3-テトラメチルユーロニウム ヘキサフルオロホスフェート)、TFFH (N,N',N'',N'''-テトラメチルユーロニウム 2-フルオロ-ヘキサフルオロホスフェート)、PyBOP (ベンゾトリアゾール-1-イル-オキシ-トリス-ピロリジノ-ホスホニウム ヘキサフルオロホスフェート)、EEDQ (2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロ-キノリン)、DCC (ジシクロヘキシルカルボジイミド); DIPCDI (ジイソプロピルカルボジイミド)、MSNT (1-(メシチレン-2-スルホニル)-3-ニトロ-1H-1,2,4-トリアゾール、及びアリアル スルホニル ハロゲン化物、例えばトリイソプロピルベンゼンスルホニル クロライドが含まれる。

【0038】

本発明のアルブミン結合ペプチド-Fab化合物:

一態様では、本発明の抗体はアルブミン結合タンパク質に融合される。血漿タンパク質結合は、生存が短い分子の薬物動態学的性質を向上させる有効な手段となりうる。アルブミンは血漿中で最も多いタンパク質である。血清アルブミン結合ペプチド類(ABP)は、組織取り込み、浸透および拡散の変更を含む、融合した活性なドメインタンパク質の薬物動態を変えうる。これらの薬物動態学的パラメータは、適切な血清アルブミン結合ペプチド配列を特異的に選別することによって調製されうる(米国特許公開20040001827)。一連のアルブミン結合ペプチドは、ファージディスプレイスクリーニングによって同定された(Dennis等(2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; 国際公開第01/45746号)。本発明の化合物には、(i) Dennis等(2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 at Tables III and IV, page 35038、(ii) 米国特許公開20040001827の[0076] 配列番号: 9から22、及び(iii) 国際公開第01/45746号の12~13頁に示されるABP配列が含まれ、これらの文献はすべて出典明記によって本明細書中に援用される。アルブミン結合(ABP)-Fabは、1:1の化学量比(1ABP/1Fab)で、Fab重鎖のC末端にアルブミン結合ペプチドを融合させることによって作製した。アルブミンとのこれらABP-Fabの会合により、抗体の半減期がウサギおよびマウスの25倍以上に増加したことが示された。したがって、上記の反応性のCys残基をこれらABP-Fabに導入し、細胞障害性剤と部位特異的にコンジュゲートさせた後にインビボ動物実験に用いることができる。

例示的なアルブミン結合ペプチド配列には、以下に列挙する配列番号: 42から46のアミノ酸配列が含まれるが、これらに限定されるものではない。

CDKTH TGGGSQR LMEDICLP RWGCLWEDDF 配列番号: 42

QRLMEDICLP RWGCLWEDDF 配列番号: 43

QRLIEDICLP RWGCLWEDDF 配列番号: 44

RLIEDICLP RWGCLWEDD 配列番号: 45

DICLP RWGCLW 配列番号: 46

【 0 0 3 9 】

抗体 - 薬剤コンジュゲート

他の態様では、本発明は、化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含む、抗体 - 薬剤コンジュゲート(A D C)を提供する。他の態様では、本発明はさらに、イムノコンジュゲートの使用方法を提供する。一態様では、イムノコンジュゲートは、細胞障害性剤又は検出可能な薬剤に共有結合して付着した前記いずれかの抗C D 2 2抗体を含む。

細胞障害性又は細胞分裂停止性の薬剤、すなわち癌治療における腫瘍細胞を殺す又は阻害するための薬剤の局所運搬に抗体 - 薬剤コンジュゲートを用いると(Syrigos及びEpenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) *Adv. Drg Del. Rev.* 26:151-172; 米国特許第4,975,278号)、腫瘍への薬剤成分の標的とする運搬とそこでの細胞内集積が可能となるものであり、この非コンジュゲート薬物作用剤の全身性投与により正常細胞並びに除去しようとする腫瘍細胞への毒性が容認できないレベルとなりうる(Baldwin等, (1986) *Lancet* pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,」 in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, A. Pincheraら. (ed. s), pp. 475-506)。これによって、最小限の毒性で最大限の効果を求める。ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体はこの方策に有用であるとして報告されている(Rowland等, (1986) *Cancer Immunol. Immunother.*, 21:183-87)。この方法に用いる薬物には、ダウノマイシン、ドキソルビジン、メトトレキサート及びビンデジンが含まれる(Rowland等, (1986)、上掲)。抗体 - 毒素コンジュゲートに用いる毒素には、ジフテリア毒素などの細菌性毒素、ゲルダナマイシン(Mandlerら(2000) *Jour. of the Nat. Cancer Inst.* 92(19):1573-1581; Mandlerら(2000) *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 10:1025-1028; Mandlerら(2002) *Bioconjugate Chem.* 13:786-791)、メイタンシノイド(EP 1391213; Liu等, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:8618-8623)、及びカリケアマイシン(Lode等, (1998) *Cancer Res.* 58:2928; Hinman等, (1993) *Cancer Res.* 53:3336-3342)などのリシン、小分子毒素などの植物毒が含まれる。該毒素は、チューブリン結合、DNA結合又はトポイソメラーゼ阻害を含む機能によりその細胞障害性及び細胞分裂停止性の効果に影響しうる。ある種の細胞障害性剤は、大きな抗体又はタンパク質レセプターリガンドにコンジュゲートした場合に、不活性又は活性が低減する傾向がある。

【 0 0 4 0 】

ゼパリン(登録商標)(ZEVALIN)(イブリツモマブチウキセタン(ibritumomab tiuxetan), Biogen/Idec)は正常及び悪性のBリンパ球の細胞表面上にみられるC D 2 0抗原に対するマウスI g G 1 モノクローナル抗体と¹¹¹In又は⁹⁰Y放射性同位体とがチオウレアリンカーキレート剤にて結合した抗体 - 放射性同位体コンジュゲートである(Wiseman等, (2000) *Eur. Jour. Nucl. Med.* 27(7):766-77; Wiseman等, (2002) *Blood* 99(12):4336-42; Witzig等, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(10):2453-63; Witzig等, (2002) *J. Clin. Oncol.* 20(15):3262-69)。ゼパリンはB細胞非ホジキン性リンパ球(NHL)に対して活性を有するが、投与によってほとんどの患者に重症で長期の血球減少を引き起こす。カリケアマイシンに連結したh u C D 3 3抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるマイロターゲ^{T M}(MYLOTARG)(ゲムツズマブオゾガミシン(gemtuzumab ozogamicin), Wyeth Pharmaceuticals)は、急性骨髄性白血病の治療用注射剤として2000年に認可された(*Drugs of the Future* (2000) 25(7):686; 米国特許第4970198号; 同第5079233号; 同第5585089号; 同第5606040号; 同第5693762号; 同第5739116号; 同第5767285号; 同第5773001号)。ジスルフィドリンカーS P Pを介してメイタンシノイド薬剤分子D M 1と連結しているh u C 2 4 2抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるカンツズマブメルタンシン(Cantuzumab mertansine)(Immugen, Inc.)は、C a n A gを発現する癌、例として大腸、膵臓、胃などの治療用に第I I相試験へと進んでいる。メイタンシノイド薬剤分子D M 1と連結している抗前立腺特異的

膜抗原(P S M A)モノクローナル抗体からなる抗体薬剤コンジュゲートであるM L N - 2 7 0 4 (Millennium Pharm., BZL Biologics, Immunogen Inc.)は、前立腺癌の潜在的治療の開発段階にある。アウリスタチン(auristatin)ペプチド、アウリスタチンE (A E)及びモノメチルアウリスタチン(M M A E)、ドラスタチン(dolastatin)の合成類似体は、キメラモノクローナル抗体c B R 9 6 (癌細胞上のルイスYに特異的)及びc A C 1 0 (血液系悪性腫瘍上のC D 3 0に特異的)(Doronina等, (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784)にコンジュゲートしており、治療的開発段階にある。

【 0 0 4 1 】

イムノコンジュゲート(免疫複合体)の生成に有用な化学治療薬を本明細書中に記載した。用いることのできる酵素活性毒素及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、(緑膿菌からの)外毒素A鎖、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデクシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン、アレウリテス・フォーディ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチン(dianthin)タンパク質、フィトラカ・アメリカーナ(Phytolaca americana)タンパク質(P A P I、P A P I I、及びP A P - S)、モモルディカ・チャランチア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン(crocin)、サパオナリア・オフィシナリス(sapaonaria officinalis)インヒビター、ゲロニン(gelonin)、ミトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン(phenomycin)、エノマイシン(enomycin)及びトリコテセン(tricothecene)が含まれる。例として1993年10月28日に公開の国際公開公報93/21232を参照のこと。放射性コンジュゲート抗体の生成には、様々な放射性ヌクレオチドが利用可能である。例としては、²1²Bi、¹3¹I、¹3¹In、⁹0Y及び¹8⁶Reが含まれる。抗体及び細胞障害性薬の複合体は、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオナート(S P D P)、イミノチオラン(I T)、イミドエステルの二官能性誘導体(ジメチルアジピミデートH C L等)、活性エステル(ジスクシンイミジルスベレート等)、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアネート(トリエン2,6-ジイソシアネート等)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)を用いて作成できる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。カーボン-14-標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(M X - D T P A)は、放射性ヌクレオチドの抗体への抱合のためのキレート剤の例である(国際公開94/11026)。

抗体のコンジュゲートと一又は複数の小分子毒素、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセチン(trichothene)及びC C 1 0 6 5、及び毒性活性を有するこれらの毒素の誘導体が、ここで考察される。

【 0 0 4 2 】

メイタンシン及びメイタンシノイド

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートしている本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。

メイタンシノイドは、チュープリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブMaytenus serrataから単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号;同4248870号;同4256746号;同4260608号;同4265814号;同4294757号;同4307016号;同4308268号;同4308269号;同4309428号;同4313946号;同4315929号;同4317821号;同4322348号;同4331598号;同4361650号;同4364866号;同4424219号;同4450254号;同43626

63号；及び同4371533号に開示されている。

メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii) 抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役上好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

【0043】

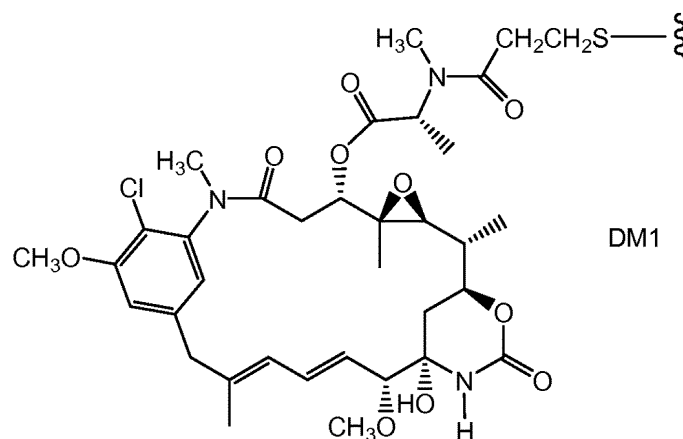
メイタンシノイド薬剤部分としての使用に適切なメイタンシン化合物は当分野で周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離してもよいし、又は遺伝子工学技術を用いて産生してもよい(Yu等(2002)PNAS 99:7968-7973を参照)。また、メイタンシノール及びメイタンシノール類似体は、公知の方法に従って合成して調製されてもよい。

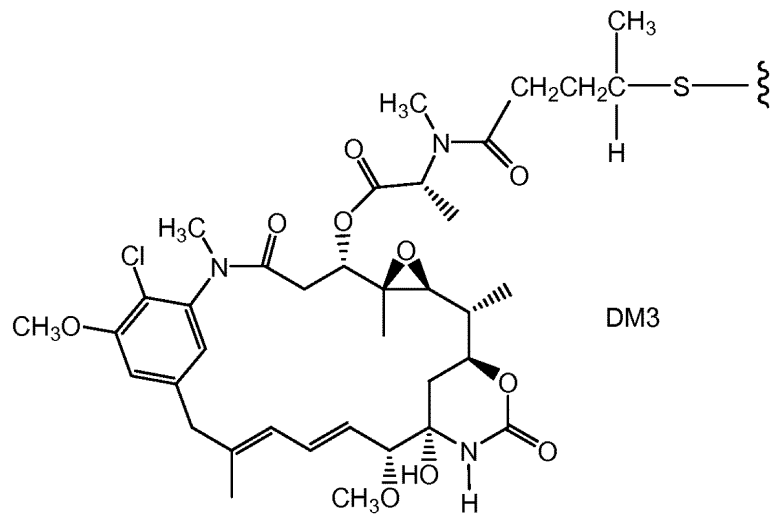
例示的なメイタンシノイド薬剤部分には、修飾した芳香族環を有するもの、例えば、C-19-デクロロ(米国特許第4256746号)(アンサマイトシンP2のリチウムアルミニウム水素化物の還元によって調製される)；C-20-ヒドロキシ(又はC-20-デメチル)+/-C-19-デクロロ(米国特許第4361650号及び同第4307016号)(ストレプトミセス属ないしはアクチノミセス属を用いた脱メチル化又はLAHを用いた脱塩素により調製される)；及びC-20-デメトキシ、C-20-アシロキシ(-OCOR)、+/-デクロロ(米国特許第4294757号)(アシル塩化物を用いたアシル化により調製される)、及び他の位置に修飾を有するものが含まれる。

また、例示的なメイタンシノイド薬剤部分には、修飾を有するもの、例えば、C-9-SH(米国特許第4424219号)(H_2S 又は P_2S_5 を有するメイタンシノールの反応により調製される)；C-14-アルコキシメチル(デメトキシ/ CH_2OR)(米国特許第4331598号)；C-14-ヒドロキシメチル又はアシロキシメチル(CH_2OH 又は CH_2OAc)(米国特許第4450254号)；C-15-ヒドロキシ/アシロキシ(米国特許第4364866号)(ストレプトミセス属によるメイタンシノールの変換によって調製される)；C-15-メトキシ(米国特許第4313946号及び同第4315929号)(トレウィアヌドロフローラ(*Trewia nudiflora*)より単離)；C-18-N-デメチル(米国特許第4362663号及び第4322348号)(ストレプトミセス属によるメイタンシノールの脱メチル化により調製される)；及び、4,5-デオキシ(米国特許第4371533号)(メイタンシノールの三塩化チタン/LAH還元により調製される)が含まれる。

【0044】

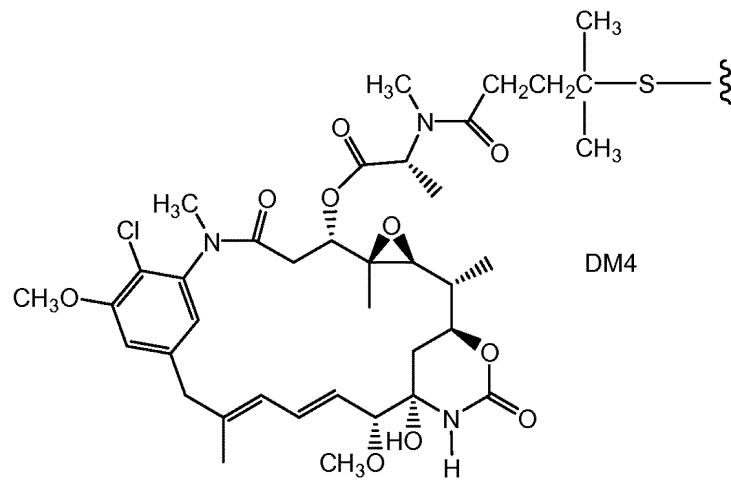
メイタンシノイド薬剤部分の例示的な実施態様には、以下の構造を有するDM1；DM3；及びDM4が含まれる。





DM3

10



DM4

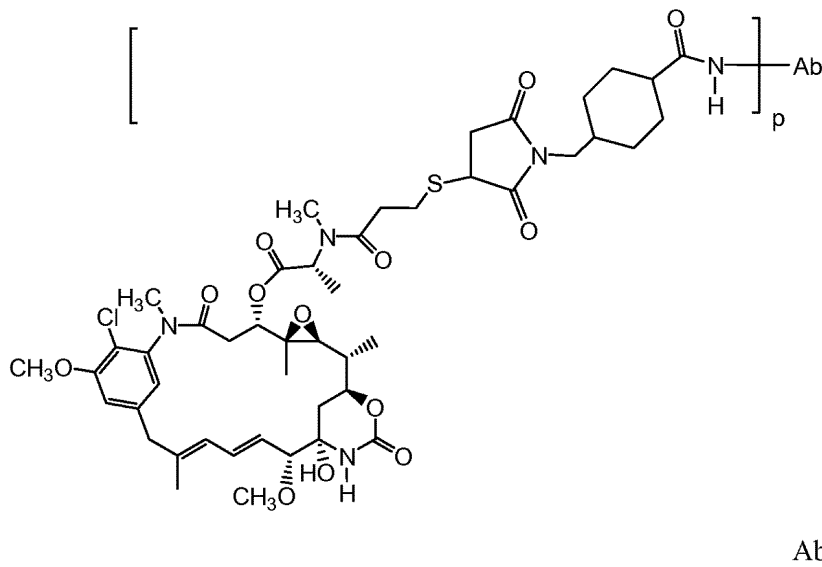
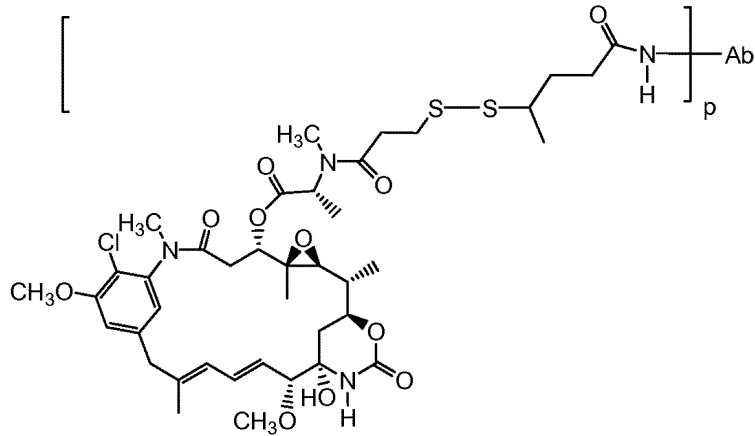
20

ここで、波線は、抗体 - 薬剤コンジュゲートのリンカー (L) への薬剤の硫黄原子の共有結合を示す。DM1 に対して SMC C により連結したハーセプチン (登録商標) (トラスツズマブ、抗HER2抗体) が報告されている (国際公開第2005/037992号、これは出典明記によって本明細書中にその全体が特別に援用される)。本発明の抗体薬剤コンジュゲートは本明細書中に開示した手順に従って調製される。

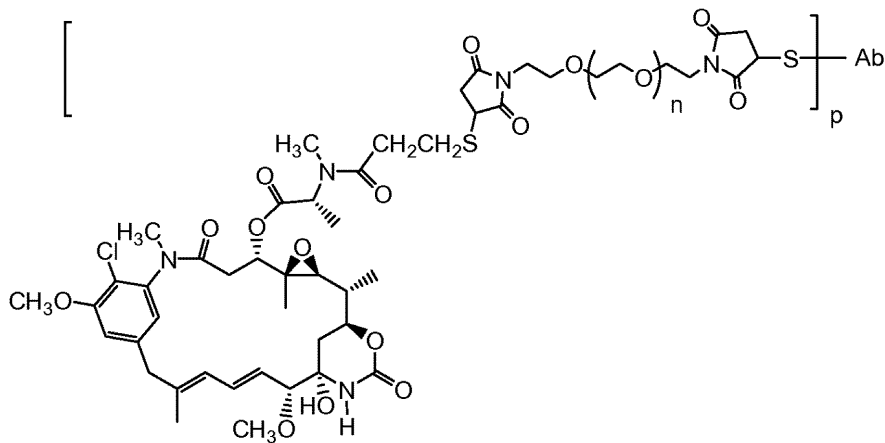
30

【0045】

他の例示的メイトンシノイド抗体 - 薬剤コンジュゲートは以下のような構造と略記号を有している。(ここでAbは抗体であり、pは1~およそ8である。)



DM1が抗体のチオール基にBMPEOリンカーにより連結されている例示的な抗体-薬剤コンジュゲートは、以下のような構造及び略記号を有する。



ここで、Abは抗体であり、nは0、1又は2であり、そして、pは1、2、3又は4である。

【0046】

メイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲート、その作製方法及びそれらの治療用途は、例えば米国特許第5208020号、同5416064号、同第6441163号、及び欧州特許第0425235号B1に開示されており、その開示内容は出典を明示してここに援用する。Liu等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623(1996)には、ヒト結腸直腸癌に対するモノクローナル抗体C242に結合するDM1と命名されたメイタンシノイドを含有するイムノコンジュゲートが記載されている。前記コンジュゲートは培養された結腸癌細胞に対して高い細胞障害性を有することが見出されており、インビボ腫瘍成長アッセイにおいて抗腫瘍活性を示す。Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)には、メイタンシノイドが、ジスルフィド結合を介して、ヒト結腸癌株化細胞の抗原に結合するマウス抗体A7、又はHER-2/neuオンコジーンに結合する他のマウスモノクローナル抗体TA.1に結合しているイムノコンジュゲートが記載されている。TA.1-メイタンシノイドコンジュゲートの細胞障害性はヒト乳癌株化細胞SK-BR-3におけるインビトロで試験され、細胞当たり 3×10^5 HER-2表面抗原が発現した。薬剤コンジュゲートにより、遊離のメイタンシノイド剤に類似した細胞障害度が達成され、該細胞障害度は、抗体分子当たりのメイタンシノイド分子の数を増加させることにより増加する。A7-メイタンシノイドコンジュゲートはマウスにおいては低い全身性細胞障害性を示した。

10

【0047】

抗CD22抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、抗体又はメイタンシノイド分子のいずれの生物学的活性もほとんど低減することなく、メイタンシノイド分子に抗体を化学的に結合させることにより調製される。例えば、米国特許第5208020号(この開示内容は出典明記により特別に組み込まれる)を参照。1分子の毒素/抗体は、裸抗体の使用において細胞障害性を高めることが予期されているが、抗体分子当たり、平均3-4のメイタンシノイド分子が結合したものは、抗体の機能又は溶解性に悪影響を与えることなく、標的細胞に対する細胞障害性を向上させるといった効力を示す。メイタンシノイドは当該技術分野でよく知られており、公知の技術で合成することも、天然源から単離することもできる。適切なメイタンシノイドは、例えば米国特許第5208020号、及び他の特許、及び上述した特許ではない刊行物に開示されている。好ましいメイタンシノイドは、メイタンシノール、及び種々のメイタンシノールエステル等の、メイタンシノール分子の芳香環又は他の位置が修飾されたメイタンシノール類似体である。

20

30

例えば、米国特許第5208020号、同第6441163号又は欧州特許第0425235号B1、Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992)、及び米国特許公開第2005/0169933号A1(これらの開示内容は出典明記により特別に援用される)に開示されているもの等を含め、抗体-メイタンシノイドコンジュゲートを作製するために、当該技術で公知の多くの結合基がある。リンカー成分SMCCを含んでなる抗体-メイタンシノイドコンジュゲートは、2005年5月31日出願の米国特許第11/141344号、"Antibody-drug conjugates and Methods."に開示されるように調製される。リンカーグループには、上述した特許に開示されているようなジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、光不安定性基、ペプチターゼ不安定性基、又はエステラーゼ不安定性基が含まれる。更なるリンカーグループを本願明細書中に記載し、例示する。

40

【0048】

抗体とメイタンシノイドとのコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPDP)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導體(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導體(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシア

50

ネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。特に好適なカップリング剤には、ジスルフィド結合により提供されるN-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノアート(SPP)及びN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオアート(SPDP)(Carlsson等, Biochem. J. 173:723-737[1978])が含まれる。

リンカーは結合の種類に応じて、種々の位置でメイタンシノイド分子に結合し得る。例えば、従来からのカップリング技術を使用してヒドロキシル基と反応させることによりエステル結合を形成することができる。反応はヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシル基で修飾されたC-15位、及びヒドロキシル基を有するC-20位で生じる。好適な実施態様では、結合はメイタンシノール又は

10

メイタンシノールの類似体のC-3位で形成される。
 一実施態様では、本発明のいずれかの抗体(完全長又は断片)は一又は複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートされる。イムノコンジュゲートの一実施態様では、細胞障害性剤DはメイタンシノイドDM1である。イムノコンジュゲートの一実施態様では、リンカーはSMCCである。一実施態様では、抗体-リンカー-薬剤コンジュゲートは、SMCCリンカーを介してDM1細胞障害性剤に共有結合している本明細書中に開示した抗CD22抗体である。

【0049】

アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体及び誘導體、アウリスタチン(auristatin)(米国特許第5635483号;同第5780588号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke等(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584)、抗癌活性(米国特許第5663149号)及び抗真菌性活性(Pettit等(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接合しうる(国際公開第02/088172号)。

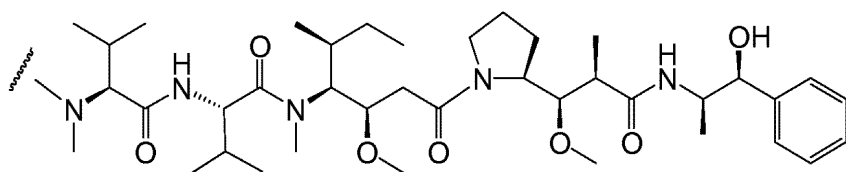
20

例示的なアウリスタチンの実施態様には、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分DE及びDFを含み、2004年3月28日に公開されたSenter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に援用される。

30

【0050】

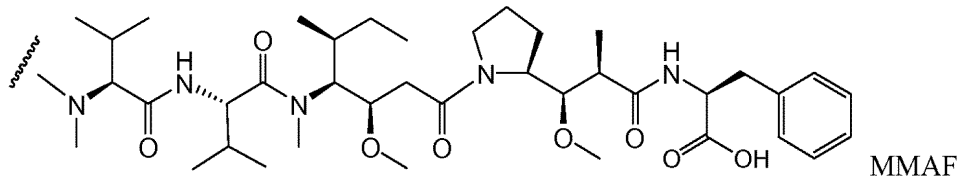
例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAEである(ここで、波形の線は抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す)。



MMAE

40

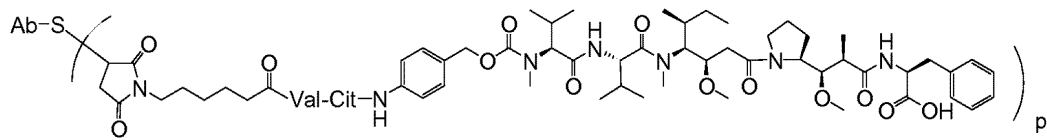
例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAFである(ここで、波形の線は抗体薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す)。



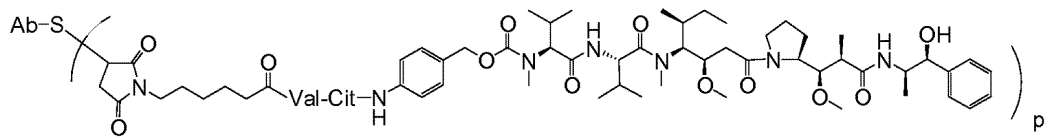
【 0 0 5 1 】

10

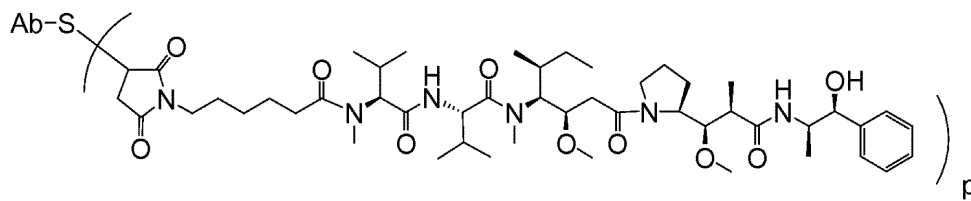
MMAE又はMMAF及び様々なリンカー構成成分(本明細書においてさらに記述される)を含んでなる更なる例示的な実施態様は、以下の構造及び略号を有する(ここで、Abは抗体を意味し、pは1~約8である)：



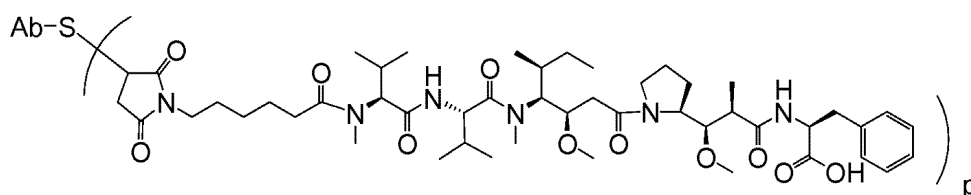
20



30



40



50

【0052】

一般的に、ペプチドベースの薬剤成分は、2以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照)。アウリスタチン/ドラスタチン薬剤成分は、米国特許第5635483号;米国特許第5780588号;Pettit等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465;Pettit等(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277;Pettit, G.R.,等 Synthesis, 1996, 719-725;Pettit等(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863;及びDoronina(2003) Nat Biotechnol 21(7): 778-784の方法に従って調製されうる。

10

【0053】

カリケアマイシン

他の実施態様では、イムノコンジュゲートは、一又は複数のカリケアマイシン分子と結合した本発明の抗体を含んでなる。抗生物質のカリケアマイシンファミリーはサブ-ピコモルの濃度で二重鎖DNA破壊を生じることができる。カリケアマイシンファミリーのコンジュゲートの調製については、米国特許第5712374号、同5714586号、同5739116号、同5767285号、同5770701号、同5770710号、同5773001号、同5877296号(全て、American Cyanamid Company)を参照のこと。使用可能なカリケアマイシンの構造類似体には、限定するものではないが、 ^1I 、 ^2I 、 ^3I 、N-アセチル- ^1I 、PSAG及び $^1\text{I}_1$ (Hinman等, Cancer Research, 53: 3336-3342(1993)、Lode等 Cancer Research, 58: 2925-2928(1998)及び上述したAmerican Cyanamidの米国特許)が含まれる。抗体が結合可能な他の抗腫瘍剤は、葉酸代謝拮抗薬であるQFAである。カリケアマイシン及びQFAは双方共、細胞内に作用部位を有し、原形質膜を容易に通過しない。よって抗体媒介性インターナリゼーションによるこれらの薬剤の細胞への取込により、細胞障害効果が大きく向上する。

20

【0054】

他の細胞障害剤

本発明の抗体と結合可能な他の抗腫瘍剤には、BCNU、ストレプトゾイシン、ビンクリスチン及び5-フルオロウラシル、米国特許第5053394号、同5770710号に記載されており、集合的にLL-E33288複合体として公知の薬剤のファミリー、並びにエスペラマイシン(esperamicine)(米国特許第5877296号)が含まれる。

30

使用可能な酵素活性毒及びその断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素A鎖(シュードモナス・アエルギノーサ(Pseudomonas aeruginosa))、リシンA鎖、アプリンA鎖、モデシン(modeccin)A鎖、アルファ-サルシン(sarcin)、アレウライツ・フォルディイ(Aleurites fordii)プロテイン、ジアンシン(dianthin)プロテイン、フィトラッカ・アメリカーナ(Phytolacca americana)プロテイン(PAPI、PAPII及びPAPI-S)、モモルディカ・キャランティア(momordica charantia)インヒビター、クルシン(curcin)、クロチン、サバオナリア(sapaonaria)オフィシナリスインヒビター、ゲロニン(gelonin)、マイトゲリン(mitogellin)、レストリクトシン(restrictocin)、フェノマイシン、エノマイシン及びトリコセセス(tricothecenes)が含まれる。例えば、1993年10月28日公開の国際公開第93/21232号を参照のこと。

40

本発明は、抗体と核酸分解活性を有する化合物(例えばリボヌクレアーゼ又はDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ;DNAアーゼ)との間に形成される免疫コンジュゲートをさらに考察する。

【0055】

腫瘍を選択的に破壊するため、抗体は高い放射性を有する原子を含有してよい。放射性コンジュゲートした抗体を生成するために、種々の放射性同位体が利用される。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及びLuの放射性同位体が含まれる。コンジュゲートが検出に使用される場合、それはシンチグラフィ研究用の放射性原子、例えば $\text{t}c^{99m}$ 又は

50

I^{123} 、又は核磁気共鳴(NMR)映像(磁気共鳴映像、mriとしても公知)用のスピン標識、例えばヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガン又は鉄を含有し得る。

放射-又は他の標識が、公知の方法でコンジュゲートに導入される。例えば、ペプチドは生物合成されるか、又は水素の代わりにフッ素-19を含む適切なアミノ酸前駆体を使用する化学的なアミノ酸合成により合成される。標識、例えば $t c^{99m}$ 又は I^{123} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 及び In^{111} は、ペプチドのシステイン残基を介して結合可能である。イットリウム-90はリジン残基を介して結合可能である。IODOGEN法(Fraker等(1978) Biochem. Biophys. Res. Commun. 80:49-57)は、ヨウ素-123の導入に使用することができる。他の方法の詳細は、「Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy」(Chatal, CRC Press 1989)に記載されている。

10

【0056】

抗体と細胞障害剤のコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPD P)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等, Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは細胞中の細胞障害剤の放出を容易にするための「切断可能リンカー」であってよい。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ過敏性リンカー、光不安定性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカーが使用され得る(Chari等, Cancer Research, 52:127-131(1992); 米国特許第5208020号)。

20

本発明の化合物は、限定するものではないが、架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMPS、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMB S、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIA B、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

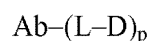
30

【0057】

抗体薬剤コンジュゲートの調製：

本発明の抗体薬剤コンジュゲート(ADC)において、抗体(Ab)を、リンカー(L)を介して、一つ以上の薬剤部分(D)、例えば抗体につき約1~約20の薬剤部分にコンジュゲートする。式IのADCはいくつかの手段、当業者に公知の有機化学反応、状態および試薬を用いて調製されうる：(1)共有結合の後に薬剤部分Dと反応してAb-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた抗体の求核基の反応；及び(2)共有結合の後に抗体の求核基と反応してD-Lを形成するための、二価のリンカー試薬を用いた薬剤部分の求核基の反応、が含まれる。ADCを調製するための更なる方法は本願明細書中に記載される。

40



式 I

リンカーは、一つ以上のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分は、6

50

-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIAB」)を含む。更なるリンカー成分は当分野で公知であり、そのいくつかは本願明細書において、記述される。

【0058】

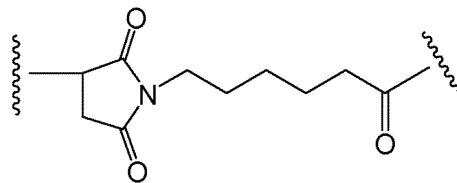
いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸残基を含みうる。例示的なアミノ酸リンカー成分には、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドは、バリン-シトルリン(v c又はval-cit)、アラニン-フェニルアラニン(a f又はala-phe)を含む。例示的なトリペプチドは、グリシン-バリン-シトルリン(gly-val-cit)及びグリシン-グリシン-グリシン(gly-gly-gly)を含む。アミノ酸リンカー成分を含んでなるアミノ酸残基は、天然に生じるもの、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含む。アミノ酸リンカー成分は設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

10

【0059】

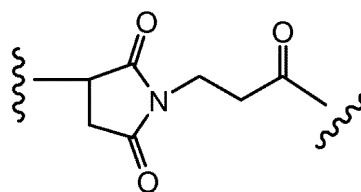
例示的なリンカー構成成分の構造を以下に示す(ここで、波形の線はADCの他の構成成分への共有結合の部位を示す)：

20



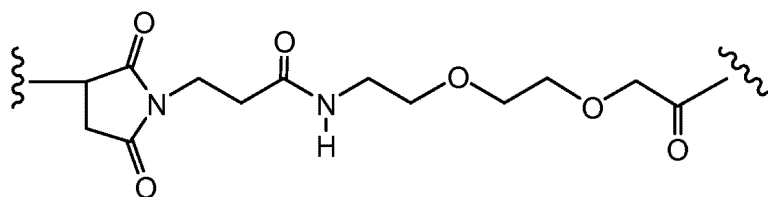
MC

30



MP

40



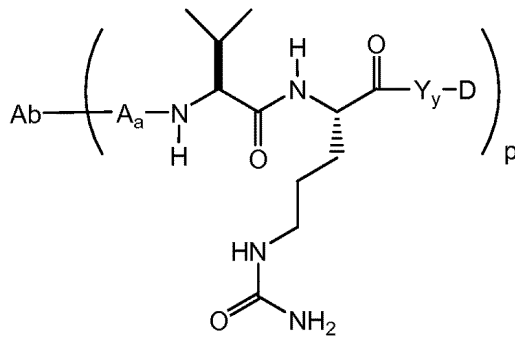
MPEG

【0060】

更なる例示的なリンカー構成成分及び略号は以下のものを含む(ここで、抗体(Ab)及

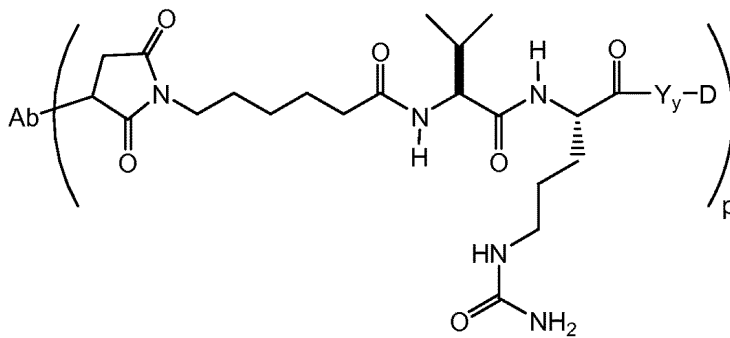
50

びリンカーが示されており、pは1～約8である)：



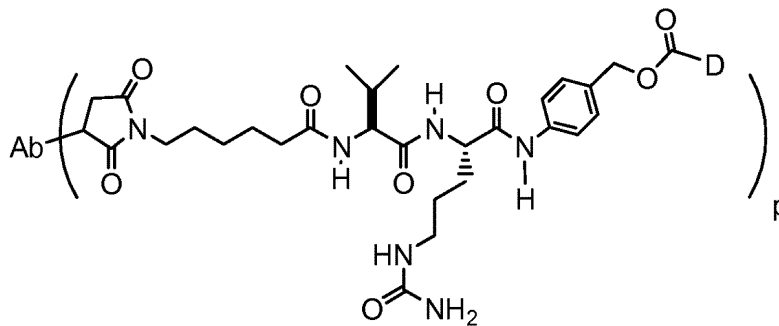
10

Val-cit



20

MC-val-cit



30

MC-val-cit-PAB

40

【0061】

抗体上の求核基には、限定するものでなく、以下のものを含む：(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリシン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、および(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基。アミン、チオールおよび水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分上の求電子性の群およびリンカー試薬により共有結合を形成することができる：(i) 活性エステル、例えばNHSエステル、HOBTエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物；(ii) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド群、が含

50

まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、還元剤、例えばDTT(ジチオトレイトール)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2の反応性のチオール求核基を形成する。チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリシンを反応させることによって抗体に付加的な求核基を導入することができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体(又は、その断片)に導入されてもよい。

【0062】

また、本発明の抗体薬剤コンジュゲートは、抗体を修飾して求電子性の部分を導入する(リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる)ことによって生成してもよい。グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応するアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができるタンパク質のカルボニル(アルデヒドおよびケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含んでいるタンパク質はナトリウムメタ

10

20

【0063】

同様に、薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、以下のものを含む：反応して、リンカー部分およびリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステルおよびアリアルヒドラジド基：(i) 活性エステル(例えばNHSEエステル、HOBtエステル、ハロギ酸および酸ハロゲン化物)；(ii) アルキルおよびベンジルハライド、例えばハロアセトアミド；(iii) アルデヒド、ケトン、カルボキシルおよびマレイミド基、が含まれる。

30

更なる他の態様では、抗体は、一又は複数のスルフヒドリル基を導入する用に化学的に改変されうる一又は複数のリジン残基を有する。抗体ユニットは、スルフヒドリル基の硫黄原子を介してリンカーユニットに結合する。リジンを改変するために用いられうる試薬には、限定するものではないが、N-スクシンイミジル S-アセチルチオアセテート(SATA)及び2-イミノチオラン ヒドロクロライド(トラウト試薬)が含まれる。

他の実施態様では、抗体は、一又は複数のスルフヒドリル基を持つように化学的に改変されうる一又は複数の糖質基を持っていてもよい。抗体ユニットは、リンカーユニット、例としてストレッチャーユニットに、本明細書において開示されるように、スルフヒドリル基の硫黄原子を介して結合する。

40

【0064】

さらに他の実施態様では、抗体は、酸化されて、アルデヒド(-CHO)基を提供しうる一又は複数の糖質基を持っていてもよい(例としてLaguzza, 等, J. Med. Chem. 1989, 32(3), 548-55を参照)。対応するアルデヒドはストレッチャー上の反応部位と結合しうる。抗体上のカルボニル基と反応しうるストレッチャー上の反応部位には、限定するものではないが、ヒドラジンおよびヒドロキシルアミンが含まれる。薬剤ユニットの接着又は会合のためにタンパク質を改変するための他のプロトコールは、Coligan等, Current Protocols in Protein Science, vol. 2, John Wiley & Sons (2002)に記載されており、該文献は出典明記によって本明細書中に援用される。

抗体、イムノグロブリン又はこれらの断片などの細胞を標的とするタンパク質へリンカ

50

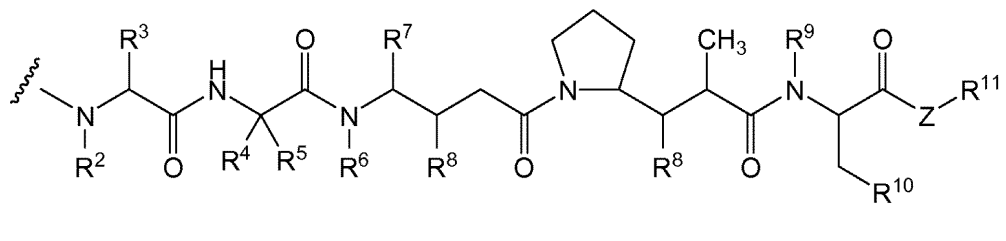
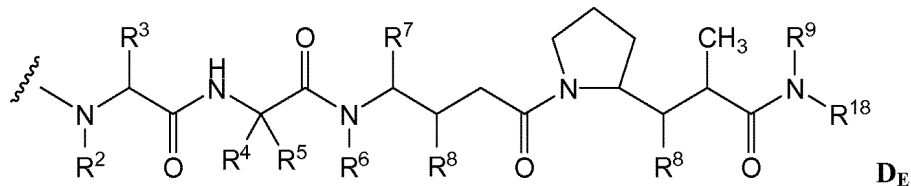
ー-薬剤成分をコンジュゲートするための方法は、例えば米国特許第5208020号、米国特許第6441163号、国際公開第2005037992号、国際公開第2005081711号、及び国際公開第2006/034488号に見られ、これらのすべては出典明記によって本明細書中に援用される。

別法として、抗体及び細胞障害剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。DNAの長さは、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの2つの部分をコードする領域をそれぞれ含有する。

更なる他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用して循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートさせた「リガンド」(例えばアビジン)を投与する。

【0065】

イムノコンジュゲートの一実施態様では、細胞障害性剤Dは式D_E又はD_Fのアウリスチンである。



このとき、R²及びR⁶それぞれがメチルであり、R³及びR⁴それぞれがイソプロピルであり、R⁷がsec-ブチルであり、それぞれのR⁸がCH₃、O-CH₃、OH及びHから別々に選択され、R⁹がHであり、R¹⁰がアリールであり、Zが-O-又は-NH-であり、R¹¹がH、C₁-C₈アルキル、又は-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-(CH₂)₂-O-CH₃であり、そして、R¹⁸が-C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-アリールであり、

(d) pがおよそ1から8の範囲である、

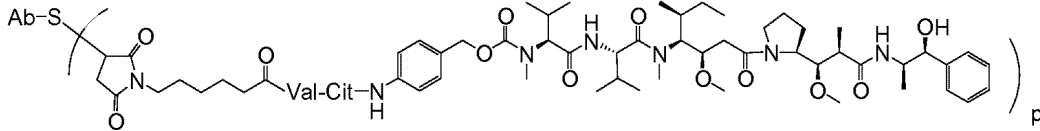
【0066】

以下の実施態様は前記いずれかのイムノコンジュゲートをさらに提供する。ある実施態様では、イムノコンジュゲートはインビトロ又はインビボでの細胞殺傷活性を有する。ある実施態様では、リンカーは抗体のチオール基を介して抗体に付着している。ある実施態様では、リンカーはプロテアーゼによって切断可能である。ある実施態様では、リンカーはval-citジペプチドを含む。ある実施態様では、リンカーはp-アミノベンジルユニットを含む。ある実施態様では、p-アミノベンジルユニットは薬剤とリンカーのプロテアーゼ切断部位との間に配置する。ある実施態様では、p-アミノベンジルユニット

は p-アミノベンジルオキシカルボニル(PAB)である。ある実施態様では、リンカーは 6-マレイミドカプロイルを含む。ある実施態様では、6-マレイミドカプロイルは抗体とリンカーのプロテアーゼ切断部位との間に配置する。前記の実施態様は単独で行われても、他のいずれかと組み合わせて行われてもよい。

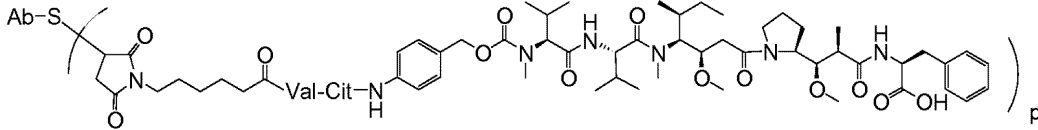
【0067】

ある実施態様では、薬剤はMMAE及びMMAFから選択される。ある実施態様では、イムノコンジュゲートは、式



10

を有し、このときAbは前記いずれかの抗CD22抗体であり、Sは硫黄原子であり、pは2から5の範囲である。ある実施態様では、イムノコンジュゲートは、式



20

を有し、このときAbは前記いずれかの抗CD22抗体であり、Sは硫黄原子であり、pはおよそ1からおよそ6、およそ2からおよそ5、およそ2からおよそ6、およそ2からおよそ4、およそ2からおよそ3、およそ3からおよそ4、およそ3からおよそ5、およそ3からおよそ6、およそ4からおよそ6の範囲である。

【0068】

標識抗体造影方法：

本発明の他の実施態様では、システイン改変抗体は、放射性核種、蛍光色素、バイオルミネセンスを誘発する基質成分、化学発光を誘発する基質成分、酵素、および診断用、薬物動態用、治療用の適用の造影実験のための他の検出標識を有するシステインチオールによって標識されてもよい。一般に、標識されたシステイン改変抗体、すなわち「バイオマーカー」又は「プローブ」は、注入、灌流又は経口摂取によって生きている生物体、例えばヒト、げっ歯動物、又は他の小動物、灌流される臓器、又は組織試料に投与される。プローブの分布は経時的に検出され、画像に表される。

【0069】

製造品：

本発明の他の態様では、上記の疾患の治療に有用な物質を具備する製造品又は「キット」が提供される。該製造品は容器と該容器上又は該容器に付随するラベル又はパッケージ挿入物を具備する。好適な容器には、例えば、ビン、バイアル、シリンジ、プリスター包装などが含まれる。容器は、様々な材料、例えばガラス又はプラスチックから形成される。容器は、症状を治療するために有効な抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)組成物を収容し、滅菌アクセスポートを有しうる(例えば、容器は皮下注射針が貫通可能なストッパーを有するバイアル又は静脈内投与溶液バッグでありうる)。組成物中の少なくとも一つの活性薬剤はADCである。ラベル又はパッケージ挿入物は、組成物が癌などの選択された症状の治療に使用されることを示す。あるいは、もしくは付加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば注射用の静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー液及びデキストロス溶液を含む第二の(又は第三の)容器を更に具備してもよい。

30

40

50

さらに、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業上及び使用者の見地から望ましい他の材料を含んでもよい。

【0070】

製薬的組成物：

ある態様では、前記いずれかのイムノコンジュゲートと薬学的に許容される担体とを含む製薬的組成物が提供される。ある態様では、製薬的組成物を個体に投与することを含む、B細胞増殖性疾患の治療方法が提供される。一実施態様では、B細胞増殖性疾患は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される。一実施態様では、細胞増殖性疾患は、細胞の表面上のCD22の発現増加と関係している。

10

一態様では、CD22へのイムノコンジュゲートの結合に許容される条件下で、前記いずれかのイムノコンジュゲートに細胞を曝すことを含む、細胞増殖の阻害方法が提供される。一実施態様では、B細胞は腫瘍細胞である。一実施態様では、腫瘍細胞は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択されるB細胞増殖性疾患に罹っているか、又は罹っていることが疑われる哺乳動物のB細胞である。一実施態様では、インビトロで曝す。一実施態様では、インビボで曝す。

20

一態様では、白血病又はリンパ腫に罹っている哺乳動物の血清可溶性CD22をアッセイしてB細胞白血病又はB細胞リンパ腫と診断し、該疾患の臨床進行又は退行を測定するため、又は、腫瘍の負荷や再燃を評価するための本発明の抗CD22抗体の使用方法が提供される。このような方法は、抗CD22 RFB4抗体PE38(シュドモナス属エキソトキシンA断片38)毒素コンジュゲート(Kreitman, R.J.等, NEJM 345:241-247 (2001)を参照)を用いた、米国特許公開20050244828(Kreitman, R.J.等、この全体の内容は出典明記によって本明細書中に援用される)に開示される。

【図面の簡単な説明】

【0071】

30

【図1A】 アイソフォームの細胞外ドメインの7つのイムノグロブリン様ドメインを示すCD22の線図である。アイソフォームはドメイン3および4を欠いている。「TM」は膜貫通領域を指す。

【図1B】 CD22の型のアミノ酸配列(配列番号：27)を示す。CD22の型は、イタリック体で示すアミノ酸(細胞外ドメインのドメイン3および4をコードする)を欠いている。タンパク質の成熟形態の細胞外ドメインを下線で示す(配列番号：28)。アミノ酸1-21は成熟形態から切断されるシグナル配列を示す。

【図1C】 CD22の型のアミノ酸配列(配列番号：29)である。CD22のECDを下線で示す(配列番号：30)。

【図1D】 カニクイザル(cyno)のCD22のアミノ酸配列(配列番号：31)である。cyno CD22の初めの19個のアミノ酸はシグナル配列である。

40

【図2A】 ヒト化10F4バージョン1抗体(h10F4v1)と整列配置し、さらにヒトのサブグループIII配列と整列配置した、本発明のマウス10F4抗CD22抗体(m10F4)の重鎖可変領域のアミノ酸配列を表す。HVRを囲って表す(HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3)。HVRを囲っている配列はフレームワーク配列(FR-H1からFR-H4)である。配列はカバット番号付けに従って番号をつける。囲ったHVRの近くのKabata、ChothiaおよびcontactCDRを示す。

【図2B】 ヒト化10F4バージョン1抗体(h10F4v1)と整列配置し、さらにヒトIII配列と整列配置した、本発明のマウス10F4抗CD22抗体(m10F4)の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を表す。ヒト化10F4抗体のバージョン2および3(h10F

50

4 v 2 および h 1 0 F 4 v 3) は、分泌された成熟形態と同じアミノ酸配列を有する。抗体 h 1 0 F 4 v 2 および h 1 0 F 4 v 3 は、HVR-L 1 のアミノ酸 2 8 で h 1 0 F 4 v 1 と異なる (N 2 8 V)。HVR を囲って表す。FR-L 1、FR-L 2、FR-L 3 及び FR-L 4 配列は HVR (HVR-L 1、HVR-L 2、HVR-L 3) を囲む。配列はカバット番号付けに従って番号をつける。囲った HVR の近くの Kabat、Chothia および contact CDR を示す。

【図 3 A - 3 B】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒト可変重鎖 (VH) コンセンサスフレームワーク配列を示す。ここで、FR の配列番号は FR-H 1、FR-H 2、FR-H 3、FR-H 4 の順に列挙する。- ヒト VH サブグループ I コンセンサスフレームワーク「A」からカバット CDR を除いたもの (配列番号：26、47、48、7)。- ヒト VH サブグループ I コンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの (配列番号：50、51、52、7；配列番号：50、51、52、7；及び配列番号：50、51、53、7)。- ヒト VH サブグループ II コンセンサスフレームワーク「A」からカバット CDR を除いたもの (配列番号：54、55、56、7)。- ヒト VH サブグループ II コンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの (配列番号：57、58、56、7；配列番号：57、58、59、7；及び配列番号：57、58、60、7)。- ヒト VH サブグループ III コンセンサスフレームワーク「A」からカバット CDR を除いたもの (配列番号：61、62、63、7)。- ヒト VH サブグループ III コンセンサスフレームワーク「B」、「C」及び「D」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの (配列番号：64、65、63、7；配列番号：64、65、66、7；及び配列番号：64、65、67、7)。- ヒト VH アクセプター 1 フレームワーク「A」からカバット CDR を除いたもの (配列番号：68、62、69、7)。- ヒト VH アクセプター フレームワーク「B」及び「C」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの (配列番号：64、65、69、7；及び配列番号：64、65、70、7)。- ヒト VH アクセプター 2 フレームワーク「A」からカバット CDR を除いたもの (配列番号：68、62、71、7)。- ヒト VH アクセプター 2 フレームワーク「B」、「C」及び「D」から伸展した高頻度可変領域を除いたもの (配列番号：64、65、71、7；配列番号：64、65、72、7；及び配列番号：64、65、73、7)。

【図 4 A - 4 B】以下に示す配列識別子を用いて本発明を実施する際に使用するための、例示的なアクセプターヒト可変軽鎖 (VL) コンセンサスフレームワーク配列を示す。- ヒト VL サブグループ I-1 コンセンサスフレームワーク (v 1-1)：配列番号：74、75、76、77。- ヒト VL サブグループ I コンセンサスフレームワーク (v 1)：配列番号：74、78、76、77。- ヒト VL サブグループ II コンセンサスフレームワーク (v 2)：配列番号：49、79、80、77。- ヒト VL サブグループ III コンセンサスフレームワーク (v 3)：配列番号：81、82、83、77。- ヒト VL サブグループ IV コンセンサスフレームワーク (v 4)：配列番号：84、85、86、77。

【図 5 A】天然配列ヒト IgG Fc 領域配列、hum IgG 1 (非 A アロタイプ、配列番号：38 及び配列番号：38 内のアミノ酸配列 SREEM が SRDEL に変化している A アロタイプ)、hum IgG 2 (配列番号：39)、hum IgG 3 (配列番号：40) および hum IgG 4 (配列番号：41) のアラインメントを示す。配列間で異なる部分にアスタリスクを付した。配列の上の数は EU 番号付けシステムを表す。例示的な 定常領域も示す。

【図 5 B】アイソタイプ IgG 1 であるヒト化抗 CD 2 2 抗体 1 0 F 4 v 2 の軽鎖及び重鎖の完全長アミノ酸配列 (可変領域および定常領域) を表す。下線部は定常ドメインを表す。

【図 6 A】リンパ腫細胞株の CD 2 2 ADC 有効性の様々な決定基を測定するアッセイの結果を示す。細胞表面 CD 2 2 レベルの高さが抗 CD 2 2-MCC-DM 1 の IC 5 0 の低さに相関している (より高い有効性) ことを示す。

10

20

30

40

50

【図6B】リンパ腫細胞株のCD22 ADC有効性の様々な決定基を測定するアッセイの結果を示す。抗CD22-MCC-DM1の取り込みの増加が抗CD22-MCC-DM1のIC50の低さに相関していることを示す。

【図6C】リンパ腫細胞株のCD22 ADC有効性の様々な決定基を測定するアッセイの結果を示す。遊離薬剤に対する細胞の固有の感受性の増加が抗CD22-MCC-DM1のIC50の低さに相関していることを示す。

【図6D】リンパ腫細胞株のCD22 ADC有効性の様々な決定基を測定するアッセイの結果を示す。細胞表面上のCD22への結合の後の蛍光標識した抗CD22抗体の取り込みを示す顕微写真である。

【図7A】ヒトのB細胞腫瘍を有するSCIDマウスへの抗CD22抗体mu10F4-smcc-DM1およびhu10F4v1-smcc-DM1の投与により腫瘍体積が有意に減少したことを示す異種移植片モデルにおけるインビボ腫瘍体積減少のグラフである。薬剤負荷はおよそ4および4.6であった。表4を参照。

【図7B】薬剤負荷がおよそ2.9と3.0の有意に低い場合の同様な実験のグラフである(表5を参照)。mu10F4-smcc-DM1及びhu10F4v2-smcc-DM1の有効性をコントロール抗体およびコンジュゲートしていないmu10F4と比較した。

【図7C】表6に示されるように、抗CD22-spp-DM1が投与された異種移植片モデルにおけるインビボ腫瘍減少のグラフである。

【図8A】ラモス細胞異種移植片に投与される抗CD22抗体5E8.1.8-smcc-DM1およびRFB4-smcc-DM1のグラフである。

【図8B】BJAB-1uc異種移植片に投与される抗CD22抗体5E8.1.8-smcc-DM1およびRFB4-smcc-DM1のグラフである。

【図9】低い、中間、及び高い薬剤負荷での抗CD22(RFB4)-smcc-DM1の投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。

【図10】ラモス異種移植片における抗CD22(RFB4)-MC-vcpab-MMAF又は抗CD22(RFB4)-MC-MMAFの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。

【図11】抗CD22(RFB4)-smcc-DM1又は-MCvcpab-MMAEの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。

【図12】表12に開示するように、MMAF又はDM1イムノコンジュゲートとしてのヒト化抗CD22 10F4変異体の投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。

【図13A】B細胞リンパ腫異種移植片モデル：SudHL-4における抗CD22-smcc-DM1又は抗CD22-MC-MMAFの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。

【図13B】B細胞リンパ腫異種移植片モデル：DoHH2における抗CD22-smcc-DM1又は抗CD22-MC-MMAFの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。

【図13C】B細胞リンパ腫異種移植片モデル：Grant-a-519における抗CD22-smcc-DM1又は抗CD22-MC-MMAFの投与後の時間経過に対する腫瘍体積への相対的な作用を示すグラフである。

【図14】実施例に記載の、エピトープマッピングのために欠失させたCD22ドメインの線図を示す。ドメインに1から7の番号を付ける。「TM」は膜貫通領域を指す。

【図15】薬剤成分が、軽鎖(LC-ADC)、重鎖(HC-ADC)及びFc領域(Fc-ADC)内の改変したシステイン基に付着しているシステイン改変抗CD22抗体薬剤コンジュゲート(ADC)を図示する。

【図16】(i)還元剤TCEP(トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン塩酸塩)によって、システイン改変抗CD22抗体(ThioMab)内のシステインジスルフィド付加物および鎖内ないし鎖間のジスルフィドを還元する、(ii)dhAA(デヒドロアスコルビン酸)にて部分的に酸化させる、すなわち再酸化させて鎖内及び鎖間のジスルフィド再形成

10

20

30

40

50

させる、そして、(iii) 薬剤-リンカー中間物と再酸化した抗体をコンジュゲートさせて、システイン改変抗CD22抗体薬剤コンジュゲート(ADC)を形成させる、という工程を示す。

【図17A】軽鎖又は重鎖又はFc領域が変化して選択したアミノ酸位のシステインが改変されている、本発明の抗CD22システイン改変抗体のアミノ酸配列を表す。カバット位置205(後の位置バリン210)のバリンがシステインに変えられている抗CD2210F4変異体軽鎖のアミノ酸配列を表す。各々の図において、変更したアミノ酸を二重下線を付した太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域には下線を付さない。

【図17B】軽鎖又は重鎖又はFc領域が変化して選択したアミノ酸位のシステインが改変されている、本発明の抗CD22システイン改変抗体のアミノ酸配列を表す。EU位置118(後の位置アラニン121)のアラニンがシステインに変えられている抗CD2210F4変異体重鎖のアミノ酸配列を表す。各々の図において、変更したアミノ酸を二重下線を付した太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域には下線を付さない。

【図17C】軽鎖又は重鎖又はFc領域が変化して選択したアミノ酸位のシステインが改変されている、本発明の抗CD22システイン改変抗体のアミノ酸配列を表す。EU位置400(後の位置セリン403)のセリンがシステインに変えられている抗CD2210F4変異体Fc領域のアミノ酸配列を表す。各々の図において、変更したアミノ酸を二重下線を付した太字で示す。一重下線は定常領域を示す。可変領域には下線を付さない。

【図18】BJAB-1uc3細胞の表面に発現されるCD22に対する、本発明の抗CD22 thiomab薬剤コンジュゲート(TDC)の結合が、示した異なる薬剤コンジュゲートに関してだけでなく、LC、HCおよびFc thiomab変異体についても類似していることを示すFACSプロット線である。

【図19】異なる抗CD22 TDCにて処置した異種移植片モデルにおける経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットしたグラフである。これは改変したシステイン(LC、HC又はFc)の位置によっておよび/または薬剤コンジュゲート(MMAF又はMMAE)によって変化した。抗CD22 TDC 10F4-LC-V210C-MCvcPAB-MMAEおよび抗CD22 10F4-HC-A121C-MCvcPAB-MMAEにて処置した異種移植片モデルは、研究の間に腫瘍体積の減少を示した。

【図20A】異なるリンカー薬剤成分にコンジュゲートした重鎖A118C抗CD22 TDCにて処置した、及び/又は示すように異なる用量で投与したCB17 SCIDマウスにおけるヒトのマントル細胞リンパ腫Grant-519異種移植片の経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットしたグラフである。抗CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDCは、この実験の試験薬剤に対して最も効果があったようである。

【図20B】同じ重鎖A118C抗CD22 TDCであるが高用量で処置したCB17 SCIDマウスの濾胞性リンパ腫DOHH2異種移植片の経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットしたグラフである。抗CD22 10F4-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDCは、この実験の試験薬剤に対して最も効果があったようである。

【図20C】研究開始の14日間で体重の有意な変化がなかったことを示す、DOHH2異種移植片実験のマウスにおける体重変化の割合のプロットである。

【図21A】切断可能なリンカー及び切断可能でないリンカーを含むADCが投与された場合の0日目と5日目の血清AST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)の変化を示す棒グラフである。

【図21B】切断可能なリンカー及び切断可能でないリンカーを含むADCが投与された場合の0日目と5日目の血清好中球の変化を示す棒グラフである。

【図22A】10、20および30mg/kgの抗CD22 MMAFを投与したカニクイザルの周辺B細胞(CD20+細胞)の枯渇を示すグラフである。

【図22B】10、20および30mg/kgの抗CD22 DM1を投与したカニクイザルの周辺B細胞(CD20+細胞)の枯渇を示すグラフである。

【図23A】10、20および30mg/kgの抗CD22 MMAFにおいてCD4+

10

20

30

40

50

リンパ球の有意な変化を示さないグラフである。

【図 2 3 B】10、20 および 30 mg / kg の抗 CD 2 2 DM 1 において CD 4 + リンパ球の有意な変化を示さないグラフである。

【図 2 4】ピヒクルコントロール(図 2 4 A)において胚中心 B 細胞の枯渇が見られるカニクイザル扁桃腺組織の組織学的試料が 10 mg / kg の hu 1 0 F 4 v 3 - S M C C - D M 1 を投与した動物の扁桃腺試料において減少することを示す。

【図 2 5】研究のために採取した組織試料の脾臓濾胞の領域を示す線図であり、ここでは、抗 CD 2 2 ADC がカニクイザルの静止組織の B 細胞を残すことが示された(図 2 5 A)。c y n o 脾臓濾胞胚中心の分化する細胞は、10 mg / kg の hu 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F を投与した動物の c y n o 脾臓の胚細胞を分化させる際に減少した(図 2 5 B および 2 5 C)。分化しないナイーブ B 細胞は同じ条件下で枯渇しなかった(図 2 5 D 及び 2 5 E)。

10

【発明を実施するための形態】

【0072】

(本発明の実施態様の詳細な説明)

CD 2 2 に結合する単離された抗体が提供される。さらに、抗 CD 2 2 抗体を含んでなるイムノコンジュゲートが提供される。さらに、システイン改変抗 CD 2 2 抗体及びそのイムノコンジュゲートが提供される。本発明の抗体及びイムノコンジュゲートは、例えば、CD 2 2 の発現の変更、例えば発現の増加と関係している疾患の診断又は治療に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、腫瘍又は癌などの細胞増殖性疾患の診断又は治療に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、CD 2 2、例えば細胞表面上に発現される CD 2 2 の検出に有用である。

20

抗 CD 2 2 抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。抗 CD 2 2 抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供され、さらに該ベクターを含む宿主細胞が提供される。また、本発明のポリヌクレオチド、抗 CD 2 2 抗体又はイムノコンジュゲートのいずれか一又は複数を含む製剤を含む組成物が提供される。

【0073】

一般的技術

本願明細書中に記載又は引用される技術及び手順は、一般に十分に理解されるものであり、当業者によって従来の方法論を用いて共通して実施されるものである。その例として、以下の文献に記載される方法論が広く利用されている。Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd. edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel, 等 編集, (2003)); the series *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.): PCR 2: A PRACTICAL APPROACH (M. J. MacPherson, B. D. Hames 及び G. R. Taylor 編集 (1995)), Harlow and Lane, 編集 (1988) *ANTIBODIES, A LABORATORY MANUAL*, and *ANIMAL CELL CULTURE* (R. I. Freshney, 編集. (1987)); *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, 編集, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, 編集, 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), 編集, 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, 及び D. G. Newell, 編集, 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir 及び C. C. Blackwell, 編集); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller 及び M. P. Calos, 編集, 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis 等, 編集, 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan 等, 編集, 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley 及び Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway 及び P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: a practical approach* (D. Catty., 編集, IRL Press, 1988-1989); *Monoclonal antibodies: a practical approach*

30

40

50

ch (P. Shepherd 及び C. Dean, 編集, Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow 及び D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti 及び J. D. Capra, 編集, Harwood Academic Publishers, 1995); 及び Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita 等, 編集, J.B. Lippincott Company, 1993)。

【0074】

定義と省略記号

定義

「単離された」抗体とは、その自然環境の成分から同定され分離され及び/又は回収されたものである。その自然環境の汚染成分とは、抗体の研究、診断又は治療的な使用を妨害する物質であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質様又は非タンパク質様溶質が含まれる。ある実施態様では、タンパク質は、(1)例えばローリー法で測定した場合95%を超える抗体、ある実施態様では99重量%を超えるまで、(2)例えばスピニングカップシークエネーターを使用することにより、少なくとも15のN末端あるいは内部アミノ酸配列の残基を得るのに十分なほど、あるいは、(3)例えばクーマシーブルーあるいは銀染色を用いた非還元あるいは還元条件下でのSDS-PAGEにより均一になるまで十分なほど精製される。抗体の自然環境の少なくとも一の成分が存在しないため、単離された抗体には、組換え細胞内のインサイツでの抗体が含まれる。しかしながら、通常は、単離された抗体は少なくとも一の精製工程により調製される。

10

【0075】

「単離された」核酸分子は、例えば天然の環境に通常付随している少なくとも一の他の核酸分子から分離された核酸分子である。さらに、単離された核酸分子は、例えば、核酸分子を通常発現するが、その核酸分子がその天然の染色体位置と異なる染色体位置にあるか又は染色体外に存在する、細胞に含まれる核酸分子を含む。

20

「精製」とは、分子が、含まれる試料中の重量にして少なくとも95%、又は重量にして少なくとも98%の濃度で試料中に存在することを意味する。

【0076】

ここで用いる「実質的に類似」、「実質的に同じ」なる用語は、当業者が2つの数値(例えば、本発明の抗体に関連するもの、及び参照/比較抗体に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばKd値)によって測定される生物学的性質上わずかに又は全く生物学的及び/又は統計学的有意差がないと認められるほど、2つの数値が有意に類似していることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照/比較値の例えば約50%以下、約40%以下、約30%以下、約20%以下、及び/又は約10%以下である。

30

ここで用いる「実質的に減少」、又は「実質的に異なる」という句は、当業者が2つの数値(一般に、分子に関連するもの、及び参照/比較分子に関連する他のもの)の差異に、該値(例えばKd値)によって測定される生物学的性質上統計学的に有意であると認められるほど、2つの数値が有意に異なっていることを意味する。前記2つの値間の差異は、参照/比較分子の値の、例えば約10%より大きく、約20%より大きく、約30%より大きく、約40%より大きく、及び/又は約50%より大きい。

40

【0077】

ここで使用される「ベクター」という用語は、それが結合している他の核酸を輸送することのできる核酸分子を意味するものである。一つのタイプのベクターは「プラスミド」であり、これは付加的なDNAセグメントが結合されうる円形の二本鎖DNAを意味する。他の型のベクターはファージベクターである。他の型のベクターはウイルスベクターであり、付加的なDNAセグメントをウイルスゲノムへ結合させうる。所定のベクターは、それらが導入される宿主細胞内において自己複製することができる(例えば、細菌の複製開始点を有する細菌ベクターとエピソーム哺乳動物ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、宿主ゲノムと共に複製する。更に、所定のベクターは、それらが作用可能に結合している遺伝子の発現を指令し得る。このようなベクターはここでは「組換え発現ベクター」

50

(又は単に「発現ベクター」と呼ぶ。一般に、組換えDNA技術で有用な発現ベクターはしばしばプラスミドの形をとる。本明細書では、プラスミドが最も広く使用されているベクターの形態であるので、「プラスミド」と「ベクター」を相互交換可能に使用する場合が多い。

【0078】

ここで交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを意味し、DNA及びRNAが含まれる。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾されたヌクレオチド又は塩基、及び/又はそれらの類似体(アナログ)、又はDNAもしくはRNAポリメラーゼにより、もしくは合成反応によりポリマー中に取り込み可能な任意の基質とすることができる。ポリヌクレオチドは、修飾されたヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。存在するならば、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリマーの組み立ての前又は後になされ得る。ヌクレオチドの配列は非ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは合成後になされる修飾(一又は複数)、例えば標識との結合を含みうる。他のタイプの修飾には、例えば「キャップ(caps)」、類似体との自然に生じたヌクレオチドの一又は複数の置換、ヌクレオチド間修飾、例えば非荷電連結(例えばホスホン酸メチル、ホスホトリエステル、ホスホアミダート、カルバマート等)及び荷電連結(ホスホロチオアート、ホスホロジチオアート等)を有するもの、ペンダント部分、例えばタンパク質(例えばヌクレアーゼ、毒素、抗体、シグナルペプチド、poly-L-リジン等)を含むもの、インターカレータ(intercalators)を有するもの(例えばアクリジン、ソラレン等)、キレート剤(例えば金属、放射性金属、ホウ素、酸化的金属等)を含むもの、アルキル化剤を含むもの、修飾された連結を含むもの(例えばアルファアノマー核酸等)、並びにポリヌクレオチド(類)の未修飾形態が含まれる。更に、糖類中に通常存在する任意のヒドロキシル基は、例えばホスホナート基、ホスファート基で置き換えられてもよく、標準的な保護基で保護されてもよく、又は付加的なヌクレオチドへのさらなる連結を調製するように活性化されてもよく、もしくは固体又は半固体担体に結合していてもよい。5'及び3'末端のOHはホスホリル化可能であり、又は1~20の炭素原子を有する有機キャップ基部分又はアミンで置換することもできる。また他のヒドロキシルは標準的な保護基に誘導体化されてもよい。またポリヌクレオチドは当該分野で一般的に知られているリボース又はデオキシリボース糖類の類似形態のものをさらに含み得、これらには例えば2'-O-メチル-、2'-O-アリル、2'-フルオロ又は2'-アジド-リボース、炭素環式糖の類似体、アルファ-アノマー糖、エピマー糖、例えばアラビノース、キシロース類又はリキソース類、ピラノース糖、フラノース糖、セドヘブツロース、非環式類似体、及び非塩基性ヌクレオチド類似体、例えばメチルリボシドが含まれる。一又は複数のホスホジエステル連結は代替の連結基で置き換えてもよい。これらの代替の連結基には、限定されるものではないが、ホスファートがP(O)S(「チオアート」)、P(S)S(「ジチオアート」)、(O)NR₂(「アミダート」)、P(O)R、P(O)OR'、CO又はCH₂(「ホルムアセタール」)と置き換えられた実施態様のものが含まれ、ここでそれぞれのR及びR'は独立して、H又は、エーテル(-O-)結合を含んでいてもよい置換もしくは未置換のアルキル(1-20C)、アリール、アルケニル、シクロアルキル、シクロアルケニル又はアラリジル(araldyl)である。ポリヌクレオチド中の全ての結合が同一である必要はない。先の記述は、RNA及びDNAを含むここで引用される全てのポリヌクレオチドに適用される。

ここで使用される「オリゴヌクレオチド」とは、短く、一般的に単鎖であり、また必ずしもそうではないが、一般的に約200未満のヌクレオチド長さの、一般的に合成のポリヌクレオチドを意味する。「オリゴヌクレオチド」及び「ポリヌクレオチド」なる用語は、相互に排他的なものではない。ポリヌクレオチドについての上述した記載はオリゴヌクレオチドと等しく、十分に適用可能である。

【0079】

ここで同定した参照ポリペプチド配列に関する「パーセント(%)アミノ酸配列同一性」とは、配列を整列させ、最大のパーセント配列同一性を得るために必要ならば間隙を導入

10

20

30

40

50

し、如何なる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとした後の、特定の参照ポリペプチド配列のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基のパーセントとして定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を測定する目的のためのアラインメントは、当業者の技量の範囲にある種々の方法、例えばBLAST、BLAST-2、ALIGN、又はMegalign(DNASTAR)ソフトウェアのような公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成可能である。当業者であれば、比較される配列の完全長に対して最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列をアラインメントするための適切なパラメータを決定することができる。しかし、ここでの目的のためには、%アミノ酸配列同一性値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用することによって得られる。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムはジェネンテック社によって作製され、ソースコードは米国著作権庁、ワシントンD.C., 20559に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087で登録されている。ALIGN-2プログラムはジェネンテック社、サウス サン フランシスコ、カリフォルニアから公的に入手可能であり、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、UNIX(登録商標)オペレーティングシステム、好ましくはデジタルUNIX(登録商標)V4.0Dでの使用のためにコンパイルされる。全ての配列比較パラメータは、ALIGN-2プログラムによって設定され変動しない。

10

【0080】

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、与えられたアミノ酸配列Aの、与えられたアミノ酸配列Bとの、又はそれに対する%アミノ酸配列同一性(あるいは、与えられたアミノ酸配列Bと、又はそれに対して或る程度の%アミノ酸配列同一性を持つ又は含む与えられたアミノ酸配列Aと言うこともできる)は次のように計算される：

20

分率 X/Y の 100 倍

ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2のA及びBのプログラムアラインメントによって同一であると一致したスコアのアミノ酸残基の数であり、YはBの全アミノ酸残基数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さとは異なる場合、AのBに対する%アミノ酸配列同一性は、BのAに対する%アミノ酸配列同一性とは異なることは理解されるであろう。特に断らない限りは、ここでの全ての%アミノ酸配列同一性値は、直ぐ上のパラグラフに示したようにALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られる。

30

【0081】

ここで「B細胞表面上マーカー」又は「B細胞表面上抗原」とは、B細胞の表面上に発現する抗原であり、それを結合するアンタゴニスト、例えば限定するものではないが、天然に生じるB細胞抗原へのリガンドの結合をアンタゴナイズすることができるB細胞表面抗原ないしB細胞表面抗原の可溶性に対する抗体の標的となることができるものである。例示的B細胞表面上マーカーには、CD10、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD37、CD40、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85及びCD86白血球表面上マーカーが含まれる。(詳しくは、The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition, 1997, Barclay等編集, Academic Press, Harcourt Brace & Co., New Yorkを参照)。他のB細胞表面上マーカーには、RP105、FcRH2、B細胞CR2、CCR6、P2X5、HLA-DOB、CXCR5、FCER2、BR3、BAFF、BLyS、BtiG、NAG14、SLGC16270、FcRH1、IRTA2、ATWD578、FcRH3、IRTA1、FcRH6、BCMA、及び239287などがある。特に対象とするB細胞表面上マーカーは、哺乳動物の他の非B細胞組織と比較してB細胞上に主に発現しており、B細胞前駆細胞及び成熟B細胞の両方の細胞上に発現していてもよい。

40

【0082】

特に明記しない限り、本明細書で用いられる「CD22」なる用語は、霊長類(例えばヒト、カニクイザル(cyno))および齧歯動物(例えばマウスおよびラット)のような哺乳

50

乳動物を含む任意の脊椎動物の供与源からの任意の天然のCD22を指す。この用語は、細胞内のプロセッシングから生じる任意の形態のCD22だけでなく、「完全長の」プロセッシングされていないCD22を包含する。また、この用語は、天然に生じるCD22の変異体、例えばスプライス変異体、対立遺伝子変異体及びアイソフォームも包含する。CD22(CD22)の主なアイソフォームは、847のアミノ酸と細胞外ドメインに7つのイムノグロブリン様領域を含む(Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)を参照)。微量なアイソフォームであるCD22は647のアミノ酸を含み、細胞外ドメインのイムノグロブリン様ドメイン3および4を欠いている(Stamenkovic, I. and Seed, B., Nature 345:74-77 (1990)) and Wilson等 (1991), supraを参照)。CD22のアミノ酸配列を図1Bに示す。ここでは、下線部が細胞外ドメイン(ECD)であり、イタリック体の部分がCD22細胞外ドメイン配列から欠いているアミノ酸を示す。図1CはCD22のアミノ酸配列を示し、ここではECDを下線で示す。アミノ酸1からアミノ酸21のアミノ酸配列は、成熟型のタンパク質から切断されるシグナル配列を表す。一実施態様では、CD22は、正常B細胞又は腫瘍B細胞の表面上などの細胞表面上に発現される。図1Dは、カニクイザルのCD22のアミノ酸配列を表す。

10

【0083】

「抗体」(Ab)及び「免疫グロブリン」(Ig)は、類似の構造的特徴を有する糖タンパク質である。抗体は、特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体と、一般に抗原特異性を欠く抗体様分子の双方を含む。後者の種類のポリペプチドは、例えばリンパ系では低レベルで、骨髄腫では高レベルで産出される。

20

「抗体」及び「免疫グロブリン」なる用語は、最も広義で相互に交換可能に使用され、モノクローナル抗体(例えば、全長又は無傷のモノクローナル抗体)、ポリクローナル抗体、一価抗体、多価抗体、多重特異性抗体(例えば、所望の生物活性を示す限り二重特異性抗体)が含まれ、さらにある種の抗体断片(ここに詳細に記載されるもの)も含まれ得る。抗体は、キメラ、ヒト、ヒト化及び/又は親和成熟したものであってよい。

【0084】

「抗CD22抗体」又は「CD22に結合する抗体」は、抗体がCD22をターゲティングする際に診断用及び/又は治療用の薬剤として有用である程度に十分な親和性を有してCD22を結合することが可能である抗体を指す。好ましくは、関係がなくCD22でないタンパク質への抗CD22抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定するところの、CD22への抗体の結合のおよそ10%未満である。ある実施態様では、CD22に結合する抗体は、1 μ M、100nM、10nM、1nM、又は0.1nMの解離定数(Kd)を有する。ある実施態様では、抗CD22抗体は、異なる種のCD22間で保存されるCD22のエピトープに結合する。

30

【0085】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」とは、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを意味する。重鎖の可変ドメインは「VH」と称されうる。軽鎖の可変ドメインは「VL」と称されうる。これらのドメインは一般に抗体の最も可変の部分であり、抗原結合部位を含む。

「可変」という用語は、可変ドメインのある部位が、抗体の中で配列が広範囲に異なっており、その特定の抗原に対する各特定の抗体の結合性及び特異性に使用されているという事実を意味する。しかしながら、可変性は抗体の可変ドメインにわたって一様には分布していない。軽鎖及び重鎖の可変ドメインの両方の相補性決定領域(CDR)又は高頻度可変領域(HVR)と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保持された部分はフレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、シート構造を結合し、ある場合にはその一部を形成するループ結合を形成する、3つのCDRにより連結されたシート配置を主にとる4つのFR領域をそれぞれ含んでいる。各鎖のCDRは、FRによって近接して結合され、他の鎖のCDRと共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している(Kabatら, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメ

40

50

インは、抗体の抗原への結合に直接関連しているものではないが、種々のエフェクター機能、例えば抗体依存性細胞毒性への抗体の関与を示す。

【0086】

任意の脊椎動物種からの抗体(イムノグロブリン)の「軽鎖」には、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ()及びラムダ()と呼ばれる2つの明確に区別される型の一つが割り当てられる。

その重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、抗体(免疫グロブリン)は異なるクラスが割り当てられる。免疫グロブリンには5つの主なクラスがある: I g A、I g D、I g E、I g G及びI g M、更にそれらは、I g G₁、I g G₂、I g G₃、I g G₄、I g A₁、及びI g A₂等のサブクラス(アイソタイプ)に分かれる。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインはそれぞれ、 κ 、 λ 、 δ 、 ϵ 、及び μ と呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造及び三次元立体配位はよく知られており、例えば、Abbas等、Cellular and Mol. Immunology, 第4版(2000)に概説されている。抗体は、抗体と1以上の他のタンパク質又はペプチドとの共有結合性又は非共有結合性の会合により形成された融合大分子の一部であり得る。

【0087】

「完全長抗体」、「インタクトな抗体」、及び「全抗体」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、ほぼインタクトな形態の抗体を指し、以下に定義するような抗体断片は意味しない。この用語は、特にFc領域を含む重鎖を有する抗体を指す。

「抗体断片」は完全な抗体の一部のみを含んでなるものであり、その一部は、完全な抗体に存在する場合のその一部に通常関連する機能の少なくとも一、及び多ければその殆ど又は全てを保持する。一実施態様では、抗体断片は完全な抗体の抗原結合部位を含んでなるために、抗原結合能を有する。他の実施態様では、抗体断片は、例えばFc領域を含んでなるものは、完全な抗体に存在する場合のFc領域に通常関連する生物学的な機能、例えばFcRn結合、抗体半減期の調節、ADCC機能及び補体結合の少なくとも一を保持する。一実施態様では、抗体断片は、完全な抗体と実質的に類似したインビボ半減期を有する一価性抗体である。例えば、このような抗体断片は、インビボ安定性を断片に与えることができるFc配列に結合した抗原結合アームを含んでもよい。

【0088】

抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗体結合断片を生成し、その各々は単一の抗原結合部位を持ち、残りは容易に結晶化する能力を反映して「Fc」断片と命名される。ペプシン処理はF(ab')₂断片を生じ、それは2つの抗原結合部位を持ち、抗原を交差結合することができる。

「Fv」は、完全な抗原結合部位を含む最小抗体断片である。ある実施態様では、二本鎖Fv種は、堅固な非共有結合をなした一つの重鎖及び一つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。一本鎖Fv(scFv)種では、柔軟なペプチドリinkerによって1の重鎖及び1の軽鎖可変ドメインは共有結合性に連鎖することができ、よって軽鎖及び重鎖は、二本鎖Fv種におけるものと類似の「二量体」構造に連結することができる。この配置において、各可変ドメインの3つのCDRは相互に作用してVH-VL二量体表面に抗原結合部位を形成する。集合的に、6つのCDRが抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異的な3つのCDRのみを含むFvの半分)でさえ、全結合部位よりも親和性が低くなるが、抗原を認識して結合する能力を有している。

【0089】

またFab断片は、重鎖及び軽鎖の可変ドメインを含み、軽鎖の定常ドメインと重鎖の第一定常領域(CH1)を有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの一又は複数のシステインを含む重鎖CH1領域のカルボキシ末端に数個の残基が付加している点でFab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が一つの遊離チオール基を担持しているFab'に対するここでの命名である。F(ab')₂抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生産された。また、抗体断片の他の化学結合も知られている。

10

20

30

40

50

「一本鎖 F v」又は「s c F v」抗体断片は、抗体の V H 及び V L ドメインを含み、これらのドメインは単一のポリペプチド鎖に存在する。通常、s c F v ポリペプチドは V H 及び V L ドメイン間にポリペプチドリッカーを更に含み、それは s c F v が抗原結合に望まれる構造を形成するのを可能にする。s c F v の概説については、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg 及び Moore 編, Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) の Pluckthun を参照のこと。

【 0 0 9 0 】

「ダイアボディ」なる用語は、2つの抗原結合部位を持つ小さい抗体断片を指し、その断片は同一のポリペプチド鎖 (V H - V L) 内で軽鎖可変ドメイン (V L) に重鎖可変ドメイン (V H) が結合してなる。非常に短いために同一鎖上で2つのドメインの対形成が可能であるリンカーを使用して、ドメインを他の鎖の相補ドメインと強制的に対形成させ、2つの抗原結合部位を創製する。ダイアボディは二価でも二特異性であってもよい。ダイアボディは、例えば、欧州特許第 4 0 4 0 9 7 号；国際公開第 9 3 / 1 1 1 6 1 号；Hudson 等 (2003) Nat. Med. 9:129-134；及び Hollinger 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) に更に詳細に記載されている。トリアボディ及びテトラボディもまた Hudson 等 (2003) Nat. Med. 9:129-134 に記載されている。

10

【 0 0 9 1 】

ここで使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団に含まれる個々の抗体は、少量で存在しうる可能性がある突然変異、例えば自然に生じる突然変異を除いて同一である。従って、「モノクローナル」との形容は、個別の抗体の混合物ではないという抗体の性質を示す。ある実施態様では、このようなモノクローナル抗体は、通常、標的に結合するポリペプチド配列を含む抗体を含み、この場合、標的に結合するポリペプチド配列は、複数のポリペプチド配列から単一の標的結合ポリペプチド配列を選択することを含むプロセスにより得られる。例えば、この選択プロセスは、雑種細胞クローン、ファージクローン又は組換え DNA クローンのプールのような複数のクローンからの、唯一のクローンの選択とすることができる。重要なのは、選択された標的結合配列を更に変化させることにより、例えば標的への親和性の向上、標的結合配列のヒト化、細胞培養液中におけるその産生の向上、インビボでの免疫原性の低減、多選択性抗体の生成等が可能になること、並びに、変化させた標的結合配列を含む抗体も、本発明のモノクローナル抗体であることである。異なる決定基 (エピトープ) に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体の調製物とは異なり、モノクローナル抗体の調製物の各モノクローナル抗体は、抗原の単一の決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体の調製物は、それらが他の免疫グロブリンで通常汚染されていないという点で有利である。

20

30

「モノクローナル」との形容は、抗体の、実質的に均一な抗体の集団から得られたものであるという特性を示し、抗体を何か特定の方法で生産しなければならないことを意味するものではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は様々な技術によって作製することができ、それらの技術には、例えば、ハイブリドーマ法 (例えば、Kohler 等, Nature, 256:495 (1975)；Harlow 等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988)；Hammerling 等: Monoclonal Antibodies and T-Cell hybridomas 563-681 (Elsevier, N. Y., 1981))、組換え DNA 法 (例えば、米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号参照)、ファージディスプレイ技術 (例えば、Clackson 等, Nature, 352:624-628 (1991)；Marks 等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)；Sidhu 等, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004)；Lee 等, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)；Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)；及び Lee 等, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004))、並びに、ヒト免疫グロブリン座位の一部又は全部、或るいはヒト免疫グロブリン配列をコードする遺伝子を有する動物にヒト又はヒト様抗体を生成する技術 (例えば、国際公開第 9 8 / 2 4 8 9 3 号；国際公開第 9 6 / 3 4 0 9 6 号；国際公開第 9 6 / 3 3 7 3 5 号；国際公開第 9 1 / 1 0 7 4 1 号；Jakobovits 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)；Jakobovits 等, Nature 362

40

50

: 255-258 (1993); Bruggemann等, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 米国特許第 5 5 4 5 8 0 7 号; 同第 5 5 4 5 8 0 6 号; 同第 5 5 6 9 8 2 5 号; 同第 5 6 2 5 1 2 6 号; 同第 5 6 3 3 4 2 5 号; 同第 5 6 6 1 0 1 6 号; Marks等, *Bio.Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg等, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild等, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996)及びLonberg及びHuszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)参照)が含まれる。

【 0 0 9 2 】

ここでモノクローナル抗体は、特に「キメラ」抗体を含み、それは特定の種由来又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致する又は類似する重鎖及び/又は軽鎖の一部であり、残りの鎖は、所望の生物学的活性を表す限り、抗体断片のように他の種由来又は他の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体において、対応する配列に一致するか又は類似するものである(米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号; 及びMorrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855(1984))。

【 0 0 9 3 】

非ヒト(例えばマウス)の抗体の「ヒト化」型は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントの高頻度可変領域の残基が、マウス、ラット、ウサギ又は所望の特異性、親和性及び/又は能力を有する非ヒト霊長類のような非ヒト種(ドナー抗体)からの高頻度可変領域の残基によって置換されたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。例として、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基によって置換される。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも、もしくはドナー抗体にも見出されない残基を含んでいてもよい。これらの修飾は抗体の特性をさらに洗練するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、全てあるいは実質的に全ての高頻度可変ループが非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てあるいは実質的に全てのFRが、ヒト免疫グロブリン配列のものである少なくとも一又は典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。また、ヒト化抗体は、場合によっては免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンのもの少なくとも一部も含む。さらなる詳細については、Jones等, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmann等, *Nature* 332:323-329(1988); 及びPresta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596(1992)を参照のこと。また次の文献とそこに引用されている文献を参考のこと: Vaswani及びHamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurle及びGross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994)。

【 0 0 9 4 】

「ヒト抗体」は、ヒトによって生産される抗体のアミノ酸配列に相当するアミノ酸配列を有するもの、及び/又はここに開示されたヒト抗体を作製する任意の技術を使用して製造されたものである。ヒト抗体のこの定義は、特に非ヒト抗原結合残基を含んでなるヒト化抗体を除く。

ここで使用される「高頻度可変領域」、「HVR」又は「HV」なる用語は、配列において高頻度可変であり、及び/又は構造的に定まったループを形成する抗体可変ドメインの領域を意味する。一般に、抗体は6つの高頻度可変領域を含み; VHに3つ(H1、H2、H3)、VLに3つ(L1、L2、L3)である。天然の抗体では、H3及びL3は6つの高頻度可変領域のうちで最も高い多様性を示す、特にH3は抗体に良好な特異性を与える際に特有の役割を果たすように思われる。Xu等 (2000) *Immunity* 13:37-45; *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ)のJohnson and Wu (2003)。実際、重鎖のみからなる天然に生じるラクダ科の抗体は機能的であり、軽鎖が無い状態で安定である。Hamers-Casterman等 (1993) *Nature* 363:446-448; Sheriff等 (1996) *Nature Struct. Biol.* 3:733-736。

【 0 0 9 5 】

多数の高頻度可変領域の描写が使用され、ここに含まれる。カバット相補性決定領域(

C D R)は配列変化に基づいており、最も一般的に使用されている(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置に言及している(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。A b M高頻度可変領域は、カバットC D RとChothia構造的ループの間の妥協を表し、Oxford MolecularのA b M抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」高頻度可変領域は、利用できる複合体結晶構造の分析に基づく。これら高頻度可変領域のそれぞれからの残基を以下に示す。

ループ	カバット	A b M	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(カバット番号付け)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia番号付け)				
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

10

【0096】

高頻度可変領域は、次のような「拡大高頻度可変領域」を含むことができる、即ち、V Lの24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)と、V Hの26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102、又は95-102(H3)である。可変ドメイン残基には、これら各々を規定するために、上掲のKabat等に従って番号を付した。本発明の抗C D 2 2 1 0 F 4抗体のH V R-H1及びH V R-H2の高頻度可変領域はカバット番号付けを用いるとH26-H35及びH49-H65である。

20

「フレームワーク」又は「FR」残基は、ここで定義する高頻度可変領域残基以外の可変ドメイン残基である。

【0097】

「カバット(Kabat)による可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットに記載のアミノ酸位番号付け」なる用語及びその異なる言い回しは、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)の抗体の編集の軽鎖可変ドメイン又は重鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを用いると、実際の線形アミノ酸配列は、可変ドメインのFR又はHVR内の短縮又は挿入に相当する2、3のアミノ酸又は付加的なアミノ酸を含みうる。例えば、重鎖可変ドメインには、重鎖FR残基82の後に挿入された残基(例えばカバットによる残基82a、82b及び82cなど)と、H2の残基52の後に単一アミノ酸の挿入(Kabatによる残基52a)を含んでもよい。残基のKabat番号は、「標準の」カバット番号付け配列によって抗体の配列の相同領域でアライメントすることによって与えられる抗体について決定してもよい。

30

40

【0098】

「遊離したシステインアミノ酸」は、親抗体内に改変されているシステインアミノ酸残基を指し、チオール官能基(-SH)を有し、対形成もしないし、分子内ないし分子間ジスルフィド架橋の一部にもならない。

「チオール反応値」なる用語は、遊離したシステインアミノ酸の反応性の定量的特徴づけである。チオール反応値は、チオール反応試薬と反応するシステイン改変抗体の遊離したシステインアミノ酸の割合であって、1の最大値に変換される。例えば、ピオチン-マレイミド試薬などのチオール反応試薬と100%の収率で反応してピオチン標識抗体を形成するシステイン改変抗体の遊離システインアミノ酸はチオール反応値が1.0となる。チオール反応試薬と80%の収率で反応する同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシ

50

ステインアミノ酸はチオール反応値が0.8となる。チオール反応試薬と完全に反応しない同じ又は異なる親抗体内で改変された他のシステインアミノ酸はチオール反応値が0となる。特定のシステインのチオール反応値の測定は、ELISAアッセイ、質量分析、液体クロマトグラフィ、オートラジオグラフィ、又は他の定量的な分析試験によって行ってもよい。システイン改変抗体のキャプチャやシステイン反応性の比較及び定量化を可能にするチオール反応試薬には、ピオチン-PEO-マレイミド((+)-ピオチニル-3-マレイミドプロピオナミジル-3,6-dioxaoctanediamine、Oda等(2001) Nature Biotechnology 19:379-382, Pierce Biotechnology, Inc.) ピオチン-BMCC、PEO-ヨードアセチルピオチン、ヨードアセチル-LC-ピオチン、およびピオチン-HPDP (Pierce Biotechnology, Inc.) およびN-(3-マレイミドイルプロピオンイル)ピオシチン(MPB, Molecular Probes, Eugene, OR)が含まれる。ピオチン化、二官能性及び多官能性リンカー試薬の他の商業的な供与源には、Molecular Probes, Eugene, OR、及びSigma, St. Louis, MOが含まれる。

「親抗体」は、一又は複数のアミノ酸残基が一又は複数のシステイン残基に置き換わっているアミノ酸配列を含む抗体である。親抗体は、天然の又は野生型の配列を含んでもよい。親抗体は、他の天然、野生型又は修飾した形態の抗体と比較して既存のアミノ酸配列修飾(例えば付加、欠失および/または置換)を有してもよい。親抗体は、対象の標的抗原、例えば生物学上重要なポリペプチドに対するものであってもよい。また、非ポリペプチド抗原(例えば腫瘍関連糖脂質抗原; 米国特許第5091178号を参照)に対する抗体も考慮される。

【0099】

本明細書中では以下の略語を用い、言及した定義を有する。BMEはβ-メルカプトエタノールであり、BocはN-(t-ブトキシカルボニル)であり、citはシトルリン(2-アミノ-5-ウレイドペンタン酸)であり、dapはドラプロイン(dolaproine)であり、DCCは1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、DCMはジクロロメタンであり、DEAはジエチルアミンであり、DEADはジエチルアゾジカルボキシレートであり、DEPCはジエチルホスホリルシアニダートであり、DIADはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、DIEAはN,N-ジイソプロピルエチルアミンであり、dilはドライソロイシンであり、DMAはジメチルアセトアミドであり、DMApは4-ジメチルアミノピリジンであり、DMEはエチレングリコールジメチルエーテル(又は1,2-ジメトキシエタン)であり、DMFはN,N-ジメチルホルムアミドであり、DMSOはジメチルスルホキシドであり、doeはドラフェニン(dolaphenine)であり、dovはN,N-ジメチルバリンであり、DTNBは5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)であり、DTPAはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、DTTはジチオトレイトールであり、EDCIは1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩であり、EEDQは、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリンであり、ES-MSはエレクトロスプレー質量分析であり、EtOAcは酢酸エチルであり、FmocはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、glyはグリシンであり、HATUは、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、HOBtは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、HPLCは高速液体クロマトグラフィであり、ileはイソロイシンであり、lysはリジンであり、MeCN(CH₃CN)はアセトニトリルであり、MeOHはメタノールであり、Mtrは4-アニシルジフェニルメチル(又は4-メトキシトリチル)であり、(1S,2R)-(+)-ノルエフェドリンではなく、PABはp-アミノベンジルカルバモイルであり、PBSはリン酸塩緩衝生理食塩水(pH7)であり、PEGはポリエチレングリコールであり、Phはフェニルであり、Pnpはp-ニトロフェニルであり、MCは6-マレイミドカプロイルであり、pheはL-フェニルアラニンであり、PyBroPは、プロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェイトであり、SECはサイズ排除クロマトグラフィであり、Suはスクシンイミドであり、TFAはトリフルオロ酢酸であり、TLCは薄層クロマトグラフィであり、UVは紫外線であり、valはバリンである。

【 0 1 0 0 】

「親和成熟」抗体とは、その改変を有していない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性に改良を生じせしめる、その一又は複数のHVRにおいて一又は複数の改変を持つものである。一実施態様では、親和成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル又はピコモルの親和性を有する。親和成熟抗体は、当該分野において知られている手順によって生産される。Marks等, *Bio/Technology*, 10:779-783(1992)は、VH及びVLドメインシャッフリングによる親和成熟について記載している。HVR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘導は、Barbas等, *Proc Nat Acad. Sci, USA* 91:3809-3813(1994); Schier等, *Gene*, 169:147-155(1995); Yelton等, *J. Immunol.*155:1994-2004(1995); Jackson等, *J. Immunol.*154(7):3310-9(1995); 及びHawkins等, *J. Mol. Biol.*226:889-896(1992)に記載されている。

「阻止(ブロック)」抗体又は「アンタゴニスト」抗体とは、結合する抗原の生物学的活性を阻害するか又は低下させる抗体である。特定の阻止抗体又はアンタゴニスト抗体は、抗原の生物学的活性を、ほぼ又は完全に阻害する。

本明細書において使用する「アゴニスト」抗体は、対象とするポリペプチドの機能活性の少なくとも一つを模倣する抗体である。

抗体の「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域(天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域)に帰する生物学的活性を意味し、抗体のアイソタイプにより変わる。抗体のエフェクター機能の例には、C1q結合及び補体依存性細胞障害; Fcレセプター結合性; 抗体依存性細胞媒介性細胞障害(ADCC); 貪食作用; 細胞表面レセプター(例えば、B細胞レセプター)のダウンレギュレーション; 及びB細胞活性化が含まれる。

【 0 1 0 1 】

「Fcレセプター」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合するレセプターを記載するものである。ある実施態様では、FcRは天然のヒトFcRである。ある実施態様では、FcRはIgG抗体(ガンマレセプター)と結合するもので、FcRI、FcRII及びFcRIIIサブクラスのレセプターを含み、これらのレセプターの対立遺伝子変異体、選択的にスプライシングされた形態のものも含まれる。FcRIIレセプターには、FcRIIA(「活性型レセプター」)及びFcRIIB(「阻害型レセプター」)が含まれ、主としてその細胞質ドメインは異なるが、類似のアミノ酸配列を有するものである。活性型レセプターFcRIIAは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター活性化モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based activation motif; ITAM)を含んでいる。阻害型レセプターFcRIIBは、細胞質ドメインにチロシン依存性免疫レセプター阻害性モチーフ(immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif; ITIM)を含んでいる(Daeron, *Annu. Rev. immunol.* 15:203-234 (1997)を参照)。FcRに関しては、Ravetch and Kinetic, *Annu.Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991); Capel等, *Immunome thods* 4:25-34 (1994); 及びde Haas等, *J.Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995)に概説されている。将来的に同定されるものも含む他のFcRはここでの「FcR」という言葉によって包含される。

また、「Fcレセプター」又は「FcR」なる用語には、母性IgGの胎児への移送と(Guyer等, *J. Immunol.* 117:587 (1976) Kim等, *J. Immunol.*24:249 (1994))、免疫グロブリンのホメオスタシスの調節を担う新生児性レセプターFcRnも含まれる。FcRnへの結合の測定方法は公知である(例としてGhetie 1997, Hinton 2004を参照)。インビボでのヒトFcRnへの結合とヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えばヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス又は形質転換されたヒト細胞株、又はFc変異形ポリペプチドを投与された霊長類動物においてアッセイすることができる。

国際公開公報00/42072(Presta)にFcRへの結合を向上又は減弱させた抗体変異型が述べられている。この特許公開の内容はここに出典明記により具体的に組み込まれる。Shields等, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001)も参照のこと。

【 0 1 0 2 】

「ヒトエフェクター細胞」とは、一又は複数のFcRsを発現し、エフェクター機能を実行する白血球のことである。ある実施態様では、その細胞が少なくともFcRIIIを発現し、ADCCエフェクター機能を実行することが望ましい。ADCCを媒介するヒト白血球の例として、末梢血液単核細胞(PBMC)、ナチュラルキラー(NK)細胞、単球、細胞障害性T細胞及び好中球が含まれる。エフェクター細胞は天然源、例えば血液から単離してもよい。

【0103】

「抗体依存性細胞媒介性細胞障害」又は「ADCC」とは、ある種の細胞障害細胞(例えば、ナチュラルキラー(NK)細胞、好中球及びマクロファージ)上に存在するFcレセプター(FcR)と結合した分泌Igにより、これらの細胞障害エフェクター細胞が抗原-担持標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒により標的細胞を死滅させることを可能にする細胞障害性の形態を意味する。ADCCを媒介する主要な細胞NK細胞はFcRIIIのみを発現するのに対し、単球はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞でのFcRの発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象の分子のADCC活性をアッセイするために、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されているようなインビトロADCCアッセイを実施することができる。このようなアッセイにおいて有用なエフェクター細胞には、末梢血液単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー細胞(NK細胞)が含まれる。代わりとして、もしくは付加的に、対象の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等, (USA) 95:652-656 (1998)において開示されているような動物モデルにおいて、インビボで評価することが可能である。

10

20

【0104】

「補体依存性細胞障害」もしくは「CDC」は、補体の存在下で標的を溶解することを意味する。典型的な補体経路の活性化は補体系(C1q)の第1補体が、同族抗原と結合した(適切なサブクラス)抗体に結合することにより開始される。補体の活性化を評価するために、CDCアッセイを、例えばGazzano-Santoro等, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)に記載されているように実施することができる。

Fc領域アミノ酸配列を変更してC1q結合能力が増大又は減少したポリペプチド変異体は、米特許第6194551号B1及び国際公開公報99/51642に記述される。それらの特許文献の内容は、出典明記によって、特別に本願明細書に組み込まれるものとする。またIdusogie等 *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

30

【0105】

「Fc領域含有ポリペプチド」なる用語は、Fc領域を含む抗体もしくはイムノアドヘンシンのようなポリペプチドを指す。Fc領域のC末端リジン(EU番号付けシステムに従うと残基447)は、例えば、ポリペプチドの精製中又はポリペプチドをコードする核酸を組み換え操作することによって除去してもよい。したがって、本発明のFc領域を有するポリペプチドを含んでなる組成物は、K447を有するポリペプチド集団、すべてのK447が除去されたポリペプチド集団、又はK447残基を有するポリペプチドとK447残基を有さないポリペプチドの混合集団を包含しうる。

本願明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークから得られるVL又はVHフレームワークのアミノ酸配列を含有するフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワーク「から得られる」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含有するか、又は既存のアミノ酸配列変化を含有してもよい。ある実施態様では、既存のアミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下又は2以下である。既存のアミノ酸変化がVH中に存在する場合、好ましくは、それらの変化は位置71H、73H及び78Hの内の3つ、2つ又は1つのみ起こり、例えば、それらの位置のアミノ酸残基は、71A、73T及び/又は78Aであってよい。一実施態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列又はヒトコンセンサスフレームワー

40

50

ク配列と配列が同一である。

【0106】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV L又はV Hフレームワーク配列の選別において、最も共通して生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリンV L又はV H配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選別する。通常、Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)によると、配列のサブグループはサブグループである。一実施態様では、V Lについて、上掲のKabat等によると、前記サブグループはサブグループ Iである。一実施態様では、V Hについて、上掲のKabat等によると、前記サブグループはサブグループIIIである。

10

【0107】

「V HサブグループIIIコンセンサスフレームワーク」は、上掲のKabat等の可変重鎖サブグループIIIのアミノ酸配列から得られるコンセンサス配列を含有する。一実施態様では、V HサブグループIIIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (FR-H1, 配列番号:1)-HVR-H1-WVRQAPGKGLEWV (FR-H2, 配列番号:3)-HVR-H2-RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (FR-H3, 配列番号:5)-HVR-H3-WGQGTLVTVSS (FR-H4, 配列番号:7)

「V LサブグループIコンセンサスフレームワーク」は、Kabat等の可変軽鎖 サブグループIのアミノ酸配列から得られたコンセンサス配列を含んでなる。一実施態様では、V HサブグループIコンセンサスフレームワークアミノ酸配列は、以下の配列のそれぞれの少なくとも一部又は全部を含む。

20

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (FR-L1, 配列番号:8)-HVR-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (FR-L2, 配列番号:11)-HVR-L2-GVPSRFSGSGSDTFTLTISLQPEDFATYYC (FR-L3, 配列番号:13)-HVR-L3-FGQGTKVEIK (FR-L4, 配列番号:15)

【0108】

「分泌シグナル配列」又は「シグナル配列」とは、細胞膜、通常は原核生物の内側の膜又は内側と外側の両方の膜を通して、対象となる新しく合成されたタンパク質の方向付けに使用することのできる短いシグナルペプチドをコードする核酸配列を意図する。このようにして、対象となるタンパク質、例えば免疫グロブリン軽鎖又は重鎖ポリペプチドは、原核宿主細胞の周辺に、あるいは培地中に分泌される。分泌シグナル配列によってコードされるシグナルペプチドは、宿主細胞に内在しても、あるいはそれらは外因性でもよく、発現されるポリペプチドに本来あるシグナルペプチドを含む。分泌シグナル配列は、典型的には発現されるポリペプチドのアミノ末端に存在し、典型的にはポリペプチドの生合成と分泌の間に細胞質から酵素的に取り除かれる。従って、シグナルペプチドは、通常、成熟タンパク質産物には存在しない。

30

【0109】

一般的に「結合親和性」は、分子(例えば抗体)の単一結合部位とその結合パートナー(例えば抗原)との間の非共有結合的な相互作用の総合的な強度を意味する。特に明記しない限り、「結合親和性」は、結合対のメンバー(例えば抗体と抗原)間の1:1相互作用を反映する内因性結合親和性を意味する。一般的に、分子XのそのパートナーYに対する親和性は、解離定数(K d)として表される。親和性は、本明細書中に記載のものを含む当業者に公知の共通した方法によって測定することができる。低親和性抗体は抗原にゆっくり結合して素早く解離する傾向があるのに対し、高親和性抗体は抗原により密接により長く結合したままとなる。結合親和性の様々な測定方法が当分野で公知であり、それらの何れかを本発明のために用いることができる。以下に具体的な例示の実施態様を記載する。

40

【0110】

一実施態様では、本発明の「K d」又は「K d値」は、以下のアッセイで示されるような、所望の抗体のF a b型(パージョン)とその抗原を用いて実行される放射性標識した抗原結合アッセイ(R I A)で測定される。段階的な力価の非標識抗原の存在下で、最小濃度

50

の(^{125}I)-標識抗原にてF a bを均衡化して、抗F a b抗体コートプレートと結合した抗原を捕獲することによって抗原に対するF a bの溶液結合親和性を測定する。アッセイの条件を決めるために、マイクロタイタープレート(Dynex)を $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の捕獲抗F a b抗体(Cappel Labs)を含む $50\ \text{mM}$ 炭酸ナトリウム($\text{pH}\ 9.6$)にて一晚コートして、その後 2% (w/v)のウシ血清アルブミンを含むP B Sにて室温(およそ 23°C)で $2\sim 5$ 時間、ブロックする。非吸着プレート(Nunc#269620)に、 $100\ \text{pM}$ 又は $26\ \text{pM}$ の[^{125}I]抗原を段階希釈した所望のF a bと混合する(例えば、Presta等, (1997) Cancer Res. 57: 4593-4599の抗V E G F抗体、F a b-12の評価と一致する)。ついで所望のF a bを一晚インキュベートする;しかし、インキュベーションは平衡状態に達したことを確認するまでに長時間(例えばおよそ 65 時間)かかるかもしれない。その後、混合物を捕獲プレートに移し、室温で(例えば 1 時間)インキュベートする。そして、溶液を取り除き、プレートを 0.1% のT w e e n 20を含むP B Sにて 8 回洗浄する。プレートが乾燥したら、 $150\ \mu\text{l}$ /ウェルの閃光物質(MicroScint-20; Packard)を加え、プレートをTo pcount 計測器(Packard)にて 10 分間計測する。最大結合の 20% か又はそれ以下濃度のF a bを選択してそれぞれ競合結合測定に用いる。

他の実施態様によると、 ~ 10 反応単位(R U)の固定した抗原C M 5チップを用いて 25°C のBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)にて表面プラズモン共鳴アッセイを行ってK d又はK d値を測定する。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗原を $10\ \text{mM}$ 酢酸ナトリウム($\text{pH}\ 4.8$)で $5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ($\sim 0.2\ \mu\text{M}$)に希釈し、結合したタンパク質の反応単位(R U)がおよそ 10 になるように $5\ \mu\text{l}/\text{分}$ の流速で注入した。抗原の注入後、反応しない群をブロックするために $1\ \text{M}$ のエタノールアミンを注入した。動力学的な測定のために、 2 倍の段階希釈したF a b($0.78\ \text{nM}$ から $500\ \text{nM}$)を 25°C 、およそ $25\ \mu\text{l}/\text{分}$ の流速で 0.05% T w e e n 20(P B S T)を含むP B Sに注入した。会合及び解離のセンサーグラムを同時にフィットさせることによる単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(k_{on})と解離速度(k_{off})を算出した。平衡解離定数(K d)を k_{off}/k_{on} 比として算出した。例として、Chen, Y.,等, (1999) J. Mol Biol 293: 865-881を参照。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる結合速度が $10^6\ \text{M}^{-1}\ \text{S}^{-1}$ を上回る場合、分光計、例えば、流動停止を備えた分光光度計(stop-flow equipped spectrophotometer)(Aviv Instruments)又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-Aminco分光光度計(ThermoSpectronic)で測定される、漸増濃度の抗原の存在下にて、P B S($\text{pH}\ 7.2$)、 25°C の、 $20\ \text{nM}$ の抗抗原抗体(F a b型)の蛍光放出強度(励起 = $295\ \text{nm}$; 放出 = $340\ \text{nm}$ 、帯域通過 = $16\ \text{nm}$)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を用いて結合速度を測定することができる。

また、本発明の「結合速度」又は「会合の速度」又は「会合速度」又は「 k_{on} 」は、 ~ 10 反応単位(R U)の固定した抗原C M 5チップを用いて 25°C のBIAcore™-2000又はBIAcore™-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた前述と同じ表面プラズモン共鳴アッセイにて測定される。

【0111】

「疾病」は、本発明の物質/分子又は方法を用いた治療によって利益を得る任意の症状又は疾患である。これには、問題とする疾患に哺乳動物がかかりやすくなる病理学的症状を含む慢性及び急性の疾病を含む。本明細書中で治療される疾患の非限定的な例には、B細胞増殖性疾患及び/又はB細胞腫瘍などの癌性症状、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫が含まれる。

10

20

30

40

50

「細胞増殖性疾患(障害)」及び「増殖性疾患(障害)」なる用語は、異常な細胞増殖にある程度関連している疾患を意味する。一実施態様では、細胞増殖性疾患は癌である。

本明細書中の「腫瘍」とは、悪性か良性かにかかわらず、すべての腫瘍性細胞成長及び増殖と、すべての前癌性及び癌性細胞及び組織を意味する。「癌」「癌性」「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」及び「腫瘍」なる用語は、本明細書に参照されるように相互に限定的なものでない。

【0112】

「癌」及び「癌性」なる用語は、一般的に調節不可能な細胞成長/増殖に特徴がある哺乳動物の生理学的状態を指すか又は表す。癌の例には癌性B細胞増殖性疾患が含まれるが、これに限定されるものではない。B細胞増殖性疾患は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される。他の癌症状には、例として上皮癌、リンパ腫(例えば、ホジキンリンパ腫及び非ホジキンリンパ腫)、芽細胞腫、肉腫及び白血病が含まれる。このような癌のより具体的な例には、扁平細胞癌、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、肺の扁平上皮癌、腹膜の癌、肝細胞性癌、胃腸癌、膵癌、グリオーマ、子宮頸癌、卵巣癌、肝癌、膀胱癌、肝腫瘍、乳癌、大腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜又は子宮上皮癌、唾液腺上皮癌、腎臓癌、肝癌、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝臓癌、白血病及び他のリンパ系増殖性疾患、及び様々なタイプの頭頸部癌が含まれる。

【0113】

本明細書中の「B細胞悪性腫瘍」には、非ホジキンリンパ腫(NHL)、例として軽度/濾胞性NHL、小リンパ球(SL)NHL、中程度/濾胞性NHL、中程度のびまん性NHL、高度免疫芽細胞NHL、高度リンパ芽球NHL、高度小型非切れ込み核細胞性NHL、バルキー(bulky)疾患NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連のリンパ腫、及びワルデンシュトレームマクログロブリン血症、非ホジキンリンパ腫(NHL)、リンパ球優性ホジキン病(LPHD)、小リンパ球性リンパ腫(SL)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、再発性低悪性度NHL及びリツキシマブ抵抗性の低悪性度NHLを含む低悪性度NHL；白血病、例として急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、ヘアリー細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病；マントル細胞リンパ腫；及び他の血液学的な悪性腫瘍が含まれる。このような悪性腫瘍は、CD22などのB細胞表面マーカーに対する抗体によって治療されてもよい。このような疾患は、CD22などのB細胞表面マーカーに対する抗体の投与によって治療されることが本明細書において意図されるものであり、本明細書中で開示したようなコンジュゲートしていない(「ネイキッド」)抗体又は細胞障害性剤にコンジュゲートされた抗体の投与を含む。また、このような疾患は、他の抗体ないし抗体薬剤コンジュゲート、他の細胞障害性剤、放射線又は他の同時ないしは連続して施される治療と組み合わせ、本発明の抗CD22抗体ないし抗CD22抗体薬剤コンジュゲートを含む併用療法によって治療されることが、本願明細書において意図される。本発明の例示的な治療方法では、本発明の抗CD22抗体は、抗CD20抗体、イムノグロブリン又はこれらのCD20結合断片と組み合わせられて、ともないしは連続して投与される。抗CD20抗体はネイキッド抗体又は抗体薬剤コンジュゲートであってもよい。併用療法の実施態様では、抗CD22抗体は本発明の抗体であり、抗CD20抗体はリツキサン(登録商標)(リツキシマブ)である。

【0114】

本明細書で使用する「非ホジキンリンパ腫」又は「NHL」という用語は、ホジキンリンパ腫以外のリンパ系の癌を意味する。通常、ホジキンリンパ腫と非ホジキンリンパ腫とは、ホジキンリンパ腫にはリードシュテルンベルク細胞が存在し、非ホジキンリンパ腫には前記細胞が不在であることにより区別することができる。本明細書で使用する用語に含まれる非ホジキンリンパ腫の例は、従来技術に既知の分類方式、例えばColor Atlas of Clinical Hematology第3版；A. Victor Hoffbrand及びJohn E. Pettit(編)(Harcourt Pub

lishers Limited 2000)(特に図11.57、11.58及び11.59参照)に記載の改訂版European-American Lymphoma (REAL)方式に従って当業者(腫瘍学者または病理学者)によって認識されるあらゆるものを含む。より具体的な例としては、限定するものではないが、再発性又は抵抗性NHL、前線低悪性度NHL、第III/IV期NHL、化学療法に抵抗性のNHL、前駆体Bリンパ芽球性白血病及び/又はリンパ腫、小リンパ球リンパ腫、B細胞慢性リンパ性白血病及び/又は前リンパ球性白血病及び/又は小リンパ球リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、immunocytoma及び/又はリンパ形質細胞性リンパ腫、リンパ系質細胞性リンパ腫周辺帯B細胞リンパ腫、脾周辺帯リンパ腫、結節外周辺帯-MALTリンパ腫、結節周辺帯リンパ腫、有毛細胞白血病、プラズマ細胞腫及び/又は形質細胞骨髄腫、低悪性度/濾胞性リンパ腫、中悪性度/濾胞性NHL、マントル細胞リンパ腫、濾胞性中心リンパ腫(濾胞性)、中悪性度拡散性NHL、広汎性大B細胞リンパ腫、高悪性度NHL(高悪性度前線NHL及び高悪性度再発性NHLを含む)、自己幹細胞移植後の又は自己肝細胞移植に抵抗性のNHL再発、原発性縦隔大B細胞リンパ腫、原発性浸出リンパ腫、高悪性度免疫芽細胞性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度非切断小細胞性NHL、巨大(bulky)病変NHL、パーキットリンパ腫、前駆体(周辺性)大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫及び/又はセザリー症候群、皮膚(皮膚性)リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管動原体リンパ腫が挙げられる。

10

【0115】

本明細書中の「自己免疫性疾患」は、個体の自己組織ないしは臓器又は同時分離したものに對する及びそれらから生じる疾患又は症状、又はその徴候又は結果として生じるその症状である。これら多くの自己免疫性及び炎症性疾患において、多くの臨床用及び研究用のマーカーが存在してもよく、限定するものではないが、高ガンマグロブリン血症、高レベルの自己抗体、組織中の抗原抗体複合体蓄積、副腎皮質ステロイド又は免疫抑制性治療の利点、及び、影響を受けた組織中のリンパ系細胞の凝集塊が含まれる。B細胞が媒介する自己免疫性疾患に関して何か一つの理論に限定されるものではないが、B細胞は、自己抗体産生、免疫複合体形成、樹状及びT細胞活性化、サイトカイン合成、ケモカインの直接放出、及び病巣への異所性新リンパ形成を含む、多くの機構的な経路によりヒト自己免疫性疾患において病原性効果を示すことが考えられる。各々のこれらの経路は、自己免疫性疾患の病状の程度の違いに寄与しうる。

20

【0116】

「自己免疫性疾患」は、臓器特異的疾患(すなわち、免疫応答が、内分泌系、造血系、皮膚、循環器系、胃腸及び肝臓系、腎臓系、甲状腺、耳、神経筋系、中枢神経系などといった臓器系に對して特異的である)又は、複数の臓器系に影響しうる全身性疾患(例えば全身性エリテマトーデス(SLE)、関節リウマチ、多発性筋炎など)でありうる。好ましい前記疾患には、自己免疫性リウマチ学疾患(例えば、関節リウマチ、シェーグレン症候群、強皮症、SLE及びループス腎炎などの狼瘡、多発性筋炎/皮膚筋炎、クリオグロブリン血症、抗リン脂質抗体症候群、及び乾癬の関節炎など)、自己免疫性胃腸及び肝臓疾患(例えば、炎症性腸疾患(例えば潰瘍性大腸炎及びクローン病)、自己免疫性胃炎及び悪性貧血、自己免疫性肝炎、原発性胆管萎縮症、原発性硬化性胆管炎、及び小児脂肪便病など)、血管炎(例えば、チャング-シュトラウス血管炎、ウェゲナー肉芽腫症及び顕微鏡的多発血管炎を含むANCA-ネガティブ血管炎及びANCA-関連血管炎)、自己免疫性神経学的疾患(例えば、多発性硬化症、眼球クローヌスミオクローヌス症候群、重症筋無力症、視神経脊髄炎、パーキンソン病、アルツハイマー病、及び自己免疫性多発性神経炎など)、腎臓疾患(例えば、糸球体腎炎、グッドパスチャー症候群、及びベルガー病など)、自己免疫性皮膚科疾患(例えば、乾癬、蕁麻疹、蕁麻疹、尋常性天疱瘡、類天疱瘡、及び皮膚紅班性狼瘡など)、血液系疾患(例えば、血小板減少性紫斑病、血栓性血小板減少性紫斑病、輸血後の紫斑病、及び自己免疫溶血性貧血など)、アテローム性動脈硬化、ブドウ膜炎、自己免疫性聴覚疾患(例えば、内耳疾患及び聴力障害など)、ベーチェット病、レイノー症候群、臓器移植及び自己免疫性内分泌系疾患(例えば、インスリン依存型糖尿病(IDDM)などの糖尿病関連の自己免疫性疾患、アジソン病及び自己免疫性甲状腺疾患(例えばグ

30

40

50

レーブス病及び甲状腺炎)など)が含まれる。より好ましい前記疾患には、例えば、関節リウマチ、潰瘍性大腸炎、ANCA関連血管炎、狼瘡、多発性硬化症、シェーグレン症候群、グレーブス病、IDDM、悪性貧血、甲状腺炎及び糸球体腎炎が含まれる。

【0117】

場合によって上記のものを包含する、本明細書中で定義されるような他の自己免疫性疾患の具体的な例には、限定されるものではないが、関節炎(急性及び慢性の関節リウマチ、例として、若年発症関節リウマチ及び段階、例として、関節リウマチ関節滑膜炎、痛風又は痛風性関節炎、急性の免疫学的な関節炎、慢性炎症性関節炎、変形性関節症、II型コラーゲン誘導性の関節炎、感染性関節炎、ライム関節炎、増殖性関節炎、乾癬の関節炎、スティル病、椎骨関節炎、骨関節炎、慢性関節炎プログレディエンテ、変形性関節炎、慢性多発性関節炎プリマリア、反応性関節炎、閉経期の関節炎、エストロゲン-枯渇関節炎、及び強直性脊椎炎/リウマチ様脊椎炎)、自己免疫性リンパ系増殖性疾患、炎症性過剰増殖性皮膚病、乾癬、例としてプラーク乾癬、滴状乾癬、膿疱性乾癬及び爪乾癬、アトピー、例としてアトピー性疾患、例えば花粉症及びジョブ症候群、皮膚炎、例として接触皮膚炎、慢性接触皮膚炎、剥脱性皮膚炎、アレルギー性皮膚炎、アレルギー性接触皮膚炎、蕁麻疹、疱疹状皮膚炎、貨幣状皮膚炎、脂漏性皮膚炎、非特異的皮膚炎、原発性刺激物接触皮膚炎、及びアトピー性皮膚炎、X連鎖過剰IgM症候群、アレルギー性眼内炎症性疾患、蕁麻疹、例として慢性アレルギー性蕁麻疹及び慢性特発性蕁麻疹、例として慢性自己免疫性蕁麻疹、筋炎、多発性筋炎/皮膚筋炎、若年性皮膚筋炎、中毒性上皮性表皮壊死症、強皮症(全身強皮症を含む)、全身性硬化症などの硬化症、多発性硬化症(MS)、例として脊髄-視神経MS、原発性進行性MS(PMS)、及び再発性寛解型MS(RRMS)、進行性全身性硬化症、アテローム性動脈硬化、動脈硬化症、皮膚硬化症、失調性硬化症、視神経脊髄炎(NMO)、炎症性腸疾患(IBD)(例えば、クローン病、自己免疫媒介性胃腸疾患、胃腸炎症、大腸炎、例えば潰瘍性大腸炎、大腸炎潰瘍、顕微鏡的大腸炎、膠原性大腸炎、多発性大腸炎、壊死性全腸炎、及び経壁性大腸炎、及び自己免疫性炎症性腸疾患)、腸炎症、膿皮症壊疽、結節性紅斑、原発性硬化性胆管炎、呼吸窮迫症候群、例として、成人又は急性の呼吸窮迫症候群(ARDS)、髄膜炎、葡萄膜の全部又は一部の炎症、虹彩炎、脈絡膜炎、自己免疫性血液疾患、移植片対宿主病、遺伝性血管性浮腫などの血管性浮腫、髄膜炎の脳神経損傷、妊娠ヘルペス、妊娠性類天疱瘡、陰囊搔痒、自己免疫性早期卵巢機能不全、自己免疫性症状による急性聴力損失、IGE媒介性疾患、例えばアナフィラキシー及びアレルギー性鼻炎及びアトピー性鼻炎、脳炎、例えばラスマッセンの脳炎及び辺縁及び/又は脳幹脳炎、ブドウ膜炎、例として、前部ブドウ膜炎、急性前ブドウ膜炎、肉芽腫ブドウ膜炎、非顆粒性ブドウ膜炎、水晶体抗原性ブドウ膜炎、後部ブドウ膜炎又は自己免疫ブドウ膜炎、ネフローゼ症候群を有する又は有さない糸球体腎炎(GN)、例として、慢性又は急性の糸球体腎炎、例として原発性GN、免疫性GN、膜性GN(膜性ネフロパシ)、特発性膜性GN又は特発性膜性ネフロパシ、膜又は膜性増殖性GN(MPGN)(タイプI及びタイプIIを含む)、急速進行性GN(RPGN)、増殖性腎炎、自己免疫性多腺性内分泌不全、亀頭炎、例として形質細胞限局性亀頭炎、亀頭包皮灸、遠心性環状紅斑、色素異常性固定性紅斑、多形性紅斑、環状肉芽腫、光沢苔癬、硬化性萎縮性苔癬、慢性単純性苔癬、棘状苔癬、扁平苔癬、薄板状魚鱗癬、表皮剥離性角質増殖症、妊娠前角化症、膿皮症壊疽、アレルギー性状態および応答、食物アレルギー、薬剤アレルギー、昆虫アレルギー、まれなアレルギー性疾患、例として肥満細胞症、アレルギー性応答、湿疹、例としてアレルギー性又はアトピー性湿疹、乾皮性湿疹、異常発汗剤湿疹および小胞の掌蹠湿疹、喘息、例えば喘息気管支炎、気管支喘息及び自己免疫喘息、T細胞の浸潤を伴う症状及び慢性炎症反応、妊娠中の胎児のABO式血液型など外来性抗原に対する免疫反応、慢性肺炎症性疾患、自己免疫心筋炎、白血球粘着力欠損、ループス、例としてループス腎炎、ループス脳炎、小児ループス、非腎性ループス、腎外ループス、ジスコイドループス、円板状エリテマトーデス、全身性エリテマトーデス(SLE)、脱毛症ループス、SLE、例えば皮膚SLE又は亜急性の皮膚SLE、新生児期ループス症候群(NLE)及び紅斑性狼瘡汎発、若年性開始型(I型)真正糖尿病、例として小児IDDM

10

20

30

40

50

、成人発症型真正糖尿病（ⅠⅠ型糖尿病）、自己免疫性糖尿病、特発性の尿崩症、糖尿病性網膜症、糖尿病性ネフロパシ、糖尿病性大腸炎、糖尿病性大動脈疾患、サイトカイン及びTリンパ球によって媒介される急性及び遅発性過敏症と関係する免疫応答、結核、サルコイドーシス、肉芽腫症、例としてリンパ腫肉芽腫症、無顆粒球症、血管炎（例として、リウマチ性多発性筋痛及び巨細胞（高安）動脈炎などの大脈管脈管炎、川崎病及び結節性多発動脈炎／結節性動脈周囲炎などの中脈管脈管炎、免疫血管炎、CNS血管炎、皮膚血管炎、過敏性血管炎、フィブリノイドを壊死させる血管炎及び全身性壊死性血管炎などの壊死性血管炎、ANCAネガティブ血管炎、およびチャージ-ストラウス症候群(CSS)などのANCA関連の血管炎、ヴェゲナー肉芽腫、および顕微鏡的多発性血管炎)、側頭動脈炎、無形成性貧血、自己免疫無形成性貧血、クームズ陽性貧血症、ダイヤモンドブラックファン貧血症、溶血性貧血又は免疫溶血性貧血、例として自己免疫溶血性貧血(AIHA)、悪性貧血(貧血症悪性熱)、アジソン病、純粋な赤血球貧血症又は形成不全(P RCA)、第VIII因子欠損症、血友病A、自己免疫好中球減少症、例として汎血球減少症、白血球減少症、白血球血管外遊出を伴う疾患、CNS炎症性疾患、アルツハイマー病、パーキンソン病、多器官損傷症候群、例えば敗血症、外傷又は出血の二次症状、抗原-抗体複合体関連疾患、抗糸球体基底膜疾患、抗リン脂質抗体症候群、単神経炎、アレルギー性神経炎、ベーチェット病／症候群、カールスマン症候群、グッドパスチャー症候群、レイノー症候群、シェーグレン症候群、スティーブンスジョンソン症候群、天疱瘡又は類天疱瘡、例えば水疱性類天疱瘡、癩痕性(粘液膜)類天疱瘡、皮膚類天疱瘡、尋常性天疱瘡、新生物関連天疱瘡、落葉状天疱瘡、類天疱瘡粘液-膜天疱瘡、および紅斑性天疱瘡、後天性表皮水疱症、眼炎症、好ましくはアレルギー性眼性炎症、例えばアレルギー性結膜、直鎖状IgA水疱性疾患、自己免疫誘導性結膜炎、自己免疫多腺性内分泌障害、ライター病又は症候群、自己免疫性状態による熱性損傷、子癇前症、免疫複合体疾患、例として、免疫複合体腎炎、抗体が媒介する腎炎、神経炎症性疾患、多発性神経炎、慢性神経障害、例えばIgM多発性神経炎又はIgM媒介性神経障害、血小板減少(例えば心筋梗塞患者によるもの)、例えば血栓性血小板減少性紫斑病(TTP)、輸血後紫斑病(PTP)、ヘパリン誘発性血小板減少及び自己免疫性又は免疫媒介性血小板減少、例えば慢性及び急性のITPを含む特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、強膜炎、例えば特発性のセラト強膜炎、上強膜炎、自己免疫性精巣炎及び卵巣炎を含む精巣及び卵巣の自己免疫性疾患、一次甲状腺機能低下症、副甲状腺機能低下症、自己免疫内分泌性疾患、例えば甲状腺炎、例えば自己免疫性甲状腺炎、橋本病、慢性甲状腺炎(橋本甲状腺炎)又は亜急性の甲状腺炎、自己免疫甲状腺性疾患、特発性甲状腺機能低下症、グレーブス病、グレーブス眼疾患(眼障害又は甲状腺関連の眼障害)、自己免疫多腺性症候群などの多腺性症候群、例えばタイプI(又は、多腺性内分泌障害症候群)、腫瘍随伴症候群、例として神経系新生物関連症候群、例えばランパート-イトン筋無力症症候群又はイトン ランパート症候群、スティッフマン又はスティッフマン症候群、脳脊髄炎、例として、アレルギー性脳脊髄炎又は脳脊髄炎性アレルギー及び実験的アレルギー性脳脊髄炎(EAE)、重症筋無力症、例えば胸腺腫関連の重症筋無力症、小脳性退化、神経ミオトニ、眼球クローヌス又は眼球クローヌス筋硬直症候群(OMS)及び感覚系神経障害、多病巣性運動神経障害、シーハン症候群、自己免疫肝炎、慢性肝炎、類狼瘡肝炎、巨細胞肝炎、慢性活動性肝炎又は自己免疫慢性活動性肝炎、間質性肺炎、例えばリンパ系間隙間質性肺炎(LIP)、閉塞性細気管支炎(非移植)対NSIP、ギラン バレー症候群、ベルガー病(IgAネフロパシ)、特発性IgAネフロパシ、線状IgA皮膚病、急性発熱性好中性皮膚病、角層下膿疱症、一過性棘融解皮膚病、肝硬変、例として原発性胆管萎縮症及び肺線維症、自己免疫腸疾患症候群、セリアックないしはコエリアック病、脂肪便症(グルテン腸疾患)、抵抗性スプルー、特発性スプルー、クリオグロブリン血症、例として混合性クリオグロブリン血症、アミロトロフィック側索硬化症(ALS;筋萎縮性側索硬化症(Lou Gehrig's disease))、冠状動脈疾患、自己免疫性耳疾患、例として、自己免疫内耳疾患(AIED)、自己免疫聴力障害、多発性軟骨炎、例として、抵抗性又は再発性ないしは再発する多発性軟骨炎、肺胞状蛋白症、コーガン症候群／非梅毒性間質性角膜炎などの角膜炎、ベル麻痺、

10

20

30

40

50

スウィート病/症候群、自己免疫性酒さ、帯状ヘルペス関連疼痛、アミロイドーシス、非癌性リンパ球増多症、一次リンパ球増多症、これにはモノクローナルB細胞リンパ球増多症(例えば良性モノクローナル免疫グロブリン症及び未同定の有意なモノクローナルガーマパチイ(monoclonal gammopathy of undetermined significance)、M G U S)が含まれる、末梢性神経障害、腫瘍随伴症候群、チャネル病、例として、癲癇、片頭痛、不整脈、筋疾患、難聴、盲目、周期性麻痺及びC N Sのチャネル病、自閉症、炎症性ミオパシ、局所性又は分節性又は限局性分節性系球体硬化症(F S G S)、内分泌性眼障害、ブドウ膜網膜炎、脈絡網膜炎、自己免疫性肝臓病、線維症、多内分泌性不全、シュミット症候群、副腎炎、胃萎縮、初老期痴呆、脱髄性疾患、例として、自己免疫脱髄性病及び慢性炎症性脱髄性多発性神経炎、ドレスラー症候群、円形脱毛症、完全脱毛症、C R E S T症候群(石灰沈着、レイノー現象、食道運動障害、強指症及び毛細管拡張症)、雌雄自己免疫性不妊性、例えば、抗精子抗体によるもの、混合性結合組織病、シャーガス病、リウマチ熱、再発性中絶、農夫肺、多形性紅斑、心切開術後症候群、クッシング症候群、愛鳥家肺、アレルギー性肉芽腫性脈管炎、良性リンパ球血管炎、アルポート症候群、肺炎、例えばアレルギー性肺炎及び繊維化肺炎、間隙肺疾患、輸血反応、ハンセン病、マラリア、寄生虫病、例としてリーシュマニア症、キパノソミアシス(kypanosomiasis)、住血吸虫症、蛔虫症、アスペルギルス症、サンプター症候群、カブラン症候群、デング熱、心内膜炎、心内膜心筋線維形成、広汎性間隙肺線維形成、間質性肺線維形成、繊維化縦隔炎、肺線維形成、特発性の肺線維形成、嚢胞性線維症、眼内炎、持久性隆起性紅斑、胎児赤芽球症、好酸性筋膜炎(eosinophilic faciitis)、シャルマン症候群、フェルティー症候群、フィラリア(flariasis)、毛様体炎、例えば慢性毛様体炎、ヘテロ慢性毛様体炎、虹彩毛様体炎(急性又は慢性)又はF u c hの毛様体炎)、ヘーノホ-シェーンライン紫斑病、ヒト免疫不全ウイルス(H I V)感染、S C I D、後天性免疫不全症候群(A I D S)、エコーウィルス感染、敗血症(全身性炎症反応症候群(S I R S))、内毒血症、腭炎、thyroxicosis、パルボウィルス感染、風疹ウィルス感染、種痘後症候群、先天性風疹感染、エプスタインバーウィルス感染、耳下腺炎、エヴァンの症候群、自己免疫性腺機能不全、シドナム舞蹈病、連鎖球菌感染後腎炎、閉塞性血栓性血管炎(thromboangitis ubiterans)、甲状腺中毒症、脊髄癆、脈絡膜炎、巨細胞多発性筋痛、慢性過敏性肺炎、結膜炎、例として、春季カタル、乾性角結膜炎及び流行性角結膜炎、特発性腎臓症候群、微小変化ネフロパシ、良性家族性及び乏血-再灌流障害、移植臓器再灌流、網膜自己免疫、関節炎症、気管支炎、慢性閉塞性気道/肺性疾患、珪肺症、アフタ、アフタ性口内炎、動脈硬化症疾患、(大脳血管性不足)、例として動脈硬化脳症及び動脈硬化症網膜症、アスペルミオジェネー

10

20

30

ス(aspermiogenese)、自己免疫性溶血、ベック病、クリオグロブリン血症、デュピュイトラン拘縮、水晶体過敏性眼内炎、腸炎アレルギー、結節性紅斑、leprosum、特発性顔麻痺、慢性疲労症候群、リウマチ性熱、ハンマンリッチ病、感覚器性(sensoneural)聴力障害、血色素尿症発作(haemoglobinuria paroxysmatica)、性機能低下、回腸炎領域、白血球減少症、単核細胞増加症感染、横移動脊髄炎、一次特発性の粘液水腫、ネフローゼ、眼炎symphatica(交感性眼炎)、新生児眼炎、視神経炎、精巣炎肉芽腫症、腭炎、多発性神経根炎急性、膿皮症壊疽、Q u e r v a i n甲状腺炎、後天性脾臓萎縮、非悪性胸腺腫、リンパ濾胞性胸腺炎、白斑、毒性ショック症候群、食中毒、T細胞の浸潤を伴う症状、白血球-粘着力欠損、サイトカイン及びTリンパ球に媒介される急性及び遅発性過敏症関連免疫応答、白血球血管外遊出を伴う疾患、多器官損傷症候群、抗原-抗体複合体媒介性疾患、抗系球体基底膜疾患、自己免疫多腺性内分泌障害、卵巣炎、原発性粘液水腫、自己免疫萎縮性胃炎、リウマチ性疾患、混合性結合組織病、ネフローゼ症候群、腭島炎、多内分泌性不全、自己免疫多腺性症候群、例えば多腺性症候群I型、成人発症型特発性副甲状腺機能低下症(A O I H)、拡張型心筋症、例えば後天性表皮水疱症(E B A)、ヘモクロマトーシス、心筋炎、ネフローゼ症候群、原発性硬化性胆管炎、化膿性又は非化膿性副鼻腔炎、急性又は慢性副鼻腔炎、篩骨、正面、上顎骨又は蝶形骨副鼻腔炎、アレルギー性副鼻腔炎、好酸球性関連疾患、例えば好酸球増加症、肺浸潤好酸球増加症、好酸球増加症-筋肉痛症候群、レフラー症候群、

40

50

慢性好酸性肺炎、熱帯肺好酸球増加症、気管支肺炎アスペルギルス症、アスペルギローム又は好酸球性を含有する肉芽腫、アナフィラキシー、脊椎関節症、血清陰性脊椎関節炎、多内分泌性自己免疫性疾患、硬化性胆管炎、強膜、上強膜、慢性皮膚粘膜カンジダ症、ブラットン症候群、乳児期の一過性低ガンマグロブリン血症、ウイスコット アルドリッチ症候群、毛細血管拡張性運動失調症候群、血管拡張症、膠原病と関係する自己免疫疾患、リウマチ、例えば慢性関節リウマチ、リンパ節炎、血圧応答の減退、血管機能不全、組織損傷、心血管乏血、痛覚過敏、腎虚血、脳虚血、及び脈管化を伴う疾患、アレルギー性過敏症疾患、糸球体腎炎、再灌流障害、虚血性再灌流障害、心筋又は他の組織の再灌流損傷、リンパ腫気管支炎、炎症性皮膚病、急性炎症性成分を有する皮膚病、多臓器不全、水疱性疾患、腎皮質壊死、急性化膿性髄膜炎又は他の中枢神経系炎症性疾患、眼性及び眼窩の炎症性疾患、顆粒球輸血関連症候群、サイトカイン誘発性毒性、ナルコレプシ、急性重症炎症、慢性難治性炎症、腎盂炎、動脈内過形成、消化性潰瘍、弁膜炎、及び子宮内膜症などがある。このような疾患は、CD22などのB細胞表面マーカーに結合する抗体の投与によって治療されることが本明細書において意図されるものであり、本明細書中で開示したようなコンジュゲートしていない(「ネイキッド」)抗体又は細胞障害性剤にコンジュゲートされた抗体の投与を含む。また、このような疾患は、他の抗体ないし抗体薬剤コンジュゲート、他の細胞障害性剤、放射線又は他の同時ないしは連続して施される治療と組み合わせ、本発明の抗CD22抗体ないし抗CD22抗体薬剤コンジュゲートを含む併用療法によって治療されることが、本願明細書において意図される。

10

【0118】

20

ここで使用されるところの「治療」(及び「処置」又は「治療する」などの変形句)は、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するための臨床的介入を意味し、予防のため又は臨床的病理の過程に実施することができる。治療の望ましい効果には、疾病の発生又は再発の防止、症状の寛解、疾病の任意の直接的又は間接的病理的結果の低減、転移の防止、疾病の進行速度の低減、疾病状態の回復又は緩和、及び寛解又は改善された予後が含まれる。ある実施態様では、本発明の抗体は疾患又は疾病の進行を遅らせるため又は疾患又は疾病の進行をゆっくりにするために用いられる。

「個体」は脊椎動物である。ある実施態様では、脊椎動物は哺乳動物である。哺乳動物には、限定するものではないが、家畜動物(ウシなど)、スポーツ用動物、愛玩動物(ネコ、イヌ及びウマ)、霊長類、マウス及びラットが含まれる。ある実施態様では、哺乳動物はヒトである。

30

【0119】

「有効量」とは所望の治療又は予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。

本発明の物質/分子の「治療的有效量」は、例えば個体の疾病ステージ、年齢、性別、及び体重、並びに個体に所望の応答を誘発する物質/分子の能力などの因子に従って変わりうる。また、治療的有效量は物質/分子の任意の毒性又は有害な効果よりも治療的に恩恵のある効果が上回る量を包含する。「予防的有效量」とは所望の予防結果を達成するために必要な用量及び時間での効果的な量を意味する。典型的には必ずではないが、予防的用量は疾患の初期ステージ又はその前の患者に用いるので、予防的有效量は治療的有效量よりも少ないであろう。

40

【0120】

ここで用いられる「細胞障害性剤」という用語は、細胞の機能を阻害又は阻止し及び/又は細胞死ないしは破壊を生ずる物質を指す。この用語は、放射性同位体(例えば、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及びLuの放射性同位体)、化学治療薬、例えばメトトレキサート、アドリアマイシン、ピンカルカロイド(ピンクリスチン、ピンブラスチン、エトポシド)、ドキシソルピシン、メルファラン、マイトマイシンC、クロランブシル、ダウノルピシン又はその他インターカレート剤、酵素及びその断片、例えば核溶解性酵素、抗生物質、及び毒素、例えばその断片及び/又は変異体を含む小分子毒素又は細菌、糸状菌、植

50

物又は動物起源の酵素的に活性な毒素、毒素、増殖阻害剤、薬剤成分、そして下記に開示する種々の抗腫瘍又は抗癌剤を含むように意図されている。他の細胞障害性薬が下記に記載されている。殺腫瘍性剤は、腫瘍細胞の破壊を引き起こす。

「毒素」は、細胞の成長又は増殖に対して有害な作用を有することができる任意の物質である。

【 0 1 2 1 】

「化学療法剤」は、癌の治療に有用な化合物である。化学療法剤の例には、チオテパ及びCYTOXAN(登録商標)シクロホスファミドのようなアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファンのようなスルホン酸アルキル類；ベンゾドーパ(benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ(meturedopa)、及びウレドーパ(uredopa)のようなアジリジン類；アルトレートアミン(al tretamine)、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミド(triethylenethiophosphaoramide)及びトリメチロロメラミン(trimethylolomelamine)を含むエチレンイミン類及びメチラメラミン類；アセトゲニン(特にプラタシン及びプラタシノン)；デルタ-9-テトラヒドロカナビノール(ドロナビノール、MARINOL(登録商標)；ラパチョーネ；ラパコール；コルヒチン；ペツリン酸；カンプトセシン(合成アナログトポテカン(HYCAMTIN(登録商標)、CPT-11(イリノテカン、CAMPTOSAR(登録商標))、アセチルカンプトテシン、スコボレクチン(scopolectin)及び9-アミノカンプトテシンを含む)；プリオスタチン；カリスタチン；CC-1065(そのアドゼレシン、カルゼレシン及びビゼレシン合成アナログを含む)；ポドフィロトキシシン；ポドフィリン酸(podophyllinic acid)；テニポシド；クリプトフィシン(特にクリプトフィシン1及びクリプトフィシン8)；ドラスタチン；ドゥオカルマイシン(合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む)；エロイテロピン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンギスタチン；クロランブシル、クロロナファジン(chlornaphazine)、チョロホスファミド(cholophosphamide)、エストラムスチン、イフォスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシドヒドロクロリド、メルファラン、ノベンピチン(novembichin)、フェネステリン(phenesterine)、プレドニムスチン(prednimustine)、トロフォスファミド(trofosfamide)、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン(chlorozotocin)、フォテムスチン(fotemustine)、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロスレアス(nitrosureas)；抗生物質、例えばエネジイン抗生物質(例えば、カリケアマイシン(calicheamicin)、特にカリケアマイシン 1 I 及びカリケアマイシン I 1 (例えばAgnew Chem Intl. Ed. Engl. 33:183-186(1994)参照)；ダイネマイシン(dynemicin) A を含むダイネマイシン；エスペラマイシン；並びにネオカルチノスタチン発色団及び関連する色素タンパクエネジイン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン類(aclacinomysins)、アクチノマイシン、オースラマイシン(authramycin)、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン(cactinomycin)、カラビシン(carabycin)、カルミノマイシン、カルジノフィリン(carzinophilin)、クロモマイシン類、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン(detorbicin)、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ADRIAMYCIN(登録商標)ドキシソルピシン(モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、及びデオキシドキシソルピシンを含む)、エビルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マーセロマイシン(marcellomycin)、マイトマイシンCのようなマイトマイシン、マイコフェノール酸(mycophenolic acid)、ノガラマイシン(nogalamycin)、オリボマイシン(olivomycins)、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン(potfiromycin)、ピューロマイシン、ケラマイシン(quelamycin)、ロドルピシン(rodorubicin)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン(tubercidin)、ウベニメクス、ジノスタチン(zinostatin)、ゾルピシン(zorubicin)；代謝拮抗剤、例えばメトトレキセート及び5-フルオロウラシル(5-FU)；葉酸アナログ、例えばデノプテリン(denopterin)、メトトレキセート、プテロプテリン(pteropterin)、トリメトトレキセート(trimetrexate)；プリンアナログ、例えばフルダラビン(fludarabine)、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニン；ピリミジンアナログ、例えばアンシタピン、アザシチジン(azacitidine)、6-アザウリジン(azauridine)、カルモ

10

20

30

40

50

フール、シタラピン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン(enocitabine)、フロキシウリジン(floxuridine)；アンドロゲン類、例えばカルステロン(calusterone)、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン(testolactone)；抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸リプレニッシャー(replenisher)、例えばフロリン酸(frolinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプリン酸；エニルウラシル；アムサクリン(amsacrine)；ベストラブシル(bestrabucil)；ピサントレン(bisantrene)；エダトラキセート(edatraxate)；デフォファミン(defofamine)；デメコルシン(demecolcine)；ジアジコン(diaziqone)；エルフォルニチン(elfornithine)；酢酸エリプチニウム(elliptinium)；エポシロン；エトグルシド(etoglucid)；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン(lonidamine)；メイタンシノイド(maytansinoid)類、例えばメイタンシン(maytansine)及びアンサミトシン(ansamitocine)；ミトグアゾン(mitoguazone)；ミトキサントロン；モピダモール(mopidamol)；ニトラクリン(nitracrine)；ペントスタチン；フェナメット(phenamet)；ピラルピシン；ロソキサントロン；2-エチルヒドラジド；プロカルバジン；P S K (登録商標)多糖複合体(JHS Natural Products, Eugene, OR)；ラゾキサラン(razoxane)；リゾキシシン；シゾフィラン；スピロゲルマニウム(spirogermanium)；テニウアゾン酸(tenuazonic acid)；トリアジコン(triaziquone)；2, 2', 2''-トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン類(特にT-2毒素、ベラクリン(verracurin) A、ロリジン(roridine) A 及びアングイジン(anguidine))；ウレタン；ビンデシン(ELDISINE(登録商標)、FILDESIN(登録商標))；ダカーバジン；マンノムスチン(mannomustine)；ミトブロニトール；ミトラクトール(mitolactol)；ピボプロマン(pipobroman)；ガシトシン(gacytosine)；アラビノシド(「A r a - C」)；チオテパ；タキソイド類、例えばTAXOL(登録商標)パクリタキセル(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE™パクリタキセルのクレモフォー無添加アルブミン操作ナノ粒子製剤(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Illinois)、及びTAXOTERE(登録商標)ドキセタキセル(Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)；クロランブシル；ゲムシタピン(GEMZAR(登録商標))；6-チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；プラチナアナログ、例えばシスプラチン及びカルボプラチン；ピンプラスチン(VELBAN(登録商標))；プラチナ；エトポシド(V P - 1 6)；イホスファミド；マイトキサントロン；ピンクリスチン(ONCOVIN(登録商標))；オキサリプラチン；ロイコボピン(leucovovin)；ピノレルピン(NAVELBINE(登録商標))；ノバントロン(novantrone)；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロナート(ibandronate)；トポイソメラーゼ阻害剤R F S 2 0 0 0；ジフルオロメチロールニチン(D M F O)；レチノイン酸のようなレチノイド；カペシタピン(XELODA(登録商標))；上述したもののいずれかの薬学的に許容可能な塩類、酸類又は誘導体；並びに上記のうち2以上の組み合わせ、例えば、シクロフォスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、及びプレドニソロン併用療法の略称であるC H O P、及び5-FU及びロイコボピン(leucovovin)とオキサリプラチン(ELOXATIN™)を組み合わせた治療法の略称であるFOLFOXが含まれる。

【 0 1 2 2 】

またこの定義に含まれるものには、癌の成長を助けるホルモンの作用を調節、低減、遮断又は阻害するように働き、多くの場合全身処置の形態で使用される抗ホルモン剤がある。それらはそれ自体がホルモンであってもよい。それらは例えば抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレータ(S E R M)を含み、例えば、タモキシフェン(NOLVADEX(登録商標)タモキシフェンを含む)、ラロキシフェン(raloxifene)(EVISTA(登録商標))、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン(trioxifene)、ケオキシフェン(keoxifene)、L Y 1 1 7 0 1 8、オナプリストーン(onapristone)、及びトレミフェン(FARESTON(登録商標))；抗プロゲステロン；エストロゲンレセプター下方調節剤(ERD)；卵巣を抑制又は停止させる機能がある作用剤、黄体形成ホルモン放出ホルモン(LHRH)アゴニスト、例えば酢酸リュープロリド(LUPRON(登録商標)及びELIGARD(登録商標))、酢酸ゴセレリン、酢酸プセレリン及びトリプテレリン(tripterelin)；その他抗アンド

ロゲン、例えばフルタミド(flutamide)、ニルタミド(nilutamide)、ピカルタミド；並びに副腎のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば4(5)-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール(MEGASE(登録商標))、エキセメスタン(AROMASIN(登録商標))、フォルメスタニー(formestanie)、ファドロゾール、ポロゾール(RIVISOR(登録商標))、レトロゾール(FEMARA(登録商標))、及びアナストロゾール(ARIMIDEX(登録商標))である。加えて、このような化学療法剤の定義には、クロドロネート(例えばBONEFOS(登録商標)又はOSTAC(登録商標))、エチドロロン酸(DIDROCAL(登録商標))、NE-58095、ゾレドロロン酸/ゾレドロネート(ZOMETA(登録商標))、アレンドロネート(FOSAMAX(登録商標))、パミドロロン酸(AREDIA(登録商標))、チルドロン酸(SKELID(登録商標))、又はリセドロロン酸(ACTONEL(登録商標))、並びにトロキサシタピン(troxacitabine)(1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体)；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に接着細胞の増殖に結びつくシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えばPKC-、Raf、及びH-Ras、及び上皮成長因子レセプター(EGF-R)；THERATOPE(登録商標)ワクチン及び遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えばALLOVECTIN(登録商標)ワクチン、LEUVECTIN(登録商標)ワクチン、及びVAXID(登録商標)ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤(LURTOTECAN(登録商標))；rmRH(ABARELIX(登録商標))；ラパチニブ(lapatinib ditosylate)(GW572016としても知られるErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ小分子阻害剤)；及び上記のもののいずれかの製薬的に許容される塩類、酸類又は誘導体が含まれる。

10

20

30

40

50

【0123】

ここで用いられる際の「増殖阻害剤」は、細胞(例えばCD22を発現する細胞)の成長をインビトロ又はインビボの何れかで阻害する化合物又は組成物を意味する。よって、増殖阻害剤は、S期で細胞(例えばCD22を発現する細胞)の割合を有意に減少させるものである。増殖阻害剤の例は、細胞周期の進行を(S期以外の位置で)阻害する薬剤、例えばG1停止又はM期停止を誘発する薬剤を含む。古典的なM期ブロッカーは、ピンカス(ピクリスチン及びピンプラスチン)、タキサン類、及びトポイソメラーゼII阻害剤、例えばドキソルピシン、エピルピシン、ダウノルピシン、エトポシド、及びプレオマイシンを含む。またG1停止させるこれらの薬剤は、S期停止にも波及し、例えば、DNAアルキル化剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチン、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、及びアラ-Cである。更なる情報は、The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn及びIsrael, 編, Chapter 1, 表題「Cell cycle regulation, oncogene, and antineoplastic drugs」, Murakami等, (WB Saunders: Philadelphia, 1995)、特に13頁に見出すことができる。タキサン類(パクリタキセル及びドセタキセル)は、共にイチイに由来する抗癌剤である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、ローン・プーラン ローラー)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、プリストル-マイヤー スクウィブ)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体から微小管の集合を促進し、細胞の有糸分裂を阻害する結果となる脱重合を防ぐことによって微小管を安定化にする。

【0124】

「細胞内代謝物」なる用語は、抗体-抗原コンジュゲート(ADC)上の細胞内部で代謝プロセス又は反応から生じている化合物に関する。代謝プロセス又は反応はADCのペプチドリンカーのタンパク質切断や、ヒドラゾン、エステル又はアミドなどの官能基の加水分解といった酵素的な過程であってもよい。細胞内代謝物には、限定するものではないが、細胞内への移行、拡散、取り込み又は輸送後に細胞内切断が行われた遊離薬剤及び抗体が含まれる。

「細胞内に切断される」及び「細胞内切断」なる用語は、抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)に対する細胞内の代謝プロセス又は反応であって、これによって薬剤成分(D)と抗体(Ab)間の共有結合、すなわちリンカーが壊れ、その結果、細胞内の抗体から遊離した薬剤が分離される。ゆえに、ADCの切断された成分は細胞内代謝物である。

【0125】

「生物学的利用能」なる用語は、患者に投与される薬剤の所定の量の全身有効性(すなわち、血液/血しょう濃度)を指す。生物学的利用能は、投与された用量形態から体循環に達する薬剤の時間(速度)と総量(程度)の測定値を示す絶対的な用語である。

「細胞障害活性」なる用語は、抗体-薬剤コンジュゲート又は抗体-薬剤コンジュゲートの細胞内代謝物の細胞殺傷効果、細胞増殖抑制効果又は増殖阻害効果を指す。細胞障害活性は、細胞の半分が生存する単位容量当たりの濃度(モル又は質量)であるIC50値として表されてもよい。

【0126】

「アルキル」は、ノルマル、第2級、第3級、又は環式の炭素原子を含むC₁-C₁₈炭化水素である。例として、メチル(Me、-CH₃)、エチル(Et、-CH₂CH₃)、1-プロピル(n-Pr、n-プロピル、-CH₂CH₂CH₃)、2-プロピル(i-Pr、i-プロピル、-CH(CH₃)₂)、1-ブチル(n-Bu、n-ブチル、-CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-メチル-1-プロピル(i-Bu、i-ブチル、-CH₂CH(CH₃)₂)、2-ブチル(s-Bu、s-ブチル、-CH(CH₃)CH₂CH₃)、2-メチル-2-プロピル(t-Bu、t-ブチル、-C(CH₃)₃)、1-ペンチル(n-ペンチル、-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-ペンチル(-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₃)、3-ペンチル(-CH(CH₂CH₃)₂)、2-メチル-2-ブチル(-C(CH₃)₂CH₂CH₃)、3-メチル-2-ブチル(-CH(CH₃)CH(CH₃)₂)、3-メチル-1-ブチル(-CH₂CH₂CH(CH₃)₂)、2-メチル-1-ブチル(-CH₂CH(CH₃)CH₂CH₃)、1-ヘキシル(-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃)、2-ヘキシル(-CH(CH₃)CH₂CH₂CH₂CH₃)、3-ヘキシル(-CH(CH₂CH₃)(CH₂CH₂CH₃))、2-メチル-2-ペンチル(-C(CH₃)₂CH₂CH₂CH₃)、3-メチル-2-ペンチル(-CH(CH₃)CH(CH₃)CH₂CH₃)、4-メチル-2-ペンチル(-CH(CH₃)CH₂CH(CH₃)₂)、3-メチル-3-ペンチル(-C(CH₃)(CH₂CH₃)₂)、2-メチル-3-ペンチル(-CH(CH₂CH₃)CH(CH₃)₂)、2,3-ジメチル-2-ブチル(-C(CH₃)₂CH(CH₃)₂)、3,3-ジメチル-2-ブチル(-CH(CH₃)C(CH₃)₃)がある。

【0127】

本明細書中で用いる「C₁-C₈アルキル」なる用語は、1から8の炭素原子を有する直鎖又は分岐鎖の、飽和ないしは不飽和炭化水素を指す。典型的な「C₁-C₈アルキル」基には、限定するものではないが、-メチル、-エチル、-nプロピル、-nブチル、-nペンチル、-nヘキシル、-n-ヘブチル、-n-オクチル、-n-ノニル、及び-n-デシルが含まれ、一方、分岐したC₁-C₈アルキルには、限定するものではないが、-イソプロピル、-secブチル、-イソブチル、-tertブチル、-イソペンチル、2-メチルブチルが含まれ、不飽和のC₁-C₈アルキルには、限定するものではないが、-ビニル、-アリル、-1-ブテニル、-2-ブテニル、-イソブチレニル、-1-ペンテニル、-2-ペンテニル、-3-メチル-1-ブテニル、-2-メチル-2-ブテニル、-2,3-ジメチル-2-ブテニル、1-ヘキシル、2-ヘキシル、3-ヘキシル、-アセチレニル、-プロピニル、-1-ブチニル、-2-ブチニル、-1-ペンチニル、-2-ペンチニル、-3-メチル-1-ブチニル、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、n-ブチル、イソブチル、sec-ブチル、tert-ブチル、n-ペンチル、イソペンチル、ネオペンチル、n-ヘキシル、イソヘキシル、2-メチルペンチル、3-メチルペンチル、2,2-ジメチルブチル、2,3-ジメチルブチル、2,2-ジメチルペンチル、2,3-ジメチルペンチル、3,3-ジメチルペンチル、2,3,4-トリメチルペンチル、3-メチルヘキシル、2,2-ジメチルヘキシル、2,4-ジメチルヘキシル、2,5-ジメチルヘキシル、3,5-ジメチルヘキシル、2,4-ジメチルペンチル、2-メチルヘブチル、3-メチルヘブチル、n-ヘブチル、イソヘブチル、n-オクチル、及びイソオクチルが含まれる。C₁-C₈アルキル基は、限定するものではないが、置換されていなくてもよいし、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ア

10

20

30

40

50

リール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-SO_3R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含め、一又は複数の基によって置換されていてもよく、各々の R' は、 H 、 $-C_1 - C_8$ アルキル及びアリアルから別々に選択される。

【0128】

「アルケニル」は、不飽和の少なくとも一部、すなわち炭素-炭素、 sp^2 二重結合を有するノルマル、第2級、第3級、又は環式の炭素原子を含む $C_2 - C_{18}$ 炭化水素である。例には、限定するものではないが、エチレン又はビニル($-CH=CH_2$)、アリル($-CH_2CH=CH_2$)、シクロペンテニル($-C_5H_7$)及び5-ヘキセニル($-CH_2CH_2CH_2CH=CH_2$)などがある。

10

「アルキニル」は、不飽和の少なくとも一部、すなわち炭素-炭素、 sp 三重結合を有するノルマル、第2級、第3級、又は環式の炭素原子を含む $C_2 - C_{18}$ 炭化水素である。例には、限定するものではないが、アセチレン($-C \equiv CH$)及びプロパルギル($-CH_2C \equiv CH$)などがある。

「アルキレン」は、1~18の炭素原子であって、親のアルカンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する飽和した、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルキレン基には、限定するものではないが、メチレン($-CH_2-$)、1,2-エチル($-CH_2CH_2-$)、1,3-プロピル($-CH_2CH_2CH_2-$)、1,4-ブチル($-CH_2CH_2CH_2CH_2-$)などが含まれる。

20

【0129】

「 $C_1 - C_{10}$ アルキレン」は、式 $-(CH_2)_{1-10}-$ の直鎖の飽和した炭化水素基である。 $C_1 - C_{10}$ アルキレンの例には、メチレン、エチレン、プロピレン、ブチレン、ペンチレン、ヘキシレン、ヘプチレン、オクチレン、ノニレン、及びデカレンが含まれる。

「アルケニレン」は、2~18の炭素原子であって、親のアルケンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する不飽和の、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルケニレン基には、限定するものではないが、1,2-エチレン($-CH=CH-$)が含まれる。

30

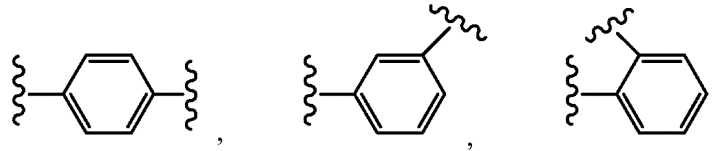
「アルキニレン」は、2~18の炭素原子であって、親のアルキンと同じ又は2つの異なる炭素原子から2つの水素原子を取り除くことによって誘導される2つの一価基センターを有する不飽和の、分岐鎖又は直鎖又は環式の炭化水素基を指す。典型的なアルキニレン基には、限定するものではないが、アセチレン($-C \equiv C-$)、プロパルギル($-CH_2C \equiv C-$)、及び4-ペンチニル($-CH_2CH_2CH_2C \equiv C-$)が含まれる。

「アリアル」は炭素環の芳香基を指す。アリアル基の例には、限定するものではないが、フェニール、ナフチル及びアントラセニルが含まれる。炭素環の芳香基又はヘテロサイクリック芳香基は、置換されていなくてもよいし、限定するものではないが、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O-(C_1 - C_8$ アルキル)、 $-アリアル$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-ハロゲン$ 、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含む、一又は複数の基によって置換されていてもよく、各々の R' は、 H 、 $-C_1 - C_8$ アルキル及びアリアルから別々に選択される。

40

【0130】

「アリレン(arylene)」は2つの共有結合を有するアリアル基であり、以下の構造で示すようなオルト、メタ又はパラの立体配置でありうる。



ここで、フェニル基は置換されていなくても、限定するものではないが、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O - (C_1 - C_8 \text{ アルキル})$ 、 $-$ アリアル、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含む最大4つの基にて置換されてもよく、それぞれの R' は、 H 、 $-C_1 - C_8$ アルキル及びアリアルから個々に選択される。

10

【0131】

「アリアルアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又は sp^3 炭素原子に結合した水素原子のうちの一つがアリアル基に置換している非環式アルキル基を指す。代表的なアリアルアルキル基には、限定するものではないが、ベンジル、2-フェニルエタン-1-イル、2-phenylethen-1-イル、ナフチルメチル、2-ナフチルエタン-1-イル、2-naphthylethen-1-イル、ナフトベンジル、2-ナフトフェニルエタン-1-イルなどが含まれる。アリアルアルキル基は6~20の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む、アリアルアルキル基のアルキル部分は1~6の炭素原子であり、アリアル部分は5~14の炭素原子である。

20

「ヘテロアリアルアルキル」は、炭素原子、典型的には末端又は sp^3 炭素原子に結合した水素原子のうちの一つがヘテロアリアル基に置換している非環式アルキル基を指す。典型的なヘテロアリアルアルキル基には、限定するものではないが、2-ベンズイミダゾリルメチル、2-フリルエチルなどが含まれる。ヘテロアリアルアルキル基は6~20の炭素原子を含み、例えば、アルカニル、アルケニル又はアルキニル基を含む、ヘテロアリアルアルキル基のアルキル部分は1~6の炭素原子であり、ヘテロアリアル部分は5~14の炭素原子であり、1~3のヘテロ原子は N 、 O 、 P 及び S から選択される。ヘテロアリアルアルキル基のヘテロアリアル部分は3~7員環を有するモノシクロ(2~6の炭素原子)又は7~10員環を有するビシクロ(4~9の炭素原子と N 、 O 、 P 及び S から選択される1~3のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであってもよい。

30

【0132】

「置換されたアルキル」、「置換されたアリアル」、「置換されたアリアルアルキル」とは、アルキル、アリアル及びアリアルアルキルをそれぞれ意味し、一又は複数の水素原子がそれぞれ別々に置換基に置換している。典型的な置換基には、限定するものではないが、 $-X$ 、 $-R$ 、 $-O^-$ 、 $-OR$ 、 $-SR$ 、 $-S-$ 、 $-NR_2$ 、 $-NR_3$ 、 $=NR$ 、 $-CX_3$ 、 $-CN$ 、 $-OCN$ 、 $-SCN$ 、 $-N=C=O$ 、 $-NCS$ 、 $-NO$ 、 $-NO_2$ 、 $=N_2$ 、 $-N_3$ 、 $-NC(=O)R$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-SO_3^-$ 、 $-SO_3H$ 、 $-S(=O)_2R$ 、 $-OS(=O)_2OR$ 、 $-S(=O)_2NR$ 、 $-S(=O)R$ 、 $-OP(=O)(OR)_2$ 、 $-P(=O)(OR)_2$ 、 $-PO_3^-$ 、 $-PO_3H_2$ 、 $-C(=O)R$ 、 $-C(=O)X$ 、 $-C(=S)R$ 、 $-CO_2R$ 、 $-CO_2^-$ 、 $-C(=S)OR$ 、 $-C(=O)SR$ 、 $-C(=S)SR$ 、 $-C(=O)NR_2$ 、 $-C(=S)NR_2$ 、 $-C(=NR)NR_2$ が含まれ、それぞれの X は個々にハロゲン： F 、 Cl 、 Br 又は I であり、それぞれの R は個々に H 、 $C_2 - C_{18}$ アルキル、 $C_6 - C_{20}$ アリアル、 $C_3 - C_{14}$ 複素環、保護基又はプロドラッグ部分である。上記のアルキレン、アルケニレン及びアルキニレン基もまた、同じように置換されてもよい。

40

【0133】

50

「ヘテロアリアル」及び「複素環」は、一又は複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素及び硫黄である環式システムを指す。複素環基は、1～20の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子を含む。複素環は、3～7員環を有するモノシクロ(2～6の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子)又は7～10員環を有するビシクロ(4～9の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1～3のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであつてもよい。

複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1, 3, 4, 6, 7及び9章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)、特に13, 14, 16, 19及び28号; 及び、J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566に記載される。

複素環の例には、例示のためであつて限定するものではなく、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ビス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ビス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾチニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、プテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、 β -カルボリニル、フェナンスリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナンスロリニル、フェナジニル、フェノチアジアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ピペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれる。

【0134】

例示的なものであつて限定するものではなく、炭素結合複素環は、ピリジンの2, 3, 4, 5、又は6位、ピリダジンの3, 4, 5、又は6位、ピリミジンの2, 4, 5、又は6位、ピラジンの2, 3, 5、又は6位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールないしはテトラヒドロピロールの2, 3, 4、又は5位、オキサゾール、イミダゾールないしはチアゾールの2, 4、又は5位、イソキサゾール、ピラゾールないしはイソチアゾールの3, 4、又は5位、アジリジンの2又は3位、アゼチジンの2, 3、又は4位、キノリンの2, 3, 4, 5, 6, 7、又は8位、又はイソキノリンの1, 3, 4, 5, 6, 7、又は8位に結合する。さらにより典型的には、炭素結合複素環には、2-ピリジル、3-ピリジル、4-ピリジル、5-ピリジル、6-ピリジル、3-ピリダジニル、4-ピリダジニル、5-ピリダジニル、6-ピリダジニル、2-ピリミジニル、4-ピリミジニル、5-ピリミジニル、6-ピリミジニル、2-ピラジニル、3-ピラジニル、5-ピラジニル、6-ピラジニル、2-チアゾリル、4-チアゾリル、又は5-チアゾリルが含まれる。

例示的なものであつて限定するものではなく、窒素結合複素環は、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、2-ピロリン、3-ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、2-イミダゾリン、3-イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、2-ピラゾリン、3-ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、1H-インダゾ

10

20

30

40

50

ールの1位、イソインドールないしはイソインドリンの2位、モルフォリンの4位、カルバゾールないしは -カルボリンの9位に結合する。さらにより典型的には、窒素結合複素環には、1 - アジリジル、1 - アゼテジル、1 - ピロリル、1 - イミダゾリル、1 - ピラゾリル、及び1 - ピペリジニルが含まれる。

【0135】

「 $C_3 - C_8$ 複素環」は、1 ~ 4の環状炭素原子が個々にO、S及びNからなる群のヘテロ原子に置換されている芳香族ないしは非芳香族の $C_3 - C_8$ 複素環を指す。 $C_3 - C_8$ 複素環の代表的な例には、限定するものではないが、ベンゾフラニル、ベンゾチオフェン、インドリル、ベンゾピラゾリル、クマリニル、イソキノリニル、ピロリル、チオフェニル、フラニル、チアゾリル、イミダゾリル、ピラゾリル、トリアゾリル、キノリニル、ピリミジニル、ピリジニル、ピリドニル、ピラジニル、ピリダジニル、イソチアゾリル、イソキサゾリル及びテトラゾリルが含まれる。 $C_3 - C_8$ 複素環は置換されていなくても、限定するものではないが、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O - (C_1 - C_8)$ アルキル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含む最大7基に置換されていてもよく、各々の R' は、H、 $-C_1 - C_8$ アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。

10

「 $C_3 - C_8$ ヘテロシクロ」は、複素環基の水素原子のうちの1つが結合に置換されている上記の $C_3 - C_8$ 複素環基を指す。 $C_3 - C_8$ ヘテロシクロは置換されていなくても、限定するものではないが、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O - (C_1 - C_8)$ アルキル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含む最大6基に置換されていてもよく、各々の R' は、H、 $-C_1 - C_8$ アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。

20

【0136】

「炭素環」は、単環として3 ~ 7の炭素原子又は二環として7 ~ 12の炭素原子を有する飽和ないしは不飽和の環を意味する。単環の炭素環は3 ~ 6の環状原子、より一般的には5又は6の環状原子を有する。二環式の炭素環は、例えばビシクロ[4, 5]、[5, 5]、[5, 6]又は[6, 6]システムとして配置した7 ~ 12の環状原子、又はビシクロ[5, 6]又は[6, 6]システムとして配置した9又は10の環状原子を有する。単環の炭素環の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1 - シクロペント - 1 - エニル、1 - シクロペント - 2 - エニル、1 - シクロペント - 3 - エニル、シクロヘキシル、1 - シクロヘキス - 1 - エニル、1 - シクロヘキス - 2 - エニル、1 - シクロヘキス - 3 - エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれる。

30

「 $C_3 - C_8$ 炭素環」は、3 -、4 -、5 -、6 -、7 -又は8 -員の飽和ないしは不飽和非芳香族炭素環である。代表的な $C_3 - C_8$ 炭素環には、限定するものではないが、 $-$ シクロプロピル、 $-$ シクロブチル、 $-$ シクロペンチル、 $-$ シクロペンタジエニル、 $-$ シクロヘキシル、 $-$ シクロヘキセニル、 $-$ 1, 3 - シクロヘキサジエニル、 $-$ 1, 4 - シクロヘキサジエニル、 $-$ シクロヘプチル、 $-$ 1, 3 - シクロヘプタジエニル、 $-$ 1, 3, 5 - シクロヘプタトリエニル、 $-$ シクロオクチル、及び $-$ シクロオクタジエニルが含まれる。 $C_3 - C_8$ 炭素環基は置換されていなくても、限定するものではないが、 $-C_1 - C_8$ アルキル、 $-O - (C_1 - C_8)$ アルキル)、 $-$ アリール、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)OR'$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-C(O)NHR'$ 、 $-C(O)N(R')_2$ 、 $-NHC(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-OH$ 、 $-$ ハロゲン、 $-N_3$ 、 $-NH_2$ 、 $-NH(R')$ 、 $-N(R')_2$ 、及び $-CN$ を含む一又は複数の基に置換されていてもよく、各々の R' は、H、 $-C_1 - C_8$ アルキル及びアリールからそれぞれ選択される。

40

「 $C_3 - C_8$ カルボシクロ」は、炭素環基の水素原子のうちの1つが結合に置換されている上記の $C_3 - C_8$ 炭素環基を指す。

50

【 0 1 3 7 】

「リンカー」は、共有結合を含む化学的な部分又は薬剤部分に抗体を共有結合させる原子の鎖を指す。様々な実施態様では、リンカーには、二価の基、例としてalkyldiyl、aryldiyl、heteroaryldiyl、アルキロキシ(例としてポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)及びアルキラミノ(例えばポリエチレンアミノ、JeffamineTM)の繰り返しユニットである $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ などの部分、及び、スクシナート、スクシニアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。

「キラル」なる用語は、鏡像パートナーの重ね合わせることができない特性を有する分子を指し、一方、「アキラル」なる用語は、鏡像パートナーの重ね合わせることができる分子を指す。

「立体異性体」なる用語は、同一の化学構造を有するが、空間の原子又は基の配列に関しては異なる化合物を指す。

「ジアステレオマー」はキラリテイの2以上の中心を有し、その分子が互いの鏡像でない立体異性体を指す。ジアステレオマーは、異なる物理的性質、例えば融点、沸点、分光特性及び反応性を有する。ジアステレオマーの混合物は、電気泳動及びクロマトグラフィなどの高分解能解析手順により分離されうる。

「鏡像異性体」は、互いに重ね合わせることができない鏡像である化合物の2つの立体異性体を指す。

【 0 1 3 8 】

本明細書中で用いる立体化学的定義及び慣例は、一般にS. P. Parker, Ed., McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; 及び、Eliel, E. and Wilen, S., Stereochemistry of Organic Compounds (1994) John Wiley & Sons, Inc., New Yorkに従う。多くの有機化合物は光学的に活性な形態で存在する。すなわち直線偏光の平面を回転する能力を有する。光学的に活性な化合物を記載する場合、接頭語DとL又はRとSを用いて、キラル中心(一又は複数)の周りの分子の絶対配置を示す。接頭後dとl又は(+)と(-)は、化合物による直線偏光の回転のサインを示すために用いるものであって、(-)又はlは化合物が左旋性であることを意味する。(+)又はdを接頭に付した化合物は右旋性である。所定の化学構造では、互いの鏡像であることを除いて、これらの立体異性体は同一である。また、特定の立体異性体は鏡像異性体とも称され、この異性体の混合物は鏡像異性体混合物と称されることが多い。鏡像異性体の50 : 50混合物は、化学的反応又は過程において立体選別でも立体特異性でもなくなった場合に生じうるラセミ混合物又はラセミ化合物を指す。「ラセミ混合物」及び「ラセミ化合物」なる用語は、光学的活性を欠く、2つの鏡像異性種を指す。

「脱離基」は、他の官能基によって置換されうる官能基を指す。特定の脱離基は当分野で公知であり、例として、限定するものではないが、ハロゲン化物(例えば、クロライド、プロマイド、イオジド)、メタンスルホニル(メシル)、p-トルエンスルホニル(トシル)、トリフルオロメチルスルホニル(トリフレート)、及びトリフルオロメチルスルホネートなどがある。

【 0 1 3 9 】

省略記号

リンカー成分:

MC = 6-マレイミドカプロイル

Val-Cit又は「vc」= バリン-シトルリン(プロテアーゼにより切断可能なリンカーの例示的なジペプチド)

シトルリン = 2-アミノ-5ウレイドペンタン酸

PAB = p-アミノベンジルオキシカルボニル(「自己犠牲(self immolative)」リンカー成分の例)

Me-Val-Cit = N-メチル-バリン-シトルリン(リンカーペプチド結合が、カテプシンBによる切断を阻害するように修飾されているもの)

10

20

30

40

50

MC(PEG)6-OH = マレイミドカプロイル - ポリエチレングリコール(抗体システムに結合しうる)

SPP = N-スクシンイミジル-4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート

SPDP = N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート

SMCC = スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート

IT = イミノチオラン

細胞障害性剤：

MMAE = モノメチルアウリスタチンE (MW 718)

MMAF = 薬剤のC末端にフェニルアラニンをもつアウリスタチンE (MMAE)の変異体 (MW 731.5) 10

MMAF-DMAEA = C末端のフェニルアラニンに対するアミド連結にDMAEA(ジメチルアミノエチルアミン)をもつMMAF (MW 801.5)

MMAF-TEG = フェニルアラニンにエステル化したテトラエチレングリコールをもつMMAF

MMAF-NtBu = MMAFのC末端にアミドとして結合した、N-t-ブチル

DM1 = N(2')-デアセチル-N(2')-(3-メルカプト-1-オキソプロピル)-メイトンシン

DM3 = N(2')-デアセチル-N(2)-(4-メルカプト-1-オキソペンチル)-メイトンシン

DM4 = N(2')-デアセチル-N(2)-(4-メルカプト-4-メチル-1-オキソペンチル)-メイトンシン 20

【0140】

さらに、略語は以下の通りである：AEはアウリスタチンEであり、BocはN(tブトキシカルボニル)であり、citはシトルリンであり、dapはドラプロイン(dolaproine)であり、DCCは1,3-ジシクロヘキシルカルボジイミドであり、DCMはジクロロメタンであり、DEAはジエチルアミンであり、DEADはジエチルアゾジカルボキシレートであり、DEPCはジエチルホスホリルシアニダーターであり、DIADはジイソプロピルアゾジカルボキシレートであり、DIEAはN,N-ジイソプロピルエチルアミンであり、dilはドライソロイシンであり、DMAはジメチルアセトアミドであり、DMAPは4-ジメチルアミノピリジンであり、DMEはエチレングリコールジメチルエーテル(又は1,2-ジメトキシエタン)であり、DMFはN,N-ジメチルホルムアミドであり、DMSOはジメチルスルホキシドであり、doeはドラフェニン(dolaphenine)であり、dovはN,N-ジメチルバリンであり、DTNBは5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)であり、DTPAはジエチレントリアミンペンタ酢酸であり、DTTはジチオトレイトールであり、EDCIは1-(3-ジメチルアミノプロピル)-3-エチルカルボジイミド塩酸塩であり、EEDQは、2-エトキシ-1-エトキシカルボニル-1,2-ジヒドロキノリンであり、ES-MSはエレクトロスプレー質量分析であり、EtOAcは酢酸エチルであり、FmocはN-(9-フルオレニルメトキシカルボニル)であり、glyはグリシンであり、HAUは、O-(7-アザベンゾトリアゾール-1-イル)-N,N,N',N'-テトラメチルウロニウムヘキサフルオロホスフェートであり、HOBtは1-ヒドロキシベンゾトリアゾールであり、HPLCは高速液体クロマトグラフィであり、ileはイソロイシンであり、lysはリジンであり、MeCN(CH₃CN)はアセトニトリルであり、MeOHはメタノールであり、Mtrは4-アニシルジフェニルメチル(又は4-メトキシトリチル)であり、(1S, 2R)-(+)-ノルエフェドリンではなく、PBSはリン酸塩緩衝生理食塩水(pH 7.4)であり、PEGはポリエチレングリコールであり、Phはフェニルであり、Pnpはp-ニトロフェニルであり、MCは6-マレイミドカプロイルであり、pheはL-フェニルアラニンであり、PyBroPは、プロモトリス-ピロリジノホスホニウムヘキサフルオロホスフェイトであり、SECはサイズ排除クロマトグラフィであり、Suはスクシンイミドであり、TFAはトリフルオロ酢酸であり、TLCは薄層クロマトグラフィであり、UVは紫外線であり、valはバリンである。 30 40 50

【 0 1 4 1 】

組成物及びその作製方法

C D 2 2 に結合する抗体が提供される。抗 C D 2 2 抗体を含んでなるイムノコンジュゲートが提供される。本発明の抗体及びイムノコンジュゲートは、例えば、C D 2 2 の発現の増加などの発現の変更と関係する疾患の診断や治療に有用である。ある実施態様では、本発明の抗体又はイムノコンジュゲートは、癌などの細胞増殖性疾患の診断や治療に有用である。

【 0 1 4 2 】

抗 C D 2 2 抗体

一態様では、本発明は C D 2 2 に結合する抗体を提供する。いくつかの実施態様では、ヒトおよびカニクイザル(c y n o)の C D 2 2 の成熟形態に結合する抗体が提供される。そのような実施態様では、ヒトの C D 2 2 の成熟形態は配列番号：27のアミノ酸配列を有する。成熟した、主なヒトのアイソフォームは、7つの I g 様ドメインと配列番号：28のアミノ酸配列を含む細胞外ドメインを有する。他の実施態様では、細胞外ドメイン3および4を欠いているヒトの C D 2 2 の微量のアイソフォームは配列番号：29のアミノ酸配列を有する。微量のアイソフォームの細胞外ドメインのアミノ酸配列は配列番号：30である。c y n o C D 2 2 は配列番号：31のアミノ酸配列を有する。いくつかの実施態様では、C D 2 2 に対する抗体は、細胞表面に発現される C D 2 2 の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、細胞表面に発現される C D 2 2 の成熟形態に結合する抗体は、細胞の成長を阻害する。いくつかの実施態様では、抗 C D 2 2 抗体は、細胞表面に発現される C D 2 2 の成熟形態に結合して、細胞増殖を阻害する。ある実施態様では、抗 C D 2 2 抗体は、細胞表面に発現される C D 2 2 の成熟形態と結合して、細胞死を誘導する。いくつかの実施態様では、抗 C D 2 2 抗体は、癌細胞の表面に発現される C D 2 2 の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、抗 C D 2 2 抗体は、同じ組織起源の正常細胞と比較して癌細胞の表面に過剰に発現される C D 2 2 の成熟形態に結合する。いくつかの実施態様では、抗 C D 2 2 抗体は、細胞毒素又は検出可能な標識にコンジュゲートされ、細胞表面上の C D 2 2 に結合する。いくつかの実施態様では、抗体-毒素コンジュゲートは細胞の成長を阻害する。いくつかの実施態様では、抗体-検出可能な標識コンジュゲートは、その表面上に C D 2 2 を発現する細胞をインビトロ又はインビボで検出可能にする。

【 0 1 4 3 】

一態様では、抗 C D 2 2 抗体はモノクローナル抗体である。一態様では、抗 C D 2 2 抗体は抗体断片、例えば F a b、F a b'-S H、F v、s c F v 又は (F a b')₂ 断片である。一態様では、抗 C D 2 2 抗体はキメラ、ヒト化、又はヒトの抗体である。一態様では、本発明書中に記載のいずれかの抗 C D 2 2 抗体は精製される。

ファージライブラリから得られる例示的なモノクローナル抗体は、本願明細書において提供される。ライブラリをスクリーニングするために用いられる抗原は、C D 2 2 および の細胞外ドメイン(E C D)に対応する、配列番号28又は配列番号：30のアミノ酸配列の配列を有するポリペプチドとした。ライブラリスクリーニングから生じる抗体は親和性成熟される。

一態様では、マウス 1 0 F 4 . 4 . 1、ヒト化 1 0 F 4 v 1 および v 3、およびマウス 5 E 8 . 1 . 8 と C D 2 2 への結合について競合するモノクローナル抗体が提供される。また、マウス 1 0 F 4 . 4 . 1、ヒト化 1 0 F 4 v 1 および v 3、およびマウス 5 E 8 . 1 . 8 と同じエピトープに結合するモノクローナル抗体が提供される。

本発明の一態様では、抗 C D 2 2 抗体をコードするポリヌクレオチドが提供される。ある実施態様では、抗 C D 2 2 抗体をコードするポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。ある実施態様では、前記のベクターを含む宿主細胞が提供される。本発明の他の態様では、抗 C D 2 2 抗体をコードする抗 C D 2 2 抗体又はポリヌクレオチドを含有する組成物が提供される。ある実施態様では、本発明の組成物は、本明細書中で列挙したものなどの細胞増殖性疾患の治療のための製薬的製剤である。

10

20

30

40

50

【 0 1 4 4 】

抗体の投与および製剤

一実施態様では、本発明の抗CD22抗体又は抗CD22抗体薬剤コンジュゲート(限定するものではないが、本発明の抗CD22 thiomab薬剤コンジュゲートを含む)は、B細胞表面抗原のアンタゴニストと組み合わせて投与される。更なる治療的薬剤「との組合せ」投与には同時(併用)及びいずれかの順序での連続投与が含まれる。一実施態様では、投与は連続的であるか、経時的である。他の実施態様では、投与は、同時、同時期、または同じ製剤と一緒にある。一実施態様では、B細胞表面抗原アンタゴニストは抗体ないしはその抗原結合断片である。一実施態様では、B細胞表面アンタゴニストは抗体薬剤コンジュゲートである。

本明細書中の製剤は、治療される特定の徴候の必要に応じて1より多い活性な化合物、好ましくは互いに悪影響を与えない相補的な活性を有する化合物を含有してもよい。例えば、抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はCD22結合オリゴペプチドに加えて、一つの製剤中に、更なる抗体、例えばCD22ポリペプチド上の異なるエピトープを結合する第二の抗CD22抗体、又は異なるB細胞表面抗原を結合する第二の抗体、又は特定の癌の成長に影響する増殖因子などのいくつかの他の標的に対する抗体を含有することを意図してもよい。あるいは又はさらに、組成物は、化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、増殖阻害性剤、抗ホルモン剤および/または心臓保護剤を更にも含んでもよい。このような分子は、意図する目的のために有効である量で適切に組み合わせられる。

【 0 1 4 5 】

現在、癌の段階に応じて、癌治療は、癌性の組織を取り除くための外科手術、放射線療法および化学療法、の治療法の一つ又は組合せを伴う。抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチド療法は、放射線療法の有用性に限界がある転移性疾患や化学療法の副作用や毒性に対して耐性がない高齢の患者に特に望ましい。本発明の腫瘍を標的とする抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドは、疾患の初回診断時や再発の際のCD22発現癌を軽減するために有用である。治療のために、抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドは、単独で用いることができるし、例えばホルモン剤、血管新生抑制剤、又は外科手術、寒冷療法及び/又は放射線療法との組み合わせ療法で用いてもよい。抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチド治療は、従来の療法の他の形態とともに、従来の治療の前又は後のいずれかが連続して施されてもよい。癌を治療するかまたは緩和するための本発明の方法では、癌患者は、一又は複数の先の化学療法剤による治療とともに、抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドを投与されてもよい。抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドは、化学療法剤の治療的に有効な量で投与される。他の実施態様では、抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドは、化学療法剤の活性および有効性を上げるために、化学療法とともに投与される。米医薬品便覧(PDR)には、様々な癌の治療に用いられている薬剤の用量が開示されている。治療的に有効である前記の化学療法剤の投薬計画および用量は、治療される特定の癌、疾患の程度および当分野の医師に知られる他の因子によって決まり、医師によって測定されることも可能である。

【 0 1 4 6 】

ある特定の実施態様では、細胞障害性剤とコンジュゲートされた抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドを含むコンジュゲートが患者に投与される。好ましくは、CD22タンパク質に結合したイムノコンジュゲートは細胞に取り込まれ、結果として、結合する癌細胞を殺す際のイムノコンジュゲートの治療有効性が増加する。一実施態様では、細胞障害性剤は癌細胞内の核酸を標的とするか、又は干渉する。細胞障害性剤の例は前記されるものであり、アウリスタチン、メイタンシノイド、カリケアマイシン、RNA分解酵素およびDNAエンドヌクレアーゼ又は生物学的に活性なこれらの誘導体が含まれる。

抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチド又はこれらの毒素コンジュゲートは、周知の方法、例えば、ボラスとして又は一定期間に渡る連続注入による静脈内投与、筋肉内、腹膜内、脳脊髄内、皮下、関節間、滑膜内、くも膜下腔内、経口、局所、又は吸入経路などにより、ヒト患者に投与される。抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドの静脈内投与又は皮下投与が好ましい。

他の治療的投薬計画は、抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドの投与と組み合わせてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の製薬的製剤を用いての同時投与や、いずれかの順序での連続投与が含まれ、このとき、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間があるのが好ましい。このような併用療法により相乗的な治療効果が生じるのが好ましい。

10

【0147】

また、抗CD22抗体(一又は複数)、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート又はオリゴペプチドの投与と、他の腫瘍抗原又は特定の癌に関連するB細胞表面抗原に対する抗体の投与とを組み合わせることが望ましい。

他の実施態様では、本発明の治療方法は、異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む、抗CD22抗体(一又は複数)、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート(一又は複数)又はオリゴペプチド(一又は複数)と一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害剤との組合せ投与を含む。化学療法剤には、リン酸エストラムスチン、プレドニマスチン、シスプラチン、5フルオロウラシル、メルファラン、シクロホスファミド、ヒドロキシ尿素およびヒドロキシ尿素タキサン類(例えばパクリタキセルおよびドキセタキセル)および/またはアンシラサイクリン抗生物質、並びに、限定するものではないがCHOPやFOLFOX等の薬剤の組合せが含まれる。このような化学療法剤の調製及び投与スケジュールは製造者の注意書きに従い使用されるか、又は熟練した実務者により経験的に決定される。このような化学療法剤の調製および投与スケジュールは、Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)にも記述される。

20

抗体は、非経口、局所、皮下、腹膜内、肺内、鼻腔内、および/または病巣内投与を含む任意の適切な手段によって投与される。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下投与が含まれる。くも膜下腔内投与も考慮される(例として、CD22抗体のくも膜下腔内移送に関する、Grillo-Lopez, Aの米国特許公開2002/0009444を参照)。好ましくは、静脈内又は皮下に投与される。

30

第二の医薬は、治療用抗体ないしイムノアドヘシンの初回曝露及び/又は後の曝露によって投与されてもよく、前記の組合せ投与には、別々の製剤又は単一の製薬的製剤を用いた投与や、いずれかの順序での連続投与が含まれ、このとき、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間があるのが好ましい。

【0148】

治療用抗CD22抗体、抗CD22抗体薬剤コンジュゲート、イムノアドヘシン又は他の生物学的物質が、自己免疫性疾患を治療するために単一の薬剤として投与されうるのに対して、一般に、治療用抗体ないしイムノアドヘシンは一又は複数の第二医薬と組み合わせられるであろう。例えば、RAおよび他の自己免疫性疾患のために、抗体、イムノアドヘシン又は他の生物学的薬剤は、前記の定義の項目に列挙した、任意の一又は複数の免疫抑制剤、化学療法剤、BAFFアンタゴニスト、インテグリンアンタゴニストないしは抗体、および/またはサイトカイン;任意の一又は複数の疾患変更抗リウマチ剤(DMARD)、例えばヒドロキシクロロキン、サルファサラジン、メトトレキセート、レフルノミド、アザチオプリン、D-ペニシルアミン、ゴールド(経口)、ゴールド(筋肉内)、ミノサイクリン、シクロスポリン;ブドウ球菌プロテインA免疫吸着;静脈免疫グロブリン(IVIg);非ステロイド系抗炎症薬(NSAID);糖質コルチコイド(例えば関節注射による);副腎皮質ステロイド(例えばメチルプレドニゾンおよび/またはプレドニゾン);葉酸塩;抗腫瘍壊死因子(TNF)アンタゴニスト、例えばエタネルセプト/ENBRELTTM、インフリキシマブ/REMICADETM、D2E7(Kno1)又はCDP-870(Celltech);IL-1Rアンタゴニスト(例えばKineret);IL-10アンタゴニスト(例えばIlod

40

50

ecakin); 血液凝固モジュレーター(例えばWinRho); I L - 6 アンタゴニスト/抗 T N F (C B P 1 0 1 1); C D 4 0 アンタゴニスト(例えば I D E C 1 3 1); I g - F c レセプターアンタゴニスト(M D X 3 3); 免疫修飾物質(例えばthalidomide又はImmuDyn); 抗 C D 5 抗体(例えば H 5 g 1 . 1); マクロファージインヒビター(例えば M D X 3 3); 共刺激ブロッカー(例えば B M S 1 8 8 6 6 7 又はトレリマブ(Tolerimab)); 補体インヒビター(例えば h 5 G 1 . 1 、 3 E 1 0 又は抗崩壊促進因子(D A F)抗体); I L - 2 アンタゴニスト(z x S M A R T); E G F R インヒビター(上記の定義を参照); チロシンキナーゼインヒビター(上記の定義を参照); 抗血管新生剤(例えばベバシズマブなどの V E G F 抗体); L L 2 又はエピラツズマブ(L Y M P H O C I D E (登録商標); Immunomedics)などの C D 2 2 抗体、例として、エピラツズマブ Y - 9 0 (Juweid等 Cancer Res 55(23 Suppl): 5899 s-5907s (1995))、アピオジェンの C D 2 2 抗体(Abiogen, Italy)、C M C 5 4 4 (Wyeth/Celltech)、c o m b o t o x (UT Southwestern)、B L 2 2 (NIH)、及び L y m p o S c a n T c 9 9 (Immunomedics); E p C A M 抗体、例えば 1 7 - 1 A (PANOREX(登録商標)); v 3 抗体(例えば V I T A X I N (登録商標); Medimmune); C D 3 7 抗体、例えば T R U 0 1 6 (Trubion); I L - 2 1 抗体(Zymogenetics/Novo Nordisk); 抗 B 細胞抗体(Impheron); B 細胞を標的とする M A b (Immunogen/Aventis); 1 D 0 9 C 3 (Morphosys/GPC); L y m p h o R a d 1 3 1 (HGS); L y m - 1 抗体 Y - 9 0 (USC); L I F 2 2 6 (Enhanced Lifesci.); B A F F 抗体(例えば国際公開第 0 3 / 3 3 6 5 8 号); B A F F レセプター抗体(例えば国際公開第 0 2 / 2 4 9 0 9 号); B R 3 抗体; B l y s 抗体、例えばベリムマブ(belimumab); L Y M P H O S C D 2 2 - B ^{T M}; 抗 L y m - 1 Oncolym(USC/Peregrine); I S F 1 5 4 (UCSD/Roche/Tragen); g o m i l i x i m a (I d e c 1 5 2 ; Biogen Idec); I L - 6 レセプター抗体、例えばアトリズマブ(atlizumab)(A C T E M R A ^{T M}; Chugai/Roche); I L - 1 5 抗体、例えば H u M a x - I L - 1 5 (Genmab/Amgen); ケモカインレセプター抗体、例えば C C R 2 抗体(例えば M L N 1 2 0 2 ; Millieneum); 抗補体抗体、例えば C 5 抗体(例えばエクリズマブ、5 G 1 . 1 ; Alexion); ヒトイムノグロブリンの経口製剤(例えば I g P O ; Protein Therapeutics); I L - 1 2 抗体、例えば A B T - 8 7 4 (CAT/Abbott); テネリキシマブ(Teneliximab)(B M S - 2 2 4 8 1 8); B 細胞ワクチン; D N - B A F F (Xencor); C R x - 1 1 9 (CombinatoRx); アムジェンの B A F F アンタゴニスト; ペントスタチン(Pfizer); I C - 4 8 5 (ICOS); ケモカインアンタゴニスト、例えば T - 4 8 7 (Tularik)又は R e t i c u l o s e (AVR-118); S C O - 3 2 3 (SCIOS); インテグリンアンタゴニスト 6 8 3 6 9 9 、 Tanabe, NGD-2001-1 (Neurogen); S C I O - 4 6 9 (SCIOS); B I R B - 7 9 6 (Boehringer Ingelheim); V X 7 0 2 、 V X 8 5 0 (Vertex); ロイコトリエン B - 4 アンタゴニスト(例として、 a m e l u b u n t 、 B I I L - 2 8 4 ; BI); 微小管モジュレーター(P a x c e e d ; Angiotech); プロテアーゼインヒビター(M B S 5 6 1 3 9 2 ; BMS); A G I X - 4 2 0 7 (Atherogenics); I S I S - 1 0 4 8 3 8 (ISIS/Elan); M F G - I R A P (Univ. Pitt.); I L - 1 T r a p (R G N - 3 0 3 ; Regeneron/Novartis); オプレルベキン(Wyeth); エベロリムス(C e r t i c a n ; Novartis); A m e v i v e (Biogen Idec); O R G - 3 9 1 4 1 (Organon); F K - 5 0 6 (Fujisawa); 及び I L - 2 アンタゴニスト(タクロリムス; Fujisawa)と組み合わせるのが好ましい。

【 0 1 4 9 】

例示的な抗 C D 2 2 抗体の詳細な解説は、以下の通りである：

1 . 抗 C D 2 2 抗体の具体的な実施態様

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1 、(b) 配列番号：4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2 、(c) 配列番号：6 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - H 3 、(d) 配列番号：9、10、19、20、21、22、23 のいずれか一のアミノ酸配列を含む H V R - L 1 、(e) 配列番号：12 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2 、及び(f) 配列番号：14 から選択されるアミノ酸配列を含む H V R - L 3 から選択される少なくとも1、2、3、4、5又は6の H V R を含んでなる抗体を提供する。

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、(b) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、(c) 配列番号：6から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3、から選択される少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてのVH HVRを含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1を含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2を含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：6から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3を含んでなる抗CD22抗体を提供する。

【0150】

一態様では、本発明は、配列番号：6から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3と配列番号：2から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H1とを含んでなる抗CD22抗体を提供する。

一態様では、本発明は、配列番号：6から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H3と配列番号：4から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-H2とを含んでなる抗CD22抗体を提供する。

一態様では、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2とを含んでなる抗CD22抗体を提供する。

一態様では、本発明は、配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3とを含んでなる抗CD22抗体を提供する。

【0151】

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：9又は配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-L1、(b) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び(c) 配列番号：14から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L3、から選択される少なくとも1、少なくとも2、又は3つすべてのVL HVRを含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：9から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L1を含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：10から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L1を含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、本発明は、配列番号：19から23から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L1を含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、HVR-L1は配列番号：9のアミノ酸配列を含んでおり、このときN28がVに置換されている(N28Vアミノ酸変化、これによって配列番号：10が生成される)。一態様では、HVR-L1は配列番号：9のアミノ酸配列を含んでおり、このときN28がAに置換されている(N28Aアミノ酸変化、これによって配列番号：19が生成される)。一態様では、HVR-L1は配列番号：9のアミノ酸配列を含んでおり、このときN28がQに置換されている(N28Qアミノ酸変化、これによって配列番号：20が生成される)。一態様では、HVR-L1は配列番号：9のアミノ酸配列を含んでおり、このときN28がSに置換されている(N28Sアミノ酸変化、これによって配列番号：21が生成される)。一態様では、HVR-L1は配列番号：9のアミノ酸配列を含んでおり、このときN28がDに置換されている(N28Dアミノ酸変化、これによって配列番号：22が生成される)。一態様では、HVR-L1は配列番号：9のアミノ酸配列を含んでおり、このときN28がIに置換されている(N28Iアミノ酸変化、これによって配列番号：23が生成される)。一態様では、本発明は、配列番号：9、10、19、20、21、22、23のいずれか一のアミノ酸配列を含むHVR-L1を含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、HVR-L1は、配列番号：9、10、19、20、21、22又は23のいずれか一であり、位置N30のアミノ酸(位置30のアスパラギン)がAに置換されている(N30Aアミノ酸変化)。一態様では、HVR-L1は、配列番号：9、10、19、20、21、22又は23のいずれか一であり、位置N30のアミノ酸(位置30のアスパラギン)がQに置換されている(N30Qアミノ酸変化)。

【0152】

10

20

30

40

50

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(b) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含んでなる抗CD22抗体を提供する。いくつかの実施態様では、CD22抗体はさらに、(a) 配列番号：2を含むHVR-H1と配列番号：4を含むHVR-H2とを含んでなる。

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(b) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2とを含んでなる抗CD22抗体を提供する。いくつかの実施態様では、CD22抗体はさらに、(a) 配列番号：2を含むHVR-H1と配列番号：4を含むHVR-H2とを含んでなる。

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(b) 配列番号：9、10、19、20、21、22および23から選択されるアミノ酸配列を含むHVR-L1とを含んでなる抗CD22抗体を提供する。いくつかの実施態様では、CD22抗体はさらに、(a) 配列番号：2を含むHVR-H1と配列番号：4を含むHVR-H2とを含んでなる。いくつかの実施態様では、配列番号：9、10、19、20、21、22又は23のアミノ酸配列は、N30A又はN30Qアミノ酸変化を含む。いくつかの実施態様では、CD22抗体はさらに、配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2を含む。いくつかの実施態様では、CD22抗体はさらに、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む。

【0153】

一態様では、本発明は、(a) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1と、(b) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2と、(c) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(d) 配列番号：9、10、19、20、21、22、23から選択したアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(e) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2と、配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3とを含んでなる抗CD22抗体を提供する。いくつかの実施態様では、本発明はさらに、HVR-L1として選択されるアミノ酸配列配列番号：9、10、19、20、21、22又は23がN30A又はN30Qアミノ酸変化によって修飾されているものを提供する。

一態様では、本発明は、配列番号：16を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗CD22抗体を提供する(図2A、h10F4v1を参照)。一態様では、本発明は、配列番号：17を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる抗CD22抗体を提供する(図2B、h10F4v1を参照)。一態様では、本発明は、配列番号：18を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる抗CD22抗体を提供する(図2B、h10F4v3を参照)。

一態様では、本発明は、配列番号：34を含む重鎖を含んでなる抗CD22抗体を提供する(図2A、m10F4を参照)。一態様では、本発明は、配列番号：35を含む軽鎖を含んでなる抗CD22抗体を提供する(図2B、m10F4を参照)。

【0154】

一態様では、本発明は、ATCCに寄託され、寄託番号PTA-7621を有するハイブリドーマによって産生される抗体10F4.4.1の1、2、3、4、5又は6のHVR配列を含んでなる抗CD22抗体を提供する。

一態様では、本発明は、ATCCに寄託され、寄託番号PTA-7620を有するハイブリドーマによって産生される抗体5E8.1.8の1、2、3、4、5又は6のHVR配列を含んでなる抗CD22抗体を提供する。

抗CD22抗体は、CD22を結合する能力を保持する限り、任意の適切なフレームワーク可変ドメイン配列を含んでもよい。例えば、いくつかの実施態様では、本発明の抗CD22抗体は、ヒトのサブグループIII重鎖フレームワークコンセンサス配列を含んでなる。これらの抗体の一実施態様では、重鎖フレームワークコンセンサス配列は、位置71、73および/または78に置換を含む。これらの抗体の一実施態様では、位置71はAであり、位置73はTであり、および/または、位置78はAである。一実施態様では、これらの抗体は、huMAb4D5-8の重鎖可変ドメインフレームワーク配列、例えば配列番号：1、3、5、7(それぞれFR-H1、FR-H2、FR-H3、FR-H4)を含む。huMAb4D5-8はハーセプチン(登録商標)抗HER2抗体(Genentech, Inc., S

10

20

30

40

50

outh San Francisco, CA, USA)として商業的に公知であり、米国特許第6407213号及び同第5821337号、及びLee等, J. Mol. Biol. (2004), 340(5): 1073-93においても言及される。このような実施態様では、これらの抗体はさらに、ヒトの I 軽鎖フレームワークコンセンサス配列を含む。このような実施態様では、これらの抗体は、h u M A b 4 D 5 - 8 の軽鎖可変ドメインフレームワーク配列、例えば配列番号：8、1、13、15(それぞれFR-L1、FR-L2、FR-L3、FR-L4)を含む。

【0155】

一実施態様では、抗CD22抗体は、フレームワーク配列および高頻度可変領域を含む重鎖可変ドメインを含んでなり、このときフレームワーク配列はFR-H1-FR-H4配列、それぞれ配列番号：1、3、5および7を含み、HVR H1は配列番号：2のアミノ酸配列を含み、HVR-H2は配列番号：4のアミノ酸配列を含み、そしてHVR-H3は配列番号：6から選択されるアミノ酸配列を含んでいる。一実施態様では、抗CD22抗体は、フレームワーク配列および高頻度可変領域を含む軽鎖可変ドメインを含んでなり、このときフレームワーク配列はFR-L1-FR-L4配列、それぞれ配列番号：8、11、13および15を含み、HVR-L1は配列番号：9、10、19、20、21、22及び23から選択されるアミノ酸配列を含み、このとき配列番号：9から10又は19から23のいずれか一はN30A又はN30Qのアミノ酸変化を含んでもよく、HVR-L2は配列番号：12のアミノ酸配列を含み、そしてHVR-L3は配列番号：14から選択されるアミノ酸配列を含んでいる。これらの抗体の一実施態様では、重鎖可変ドメインは配列番号：16を含み、軽鎖可変ドメインは配列番号：17又は18を含む。

いくつかの実施態様では、本発明は、アミノ酸配列配列番号：16に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる抗CD22抗体を提供する。いくつかの実施態様では、少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比較して置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体はCD22に結合する能力を保持する。いくつかの実施態様では、合計1~10のアミノ酸が、配列番号：16の配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されている。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失はHVR以外の領域(すなわちFR)で起こる。いくつかの実施態様では、抗CD22抗体は、配列番号：16から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインを含んでなる。

【0156】

いくつかの実施態様では、本発明は、以下に図示する重鎖可変ドメインを含む抗CD22抗体を提供する。

1 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser
 Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn
 Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Tyr Pro
Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Gly Ser Ser Trp Asp Trp Tyr Phe
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 113 (配列番号 :16)

(HVR残基を下線で示す)。

いくつかの実施態様では、重鎖HVRおよびFR配列は以下を含む。

40
 50

H V R - H 1 (Gly Tyr Glu Phe Ser Arg Ser Trp Met Asn、配列番号 : 2)

H V R - H 2 (Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Ser Gly Lys Phe Lys Gly、配列番号 : 4)

H V R - H 3 (Asp Gly Ser Ser Trp Asp Try Tyr Phe Asp Tyr、配列番号 : 6)

F R - H 1 (Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser、配列番号 : 1)

F R - H 2 (Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val、配列番号 : 3)

F R - H 3 (Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg、配列番号 : 5)

F R - H 4 (Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser、配列番号 : 7)

10

【 0 1 5 7 】

いくつかの実施態様では、本発明は、以下に示す軽鎖可変ドメインを含む抗 C D 2 2 抗体を提供する。

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
108 (配列番号 :17)

20

(H V R 残基を下線で示し、位置 N 2 8 を太字で示す)
又は

30

1 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val
Gly Asn Thr Phe Leu Glu Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Ser
Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser
Gln Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
108 (配列番号 :18)

40

(H V R 残基を下線で示し、位置 N 2 8 V を太字で示す)。

【 0 1 5 8 】

いくつかの実施態様では、軽鎖 H V R 配列は以下を含む。

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号 : 9)

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Val Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配

50

列番号： 1 0)

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ala Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号： 1 9)

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Gln Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号： 2 0)

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ser Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号： 2 1)

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asp Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号： 2 2)

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Asn Thr Phe Leu Glu、配列番号： 2 3)

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Ala Thr Phe Leu Glu、配列番号： 3 2)

H V R - L 1 (Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Ile Gly Gln Thr Phe Leu Glu、配列番号： 3 3)

H V R - L 2 (Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser、配列番号： 1 2)

H V R - L 3 (Phe Gln Gly Ser Gln Phe Pro Tyr Thr、配列番号： 1 4)。

いくつかの実施態様では、軽鎖 F R 配列は以下を含む。

F R - L 1 (Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys、配列番号： 8) ;

F R - L 2 (Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr、配列番号： 1 1) ;

F R - L 3 (Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys, SEQ ID NO: 13) FR-L4 (Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg、配列番号： 1 3)

F R - L 4 (Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg、配列番号： 1 5)

【 0 1 5 9 】

一態様では、本発明は、配列番号： 1 7 又は 1 8 から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる抗 C D 2 2 抗体を提供する。いくつかの実施態様では、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比べて置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体は C D 2 2 への結合能を保持する。いくつかの実施態様では、合計 1 ~ 1 0 のアミノ酸が、配列番号： 1 7 又は 1 8 から選択される配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されている。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失は H V R 以外の領域(すなわち F R)で起こる。いくつかの実施態様では、抗 C D 2 2 抗体は、配列番号： 1 7 又は 1 8 から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインを含んでなる。

一態様では、本発明は、(a) 配列番号： 1 6 から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、(b) 配列番号： 1 7 又は 1 8 から選択されるアミノ酸配列に少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗 C D 2 2 抗体を提供する。いくつかの実施態様では、少なくとも 9 0 %、9 1 %、9 2 %、9 3 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の配列同一性を有するアミノ酸配列は、参照配列と比べて置換、挿入又は欠失を含有するが、そのアミノ酸配列を含む抗体は C D 2 2 への結合能を保持する。いくつかの実施態様では、合計 1 ~ 1 0 のアミノ酸が、参照配列において置換されているか、挿入されているか、又は欠失されている。いくつかの実施態様では、置換、挿入又は欠失は H V R 以外の領域(すなわち F R)で起こる。いくつかの実施態様では、抗 C D 2 2 抗体は、

10

20

30

40

50

配列番号：16のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメインと、配列番号：18から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメインとを含んでなる。

【0160】

一態様では、本発明は、(a) 図2Aに示すものから選択される1、2又は3のVH HVR、及び/又は(b) 図2Bに示すものから選択される1、2又は3のVL HVRを含んでなる抗CD22抗体を提供する。一態様では、本発明は、図2Aに示すものから選択される重鎖可変ドメインと、図2Bに示すものから選択される軽鎖可変ドメインとを含んでなる抗CD22抗体を提供する。

一態様では、本発明の抗CD22抗体は、ATCCに寄託され、寄託番号PTA-7620を有するハイブリドーマによって産生される5E8.1.8抗体の1、2、3、4、5又は6の高頻度可変領域を含んでなる。

【0161】

2. 抗体断片

本発明は抗体断片を包含する。抗体断片は、酵素消化などの古典的な手段や組み換え技術によって生成されうる。特定の場合では、全抗体よりも抗体断片の利用に利点がある。より小さいサイズの断片によりクリアランスが速くなり、固形腫瘍へのアクセスが改善されうる。ある抗体断片の概説については、Hudson等(2003) Nat. Med. 9:129-134を参照

。抗体断片を生産するために様々な技術が開発されている。伝統的には、これらの断片は、完全な抗体のタンパク分解性消化を介して誘導されていた(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992)及びBrennan等, Science, 229:81(1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は現在は組換え宿主細胞により直接生産することができる。例えば、Fab、Fv及びScFv抗体断片はすべて、大腸菌で発現され、分泌されるため、この断片の大規模産生が容易となる。抗体断片は上述において検討した抗体ファージライブラリーから分離することができる。別法として、Fab'-SH断片は大腸菌から直接回収することができ、化学的に結合してF(ab')₂断片を形成することができる(Carter等, Bio/Technology 10:163-167(1992))。他のアプローチ法では、F(ab')₂断片を組換え宿主細胞培養から直接分離することができる。サルベージレセプター結合エピトープ残基を含有する、インビボ半減期が増加したFab及びF(ab')₂断片は米国特許第5869046号に記載される。抗体断片の生産のための他の方法は当業者には明らかであろう。ある実施態様では、抗体は単鎖Fv断片(s c F V)である。国際公開第93/16185号；米国特許第5571894号；及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びs c F vは、定常領域が欠けている完全な結合部を有する唯一の種である；したがって、それらは、インビボでの使用の間の非特異的結合を減らすために適する。s c F v融合タンパク質は、s c F vのアミノ末端又はカルボキシ末端の何れかで、エフェクタータンパク質の融合物を得るために構築されうる。上掲のAntibody Engineering, ed. Borrebaeckを参照。また、抗体断片は、例えば米国特許第5641870号に記載されているような「直鎖状抗体」であってもよい。このような直鎖状の抗体は単特異的又は二重特異的であってもよい。

【0162】

3. ヒト化抗体

本発明はヒト化抗体を包含する。非ヒト抗体をヒト化する様々な方法は従来からよく知られている。例えば、ヒト化抗体には非ヒト由来の一又は複数のアミノ酸残基が導入されている。これら非ヒトアミノ酸残基は、しばしば、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と呼ばれる。ヒト化は、本質的にはヒト抗体の該当する高頻度可変領域配列を置換することによりウィンターと共同研究者の方法(Jonesほか, Nature, 321:522-525 (1986)、Riechmannほか, Nature, 332:323-327 (1988)、Verhoeyenほか, Science, 239:1534-1536(1988))を使用して実施することができる。よって、このような「ヒト化」抗体は、完全なヒト可変ドメインより実質的に少ない分が非ヒト種由来の該当する配列で置換されたキメラ抗体(米国特許第4816567号)である。実際には、ヒト化抗体

10

20

30

40

50

は、典型的にはいくつかの高頻度可変領域残基及び場合によってはいくらかのFR残基が齧歯類抗体の類似部位からの残基によって置換されているヒト抗体である。

抗原性を低減するには、ヒト化抗体を生成する際に使用するヒトの軽重両方の可変ドメインの選択が非常に重要となりうる。「ベストフィット法」では、齧歯動物抗体の可変ドメインの配列を既知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対してスクリーニングする。次に齧歯動物のものと最も近いヒト配列をヒト化抗体のヒトフレームワーク領域として受け入れる(Sims等, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia等, *J. Mol. Biol.*, 196:901(1987))。他の方法では、軽鎖又は重鎖の特定のサブグループのヒト抗体全てのコンセンサス配列から誘導される特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークをいくつかの異なるヒト化抗体に使用できる(Carter等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta等, *J. Immunol.*, 151:2623(1993))。

10

【0163】

更に、抗体を、抗原に対する高親和性や他の好ましい生物学的性質を保持してヒト化することが一般的に望ましい。この目標を達成するべく、ある方法によって、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用して、親配列及び様々な概念的ヒト化産物の分析工程を経てヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に入手可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推測三次元立体配座構造を図解し、表示するコンピュータプログラムは購入可能である。これら表示を見ることで、候補免疫グロブリン配列の機能における残基のありそうな役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンの抗原との結合能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、例えば標的抗原に対する親和性が高まるといった、望ましい抗体特性が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わせることができる。一般的に、高頻度可変領域残基は、直接的かつ最も実質的に抗原結合性に影響を及ぼしている。

20

【0164】

4. ヒト抗体

本発明のヒト抗CD22抗体は、上記のように、ヒト由来のファージディスプレイライブラリから選択したFvクローン可変ドメイン配列を公知のヒト定常ドメイン配列と結合することによって構築することができる。あるいは、本発明のヒトモノクローナル抗CD22抗体は、ハイブリドーマ法によって作製することができる。ヒトモノクローナル抗体の生産のためのヒトミエローマ及びマウス-ヒトヘテロミエローマ細胞株は、例えば、Kozbor, *J. Immunol.* 133, 3001(1984); Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp.51-63(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); 及びBoerner等, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991)によって記載されている。

30

免疫化することで、内因性免疫グロブリンの生産なしに、ヒト抗体の完全なレパートリーを生産することが可能なトランスジェニック動物(例えばマウス)を生産することが現在は可能である。例えば、キメラ及び生殖細胞系変異体マウスでの抗体重鎖結合領域(J_H)遺伝子のホモ接合体欠失は、内因性抗体の生産の完全な阻害をもたらすことが記載されている。そのような生殖細胞系変異体マウスでのヒト生殖細胞系免疫グロブリン遺伝子配列の転移は、抗原の挑戦によってヒト抗体の生産を引き起こす。例えば、Jakobovits等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551(1993); Jakobovits等, *Nature* 362, 255(1993); Bruggemann等, *Year in Immunol.*, 7: 33 (1993)を参照のこと。

40

【0165】

また、遺伝子シャフリングは、ヒト抗体が開始非ヒト、例えば齧歯類の抗体と類似した親和性及び特性を有している場合、非ヒト、例えば齧歯類の抗体からヒト抗体を得るために使用することもできる。「エピトープインプリンティング」とも呼ばれるこの方法により、本明細書中に記載のファージディスプレイ技術により得られた非ヒト抗体断片の重鎖可変領域遺伝子又は軽鎖可変領域遺伝子の何れかをヒトVドメイン遺伝子のレパートリーで置換し、非ヒト鎖/ヒト鎖scFvないしFabキメラの集団を作成する。抗原を選択することにより、ヒト鎖が初めのファージディスプレイクローンにおいて一致した非ヒト鎖の除去により破壊された抗原結合部位を回復する、非ヒト鎖/ヒト鎖キメラscFvな

50

いし F a b が単離される、つまり、エピトープがヒト鎖のパートナーの選択をつかさどる (インプリントする)。残りの非ヒト鎖を置換するためにこの工程を繰り返すと、ヒト抗体が得られる (1993年4月1日公開の P C T 特許出願 W O 9 3 / 0 6 2 1 3 を参照)。伝統的な C D R 移植による非ヒト抗体のヒト化と異なり、この技術により、非ヒト起源の F R 又は C D R 残基を全く持たない完全なヒト抗体が得られる。

【 0 1 6 6 】

5 . 二重特異性抗体

二重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある実施態様では、二重特異性抗体はヒト又はヒト化の抗体である。ある実施態様では、結合特異性の一つは C D 2 2 に対するものであり、他方は任意の他の抗原に対するものである。ある実施態様では、二重特異性抗体は、C D 2 2 の2つの異なるエピトープに結合しうる。また、二重特異性抗体は C D 2 2 を発現する細胞に細胞障害剤を局在化するためにも使用されうる。これらの抗体は C D 2 2 結合アーム及び細胞障害剤 (例えば、サポリン (saporin)、抗インターフェロン- γ 、ピンカアルカロイド、リシン A 鎖、メトトレキセート又は放射性同位体ハプテン) と結合するアームを有する。二重特異性抗体は完全長抗体又は抗体断片 (例えば F (a b ')₂ 二重特異性抗体) として調製することができる。

二重特異性抗体を作製する方法は当該分野において既知である。二重特異性抗体の伝統的な組み換え産生は二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の同時発現に基づき、ここで二つの重鎖は異なる特異性を持っている (Millstein 等, Nature, 305:537-539(1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖が無作為に取り揃えられているため、これらのハイブリドーマ (四部雑種) は 1 0 個の異なる抗体分子の可能性ある混合物を産生し、そのうちただ一つが正しい二重特異性構造を有する。通常、アフィニティークロマトグラフィー工程により行われる正しい分子の精製は、かなり煩わしく、生成物収率は低い。同様の方法が 1 9 9 3 年 5 月 1 3 日に公開の国際公報第 9 3 / 0 8 8 2 9 号及び Trauneker 等、EMBO J. 10:3655-3659(1991) に開示されている。

【 0 1 6 7 】

異なるアプローチ法では、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン (抗原 - 抗体結合部位) を免疫グロブリン定常ドメイン配列と融合させる。該融合は例えば、少なくともヒンジの一部、C H 2 及び C H 3 領域を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。ある実施態様では、軽鎖の結合に必要な部位を含む第一の重鎖定常領域 (C H 1) は、融合の少なくとも一つに存在する。免疫グロブリン重鎖の融合、望まれるならば免疫グロブリン軽鎖をコードしている D N A を、別個の発現ベクター中に挿入し、適当な宿主生物に同時形質移入する。これにより、コンストラクトに使用される三つのポリペプチド鎖の等しくない比率が最適な収率をもたらす態様において、三つのポリペプチド断片の相互の割合の調節に大きな融通性が与えられる。しかし、少なくとも二つのポリペプチド鎖の等しい比率での発現が高収率をもたらすとき、又はその比率が特に重要性を持たないときは、2 又は 3 個全てのポリペプチド鎖のためのコード化配列を一つの発現ベクターに挿入することが可能である。

このアプローチ法の一実施態様では、二重特異性抗体は、第一の結合特異性を有する一方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖と他方のアームのハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対 (第二の結合特異性を提供する) とからなる。二重特異性分子の半分にしかな免疫グロブリン軽鎖がないと容易な分離法が提供されるため、この非対称的構造は、所望の二重特異性化合物を不要な免疫グロブリン鎖の組み合わせから分離することを容易にすることが分かった。このアプローチ法は、国際公報第 9 4 / 0 4 6 9 0 号に開示されている。二重特異性抗体を産生する更なる詳細については、例えば Suresh 等, Methods in Enzymology, 121:210 (1986) を参照されたい。

他のアプローチ法によれば、一对の抗体分子間の界面を操作して組換え細胞培養から回収されるヘテロダイマーのパーセントを最大にすることができる。界面は抗体定常ドメインの C_H 3 ドメインの少なくとも一部を含む。この方法では、第 1 抗体分子の界面からの

一又は複数の小さいアミノ酸側鎖がより大きな側鎖(例えばチロシン又はトリプトファン)と置き換えられる。大きな側鎖と同じ又は類似のサイズの相補的「キャビティ」を、大きなアミノ酸側鎖を小さいもの(例えばアラニン又はスレオニン)と置き換えることにより第2の抗体分子の界面に作り出す。これにより、ホモダイマーのような不要の他の最終産物に対してヘテロダイマーの収量を増大させるメカニズムが提供される。

【0168】

二特異性抗体とは架橋抗体や「ヘテロ抱合抗体」を含む。例えば、ヘテロ抱合体の一方の抗体がアビジンと結合し、他方はビオチンと結合していても良い。このような抗体は、例えば、免疫系細胞を不要な細胞に対してターゲティングさせること(米国特許第4676980号)及びHIV感染の治療(国際公報第91/00360号、国際公報第92/00373号及び欧州特許第03089号)等の用途が提案されている。ヘテロ抱合抗体は適当な架橋方法によって生成できる。当技術分野においては、適切な架橋剤は周知であり、それらは複数の架橋法と共に米国特許第4676980号などに記されている。

抗体断片から二重特異性抗体を産生する技術もまた文献に記載されている。例えば、化学結合を使用して二重特異性抗体を調製することができる。Brennan等, *Science*, 229:81 (1985)は完全な抗体をタンパク分解性に切断してF(a b')₂断片を産生する手順を記述している。これらの断片は、ジチオール錯体形成剤亜硫酸ナトリウムの存在下で還元して近接ジチオールを安定化させ、分子間ジスルヒド形成を防止する。産生されたF a b'断片はついでチオニトロベンゾアート(TNB)誘導体に転換される。F a b'-TNB誘導体の一つをついでメルカプトエチルアミンでの還元によりF a b'-チオールに再転換し、他のF a b'-TNB誘導体の等モル量と混合して二重特異性抗体を形成する。作られた二重特異性抗体は酵素の選択的固定化用の薬剤として使用することができる。

【0169】

最近の進歩により大腸菌からF a b'-S H断片を直接回収することが容易となっており、これにより化学的にカップリングされて二重特異性抗体にを形成する。Shalaby等, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992)は、完全なヒト化二重特異性抗体F(a b')₂分子の産生について記述している。各々のF a b'断片は大腸菌から別々に分泌されて、インビトロで化学的にカップリングされて、二重特異性抗体を形成する。したがって、形成された二重特異性抗体は、HER2を過剰発現する細胞及び正常ヒトT細胞に結合するだけでなく、ヒト胸部腫瘍の標的に対するヒト細胞毒性リンパ球の溶解活性を引き起こすことができた。

組換え細胞培養から直接的に二重特異性抗体断片を作成し分離する様々な方法もまた記述されている。例えば、二重特異性抗体はロイシンジッパーを使用して生産された。Kostelny等, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)。F o s及びJ u nタンパク質からのロイシンジッパーペプチドを遺伝子融合により二つの異なった抗体のF a b'部分に結合させられた。抗体ホモダイマーはヒンジ領域で還元されてモノマーを形成し、ついで再酸化させて抗体ヘテロダイマーを形成する。この方法はまた抗体ホモダイマーの生産に対して使用することができる。Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)により記述された「ダイアボディ」技術は二重特異性抗体断片を作成する別のメカニズムを提供した。断片は、同一鎖上の2つのドメイン間の対形成を可能にするのに十分に短いリンカーにより軽鎖可変ドメイン(V_L)に重鎖可変ドメイン(V_H)を結合してなる。従って、一つの断片のV_H及びV_Lドメインは他の断片の相補的V_L及びV_Hドメインと強制的に対形成させられ、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖F v(s F v)ダイマーを使用する他の二重特異性抗体断片製造方策もまた報告されている。Gruber等, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)を参照されたい。

二価より多い抗体も考えられる。例えば、三重特異性抗体を調製することができる。Tutt等, *J. Immunol.* 147:60(1991)。

【0170】

6. 多価抗体

多価抗体は、抗体が結合する抗原を発現する細胞により、二価抗体よりも早くインター

10

20

30

40

50

ナリゼーション(及び/又は異化)されうる。本発明の抗体は、3又はそれ以上の結合部位を有する多価抗体(IgMクラス以外のもの)であり得(例えば四価抗体)、抗体のポリペプチド鎖をコードする核酸の組換え発現により容易に生成することができる。多価抗体は二量化ドメインと3又はそれ以上の抗原結合部位を有する。ある実施態様では、二量化ドメインはFc領域又はヒンジ領域を有する(又はそれらからなる)。このシナリオにおいて、抗体はFc領域と、Fc領域のアミノ末端に3又はそれ以上の抗原結合部位を有しているであろう。ある実施態様では、多価抗体は3からおよそ8の抗原結合部位を有する。このような一実施態様では、多価抗体は4つの抗原結合部位を含む(又はそれらからなる)。多価抗体は少なくとも1つのポリペプチド鎖(例えば2つのポリペプチド鎖)を有し、ポリペプチド鎖(類)は2又はそれ以上の可変ドメインを有する。例えば、ポリペプチド鎖(類)はVD1-(X1)n-VD2-(X2)n-Fcを有し、ここでVD1は第1の可変ドメインであり、VD2は第2の可変ドメインであり、FcはFc領域のポリペプチド鎖の一つであり、X1及びX2はアミノ酸又はポリペプチドを表し、nは0又は1である。例えば、ポリペプチド鎖(類)は：VH-CH1-柔軟なリンカー-VH-CH1-Fc領域鎖；又はVH-CH1-VH-CH1-Fc領域鎖を有し得る。ここで多価抗体は、少なくとも2つ(例えば4つ)の軽鎖可変ドメインポリペプチドをさらに有してもよい。ここで多価抗体は、例えば約2～約8の軽鎖可変ドメインポリペプチドを有する。ここで考察される軽鎖可変ドメインポリペプチドは軽鎖可変ドメインを有し、場合によってはCLドメインを更に有する。

10

【0171】

7. 単一のドメイン抗体

20

いくつかの実施態様では、本発明の抗体は単一のドメイン抗体である。単一のドメイン抗体は、抗体のすべてないしは一部の重鎖可変ドメイン又はすべてないしは一部の軽鎖可変ドメインを含んでなる単一ポリペプチドである。ある実施態様では、単一のドメイン抗体は、ヒトの単一のドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, MA; 例として米国特許第6248516号B1を参照)。一実施態様では、単一のドメイン抗体は、抗体のすべてないしは一部の重鎖可変ドメインからなる。

【0172】

8. 抗体変異体

いくつかの実施態様では、ここに開示する抗体のアミノ酸配列の修飾を考える。例えば、抗体の結合親和性及び/又は生物学的特性を向上することができれば望ましい。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードする核酸に適切な変化を導入して、又はペプチド合成により調製される。そのような修飾は、抗体のアミノ酸配列内の残基の、例えば、欠失型、又は挿入或いは置換を含む。最終構成物が所望する特徴を有していれば、欠失、挿入又は置換をどのように組合せてもよい。アミノ酸変化は、配列ができるときに被検体の抗体アミノ酸配列に導入されうる。

30

突然変異誘発に好ましい位置である抗体の特定の残基又は領域の同定に有益な方法は、Cunningham及びWellsによりScience, 244:1081-1085 (1989年)に開示されているように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。ここで、標的となる残基又は残基の組が同定され(例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電した残基)、中性の、又は負に荷電したアミノ酸(例えばアラニン又はポリアラニン)で置換され、アミノ酸の抗原との相互作用に影響を与える。次いで、置換に対する機能的感受性を示しているそれらアミノ酸位置を、置換の部位において、又は置換の部位のために、さらなる、又は他の変異体を導入することにより精製する。このように、アミノ酸配列変異体を導入する部位は予め決定されるが、突然変異自体の性質は予め決定する必要は無い。例えば、任意の部位における突然変異の機能を分析するために、標的コドン又は領域においてalaスキャニング又はランダム突然変異誘発を実行し、発現した免疫グロブリンを所望の活性についてスクリーニングする。

40

【0173】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100以上の残基を有するポリペプチドまでの長さ

50

ノ酸残基の配列内挿入を含む。末端挿入の例には、N - 末端メチオニル残基を持つ抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させるポリペプチド又は(例えば A D E P T のための)酵素の抗体の N - 末端又は C - 末端への融合が含まれる。

ある実施態様では、本発明の抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は低減するために変更する。ポリペプチドのグリコシル化は、典型的には、N 結合又は O 結合の何れかである。N 結合とは、アスパラギン残基の側鎖への炭水化物部分の結合を意味する。アスパラギン-X-セリン及びアスパラギン-X-スレオニン(ここで X はプロリンを除く任意のアミノ酸)のトリペプチド配列は、アスパラギン側鎖への糖鎖部分の酵素的結合のための認識配列である。従って、ポリペプチド中にこれらのトリペプチド配列の何れかが存在すると、潜在的なグリコシル化部位が作出される。O 結合グリコシル化は、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリン又はスレオニンに、糖類 N-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、又はキシロースの一つが結合することを意味するが、5-ヒドロキシプロリン又は 5-ヒドロキシリジンもまた用いられる。

【0174】

抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、アミノ酸配列を、一又は複数の上述したトリペプチド配列(N 結合グリコシル化部位のもの)が作られるか又は除かれるように変化させることによって簡便に達成される。該変化は、元の抗体の配列への一又は複数のセリン又はスレオニン残基の付加、又はこれによる置換によってもなされる(O-結合グリコシル化部位の場合)。

抗体が Fc 領域を含有する場合、それに接着する炭水化物を変更してもよい。例えば、抗体の Fc 領域に接着するフコースを欠損する成熟炭水化物構造の抗体は、米国公開特許第 2003/0157108 号(Presta, L.)に記載される。米国公開特許第 2004/0093621 号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)も参照のこと。抗体の Fc 領域に接着した炭水化物内の N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)を二分する抗体は、国際公報第 03/011878 号、Jean-Mairet 等、及び米国特許第 6602684 号、Umana 等に参照されている。抗体の Fc 領域に接着するオリゴサッカライド内の少なくとも一のガラクトース残基を有する抗体は、国際公報第 97/30087 号、Patel 等に報告される。また、抗体の Fc 領域に接着する変更された炭水化物を有する抗体については、国際公報第 98/58964 号(Raju, S.)及び国際公報第 99/22764 号(Raju, S.)も参照のこと。また、修飾されたグリコシル化を有する抗原結合分子については、米国公開特許第 2005/0123546 号(Umana 等)を参照。

【0175】

ある実施態様では、グリコシル化変異体は Fc 領域を含有し、Fc 領域に接着される炭水化物構造はフコースを欠いている。このような変異形は改善された ADC C 機能を有する。場合によって、Fc 領域は、更に ADC C を改善する一つ以上のアミノ酸置換、例えば Fc 領域の位置 298、333 及び / 又は 334 の置換(Eu 残基番号付け)を更に含む。「脱フコース化」又は「フコース欠失」抗体に関する文献の例には以下のものを含む：米国公開番号 2003/0157108；国際公報 2000/61739；国際公報 2001/29246；米国公開番号 2003/0115614；米国公開番号 2002/0164328；米国公開番号 2004/0093621；米国公開番号 2004/0132140；米国公開番号 2004/0110704；米国公開番号 2004/0110282；米国公開番号 2004/0109865；国際公報 2003/085119；国際公報 2003/084570；国際公報 2005/035586；国際公報 2005/035778；；国際公報 2005/053742；Okazaki 等 J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)；及び Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)。脱フコース化抗体を産生する細胞株の例として、タンパク質フコース化欠失 Lec13 CHO 細胞(Ripka 等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国公開番号 2003/0157108, Presta, L；及び国際公報 2004/056312, Adams 等、特に実施例 11)、及びノックアウト細胞株、例として -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、F

10

20

30

40

50

UT8,-ノックアウトCHO細胞 (Yamane-Ohnuki 等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004))などがある。

【0176】

一実施態様では、抗体が変更されてその血清半減期が改善される。抗体の血清半減期を増やすために、例えば米国特許第5739277号に記載のように、サルベージレセプター結合エピトープを抗体(特に抗体断片)に組み込んでもよい。本明細書中で用いる「サルベージレセプター結合エピトープ」なる用語は、IgG分子のインビボ血清半減期を増やす役割を担うIgG分子(例えばIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4)のFc領域のエピトープを指す(米国特許公開2003/0190311、米国特許第6821505号；米国特許第6165745号；米国特許第5624821号；米国特許第5648260号；米国特許第6165745号；米国特許第5834597号)。

他の型の変異体はアミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、抗体分子において少なくとも一つのアミノ酸残基に異なる残基が挿入されている。置換突然変異について関心ある部位は高度可変領域を含むが、FR交互変化も考慮される。保存的置換は、「好ましい置換」と題して表1に示す。これらの置換が生物学的活性の望ましい変化をもたらす場合、表1に「例示的置換」と名前を付けた又はアミノ酸の分類を参照して以下に更に記載するような、より実質的な変化を導入して、生成物をスクリーニングしてよい。

【0177】

表1

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン	Leu

10

20

30

【 0 1 7 8 】

抗体の生物学的性質における実質的な修飾は、(a)置換領域のポリペプチド骨格の構造、例えばシート又は螺旋配置、(b)標的部位の分子の電荷又は疎水性、又は(c)側鎖の高を維持するそれらの効果において実質的に異なる置換を選択することにより達成される。アミノ酸は、その側鎖の特性の類似性に従ってグループ化することができる(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))

:

- (1) 無極性 : Ala (A), Val (V), Leu (L), Ile (I), Pro (P), Phe (F), Trp (W), Met (M)
- (2) 無電荷極性 : Gly (G), Ser (S), Thr (T), Cys (C), Tyr (Y), Asn (N), Gln (Q)
- (3) 酸性 : Asp (D), Glu (E)
- (4) 塩基性 : Lys (K), Arg (R), His (H)

40

別法では、天然に生じる残基は共通の側鎖特性に基づいて群に分けてもよい :

- (1) 疎水性 : ノルロイシン、met、ala、val、leu、ile ;
- (2) 中性の親水性 : cys、ser、thr、asn、gln ;
- (3) 酸性 : asp、glu ;
- (4) 塩基性 : his、lys、arg ;
- (5) 鎖配向に影響する残基 : gly、pro ; 及び

50

(6) 芳香族 : trp、tyr、phe。

非保存的置換は、これらの分類の一つのメンバーを他の分類に交換することを必要とするであろう。このような置換された残基も、保存的置換部位か、残存する(非保存的)部位に、導入することができる。

【 0 1 7 9 】

ある型の置換変異体は、親抗体(例えば、ヒト化又はヒト抗体)の一又は複数の高頻度可変領域残基の置換を含む。一般的に、さらなる発展のために選択され、得られた変異体は、それらが作製された親抗体と比較して変更した(例えば向上した)生物学的特性を有している。そのような置換変異体を作製する簡便な方法は、ファージディスプレイを使用する親和性突然変異を含む。簡潔に言えば、幾つかの高頻度可変領域部位(例えば6 - 7部位)を突然変異させて各部位における全ての可能なアミノ酸置換を生成させる。このように生成された多価抗体は、繊維状ファージ粒子から、各粒子内に充填されたファージコートタンパク質の少なくとも一部(例えば、M 1 3の遺伝子I I I産物)への融合物としてディスプレイされる。ファージディスプレイ変異体は、ついで、それらの生物学的活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。修飾のための候補となる高頻度可変領域部位を同定するために、スキャンング突然変異誘発(例えばアラニンスキャンング)を実施し、抗原結合に有意に寄与する高頻度可変領域残基を同定することができる。別法として、又はそれに加えて、抗原-抗体複合体の結晶構造を分析して抗体と抗原の接点を特定するのが有利である場合もある。このような接触残基及び隣接残基は、ここに述べた技術を含む当分野で公知の技術に従う置換の候補である。そのような変異体が生成されると、変異体のパネルにここに記載する技術を含む当分野で公知の技術を用いてスクリーニングを施し、一又は複数の関連アッセイにおいて優れた特性を持つ抗体を更なる開発のために選択する。

【 0 1 8 0 】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、この分野で知られた種々の方法によって調製される。これらの方法は、限定するものではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された抗体の変異体又は非変異体のオリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製を含む。

本発明の抗体のFc領域内に一以上のアミノ酸修飾を導入してFc領域変異型を生成することが望ましい。Fc領域変異体は、ヒンジシステイン修飾を含む、一以上のアミノ酸位置でのアミノ酸修飾(例えば、置換)を有するヒトFc領域配列(例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域)を含みうる。

【 0 1 8 1 】

当分野での記載や教示に従って、ある実施態様では、本発明の抗体が野生型の対応抗体と比較して例えばFc領域内に一以上の変異を有することを考慮する。にもかかわらず、この抗体はその野生型対応物と比較して治療的有用性を示す実質的に同じ特徴を維持している。例えば、国際公開第99/51642号などに記載のようにC1q結合及び/又は補体依存性細胞障害(CDC)を変更する(すなわち改良又は減少する)結果となるFc領域内に特定の変異を生じさせることが考えられる。また、Fc領域変異型の他の例に関するDuncan & Winter Nature 322:738-40 (1988); 米国特許第5648260号; 米国特許第5624821号; 及び国際公開公報94/29351を参照。国際公開公報00/42072(Presta)及び国際公開公報2004/056312(Lowman)は、FcRへの結合が改善したか、減退した抗体変異体を開示している。これらの特許文献の内容は出典明記によって、本明細書に特別に組み込まれる。また、Shields等 J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)を参照のこと。半減期が増加して、胎児への母性IgGの移送を担う(Guyer等, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKim等, J. Immunol. 24:249 (1994))新生児Fcレセプター(FcRn)への結合が改善している抗体は、米国特許公開2005/0014934A1(Hinton等)に開示されている。これらの抗体は、FcRnへのFc領域の結合を向上させる一又は複数の置換を有するFc領域を含んでなる。Fc領域アミノ酸配列

10

20

30

40

50

が変更されて C 1 q 結合能力が増加したか減少したポリペプチド変異体は、米国特許第 6 1 9 4 5 5 1 号 B 1、国際公開公報 9 9 / 5 1 6 4 2 に開示される。これらの特許文献の内容は出典明記によって、本明細書に特別に組み込まれる。また、Idusogie 等 J. Immunol. 164: 4178-4184 (2000)を参照のこと。

【 0 1 8 2 】

一態様では、本発明は、F c 領域を含む F c ポリペプチドの境界面に修飾を含む抗体を提供する。この修飾はヘテロ二量体化を容易にする及び / 又は促進する。これらの修飾は第一 F c ポリペプチドに隆起 (protuberance)、そして第二 F c ポリペプチドに腔 (cavity) の導入を含み、この隆起は第 1 及び第 2 の F c ポリペプチドの複合体形成を促進するように腔に配置することができる。これらの修飾を有する抗体の生成方法は、例えば米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号に記載のように、当分野で公知である。

10

【 0 1 8 3 】

9 . 抗体誘導体

本発明の抗体は当該分野において知られ直ぐに利用できる更なる非タンパク質性部分を含むように更に修飾することができる。好ましくは、抗体の誘導体化に適した部分は水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定されるものではないが、ポリエチレングリコール (P E G)、エチレングリコール / プロピレングリコールのコポリマー、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1, 3-ジオキソラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキサン、エチレン / 無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸 (ホモポリマーかランダムコポリマー)、及びデキストラン又はポリ (n-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロリプロピレンオキシド / エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチレン化ポリオール (例えばグリセロール)、ポリビニルアルコール、及びそれらの混合物が含まれる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは水中におけるその安定性のために製造の際に有利であろう。ポリマーは任意の分子量であってよく、分枝状でも非分枝状でもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、一を超えるポリマーが結合する場合、それらは同じでも異なった分子でもよい。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び / 又はタイプは、限定されるものではないが、その抗体誘導体が定まった条件下での治療に使用されるかどうか、改善される抗体の特定の性質又は機能を含む考慮事項に基づいて決定することができる。

20

30

【 0 1 8 4 】

他の実施態様では、放射線に曝すことによって選択的に熱することができる非タンパク質性部分と抗体のコンジュゲートが提供される。一実施態様では、非タンパク質性部分は炭素ナノチューブである (Kam 等, Proc. Natl. Acad. Sci. 102: 11600-11605 (2005))。放射線はいずれの波長のものでよく、限定されるものではないが、通常の細胞に害を及ぼさないが、抗体-非タンパク質性部分に近位の細胞が死滅する温度にまで非タンパク質性部分を加熱する波長が含まれる。

【 0 1 8 5 】

抗体の作製方法

1 . ハイブリドーマベースの方法

本発明の抗 C D 2 2 モノクローナル抗体は、Kohler 等, Nature, 256:495 (1975) により最初に記載されたハイブリドーマ法を用いて作製でき、又は組換え D N A 法 (米国特許第 4 8 1 6 5 6 7 号) によって作製することができる。

40

ハイブリドーマ法においては、マウス又はその他の適当な宿主動物、例えばハムスターを免疫化し、免疫化に用いられるタンパク質と特異的に結合する抗体を生産するか又は生産することのできるリンパ球を誘導する。一般的に、C D 2 2 への抗体は、C D 2 2 とアジュバントを複数回皮下 (s c) 又は腹腔内 (i p) に注射することにより動物内に生じる。C D 2 2 は当分野で公知の方法を用いて調製されうる。その方法のいくつかは本明細書中でさらに記載される。例えば、C D 2 2 は組み換えて産生されてもよい。一実施態様では、動物を、免疫グロブリン重鎖の F c 部位に融合した C D 2 2 の細胞外ドメイン (E C D)

50

を含有するCD22の誘導体で免疫化する。一実施態様では、動物を、CD22-IgG1融合タンパク質で免疫化する。一実施態様では、動物は、一リン酸化リポドA(MPL)/トレハロースジクリノミコレート(trehalose dicrynomycolate)(TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)により溶液中のCD22の免疫原性誘導体にて免疫化され、該溶液は複数の部位の皮下に注射される。2週後に、動物を追加免疫する。7~14日後、動物から採血して、血清を抗CD22力価について検定する。力価がプラトーになるまで動物を追加免疫する。

【0186】

別法として、リンパ球をインビトロで免疫することもできる。次に、リンパ球を、ポリエチレングリコールのような適当な融剤を用いて骨髓腫細胞と融合させ、ハイブリドーマ細胞を形成する(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。

このようにして調製されたハイブリドーマ細胞を、適当な培養培地、例えば融合していない親の骨髓腫細胞の増殖又は生存を阻害する一又は複数の物質を含む培地に播き、増殖させる。例えば、親の骨髓腫細胞が酵素ヒポキサンチンデアニジンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRT又はHPRRT)を欠失するならば、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPRT欠失細胞の増殖を妨げる物質であるヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジン含有するであろう(HAT培地)。

【0187】

ある実施態様では、骨髓腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベルの生産を支援し、HAT培地のような培地に対して感受性である細胞である。例示的な骨髓腫株化細胞には、限定するものではないが、マウス骨髓腫系、例えば、ソーク・インスティテュート・セル・ディストリビューション・センター、San Diego, California USAから入手し得るMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、及びアメリカ培養細胞系統保存機関、Rockville, Maryland USAから入手し得るSP-2又はX63-Ag8-653細胞から誘導されたものが含まれる。ヒト骨髓腫及びマウス-ヒトヘテロ骨髓腫株化細胞もまたヒトモノクローナル抗体の産生のために開示されている(Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, 51-63頁(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

ハイブリドーマ細胞が生育している培地を、CD22に結合するモノクローナル抗体の産生についてアッセイする。好ましくは、ハイブリドーマ細胞により産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降又はインビトロ結合検定、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)又は酵素結合免疫吸着検定(ELISA)によって測定する。

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えばMunsonほか, Anal. Biochem., 107:220 (1980)のスキッチャード分析法によって測定することができる。

所望の特異性、親和性、及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が確定された後、該クローンを限界希釈法によりサブクローニングし、標準的な方法により増殖させることができる(Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986))。この目的に対して好適な培地には、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地が含まれる。加えて、該ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。サブクローンにより分泌されたモノクローナル抗体は、例えばプロテインA-SEPHAROSE、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、又はアフィニティークロマトグラフィーのような常套的な免疫グロブリン精製法により、培地、腹水、又は血清から好適に分離される。

【0188】

2. ある一つのライブラリスクリーニング法

本発明の抗CD22抗体は、所望の活性(一又は複数)を有する抗体についてスクリーニングするためにコンビナトリアルライブラリを用いて作製することができる。例えば、ファージディスプレイライブラリを生成して、所望の結合特性を有する抗体についてこのライブラリをスクリーニングするためには当分野で様々な方法が公知である。このような方

10

20

30

40

50

法は、一般にMethods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等, ed., Human Press, Totowa, NJ)のHoogenboom等 (2001)に、ある実施態様では、Lee等 (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093に記載される。

原則として、合成抗体クローンを、ファージコートタンパク質と融合した抗体可変領域 (Fv)の種々の断片を表示するファージを有するファージライブラリをスクリーニングすることによって選択される。このようなファージライブラリは、所望される抗原に対するアフィニティークロマトグラフィーによって選別される。所望される抗原と結合することができるFv断片を発現するクローンは抗原へ吸収され、それによって、ライブラリの非結合クローンから分離される。次いで、この結合クローンは、抗原から溶出させることが可能であり、抗原吸収/溶出の付加的サイクルによってさらに濃縮することができる。本発明の任意の抗CD22抗体は、興味の対象であるファージクローンを選択するために適切な抗原スクリーニング手法を設計し、続いて、興味の対象であるファージクローンからのFv配列、及びKabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3に記載の適切な定常領域 (Fc)配列を用いての全長抗CD22抗体クローンの構築によって得ることができる。

10

【0189】

ある実施態様では、抗体の抗原結合ドメインは、約110アミノ酸の2つの可変(V)領域である軽(VL)及び重(VH)鎖で形成され、その双方には、3つの高頻度可変ループ (HVR)又は相補鎖決定領域(CDR)が存在する。可変ドメインは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように、VH及びVLが短くて柔軟なペプチドを介して共有結合している一本鎖Fv(scFv)断片として、又は定常ドメインと融合して非共有的に相互作用しているFab断片のいずれかとしてファージ上に機能的に表示することができる。ここで用いられているように、scFvコード化ファージクローン、及びFabコード化ファージクローンは、総称して「Fvファージクローン」又は「Fvクローン」と呼ぶ。

20

VH及びVL遺伝子のレパートリーを、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって分離してクローンし、ファージライブラリにおいてランダムに組み換えられることが可能であり、それは、Winter等, Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455(1994)に記載のように抗原結合クローンについて探索することが可能である。免疫化したソースからのライブラリは、ハイブリドーマを構成する必要がなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、天然レパートリーをクローニングして、Griffiths等, EMBO J, 12: 725-734(1993)に記載のようにどんな免疫化もせずに、幅広い非自己及びまた自己抗原に対するヒト抗体の単一のソースを提供することが可能である。最終的には、天然ライブラリは、また、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、幹細胞からの再配列されていないV遺伝子セグメントをクローニングし、及びランダム配列を有するPCRプライマーを利用して高度可変CDR3領域をコードし、インビトロでの再配列を完成させることによって合成的に作製することができる。

30

【0190】

ある実施態様では、繊維状ファージは、マイナーコートタンパク質pIIIへの融合によって、抗体断片を表示するのに用いられる。この抗体断片は、一本鎖Fv断片として表示することが可能であり、そのVH及びVLドメインは、例えば、Marks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載のような、又は、例えば、Hoogenboom等, Nucl. Acids. Res., 19: 4133-4137(1991)に記載のような、1つの鎖はpIIIと融合し、もう一方の鎖は、幾つかの野生型コートタンパク質を置換することによってファージ表面上に表示されるようになるFabコートタンパク質構造のアセンブリがある細菌宿主細胞のペリプラズムへ分泌されるFab断片のように、柔軟なポリペプチドスペーサーによって同じポリペプチド鎖上に連結されている。

40

一般的に、抗体遺伝子断片をコードする核酸は、ヒト又は動物から収集した免疫細胞から得られる。抗CD22クローンに有利になるように偏ったライブラリが望ましい場合に

50

は、検体をCD22で免疫化して抗体応答を生成させ、そして、脾臓細胞及び/又は他の末梢血リンパ球(PBL)である循環B細胞を、ライブラリ構築のために回収する。好ましい実施態様では、CD22免疫化により、CD22に対するヒト抗体を産生するB細胞が生じるように、抗CD22クローンに好ましいヒト抗体遺伝子断片ライブラリは、機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子アレイを有する(及び、機能的な内因性抗体産生系を欠く)トランスジェニックマウスにおける抗CD22抗体応答を生成することによって得られる。ヒト抗体産生トランスジェニックマウスの作製は以下に記載する。

【0191】

抗CD22反応細胞集団のさらなる濃縮は、適切なスクリーニング手法を利用してCD22特異的膜結合抗体を発現するB細胞を単離すること、例えば、CD22アフィニティークロマトグラフィーによる細胞分離、又は蛍光色素標識CD22への細胞の吸着とその後の蛍光標示式細胞分取器(FACS)によって得ることができる。

あるいは、非免疫化供与体からの脾臓細胞及び/又はB細胞又は他のPBLの利用によって可能性のある抗体レパートリーのより良い表示が提供され、また、CD22が免疫原ではない任意の動物(ヒト又は非ヒト)種を利用した抗体ライブラリの構築が可能となる。インビトロの抗体遺伝子コンストラクトを取り込むライブラリに関しては、幹細胞を被検体から収集して非再配列の抗体遺伝子セグメントをコードする核酸を提供する。対象の免疫細胞は、種々の動物種、例えばヒト、マウス、ラット、ウサギ目、オオカミ、犬科、ネコ科、ブタ、ウシ、ウマ、及びトリ種等から得ることができる。

【0192】

抗体可変遺伝子セグメント(VH及びVLセグメントを含む)をコードする核酸を、興味の対象の細胞から回収して増幅した。再配列したVH及びVL遺伝子ライブラリの場合では、その所望するDNAは、Orlandi等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989)に記載されているように、リンパ球からのゲノムDNA又はmRNAを単離し、再配列したVH及びVL遺伝子の5'及び3'末端と一致するプライマーによるポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行うことによって得ることが可能であり、よって発現のための多様なV遺伝子レパートリーを作製することができる。このV遺伝子は、Orlandi等, (1989)及びWard等, Nature, 341: 544-546(1989)に記載のように、成熟Vドメインをコードするエクソンの5'末端のバックプライマーとJセグメントに基づいた前方向プライマーにより、cDNA及びゲノムDNAから増幅することが可能である。しかしながら、cDNAからの増幅のためには、バックプライマーは、また、Jones等, Biotechnol., 9:88-89(1991)に記載のようにリーダーエクソンに、前方向プライマーは、Sastry等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 86:5728-5732(1989)に記載のように定常領域内に基づくことが可能である。相補性を最大にするために、Orlandi等(1989)又はSastry等(1989)に記載のように、縮重をプライマーへ取り込むことが可能である。ある実施態様では、例えば、Marks等, J. Mol. Biol., 222: 581-597(1991)の方法に記載のように、又はOrum等, Nucleic Acids Res., 21: 4491-4498(1993)の方法に記載のように、免疫細胞の核酸試料に存在するすべての入手可能なVH及びVL配列を増幅するために、各V遺伝子ファミリーを標的にしたPCRプライマーを用いて、そのライブラリの多様性を最大にする。発現ベクターへの増幅DNAのクローニングに関しては、希な制限部位を、Orlandi等(1989)に記載のように、又はClackson等, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにタグ付加したプライマーによるさらなるPCR増幅によって、PCRプライマー内の1つの末端ヘタグとして導入することができる。

【0193】

合成的に再配列したV遺伝子のレパートリーは、V遺伝子セグメントからインビボで誘導することができる。殆どのヒトVH遺伝子セグメントはクローニング及び配列決定(Tomlinson等, J. Mol. Biol. 227: 776-798(1992)に報告されている)、そしてマッピングがされている(Matsudaら, Nature Genet., 3: 88-94(1993)); これらクローニングされたセグメント(H1及びH2ループのすべての主要なコンホメーションを含む)は、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)に記載のように、多様な配列と長さのH

10

20

30

40

50

3ループをコードするPCRプライマーによる多様なVH遺伝子レパートリーを作製するのに用いられる。VHレパートリーは、また、Barbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461(1992)に記載されているように、単一の長さの長いH3ループに焦点を合わせたすべての配列多様性をともなって作製することができる。ヒトV_H及びV_Hセグメントはクローニング及び配列決定がなされ(Williams及びWinter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461(1993))、合成軽鎖レパートリーを作製するのに利用することができる。VH及びVLフォールドの範囲及びL3及びH3の長さに基づく合成的V遺伝子レパートリーは、相当に構造的多様性を有する抗体をコードする。DNAをコードするV遺伝子の増幅に続いて、生殖系のV遺伝子セグメントは、Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol. 227: 381-388(1992)の方法に従ってインビトロで再配列することができる。

10

【0194】

抗体断片のレパートリーは、幾つかの方法でVH及びVL遺伝子レパートリーを共に組み合わせることによって構築することができる。各レパートリーを異なるベクターで作製し、そのベクターを、例えばHogrefe等, Gene, 128: 119-126(1993)に記載のようにインビトロで、又はコンビナトリアル・インフェクション、例えばWaterhouse等, Nucl. Acid Res., 21: 2265-2266(1993)に記載のloxP系によってインビボで作製することが可能である。このインビボの組み換え手法では、大腸菌の形質転換効率によって強いられるライブラリの大きさの限界を克服するために、二本鎖種のFabフラグメントが利用される。ナタイプのVH及びVLレパートリーは、1つはファージミドへ、そして他はファージベクターへと個別にクローニングされる。この2つのライブラリは、その後、各細胞が異なる組み合わせを有し、そのライブラリの大きさが、存在する細胞の数(約 10^{12} クローン)によってのみ限定されるように、ファージミド含有細菌のファージ感染によって組み合わせられる。双方のベクターは、VH及びVL遺伝子が単一のレプリコンへ組み換えられ、ファージピリオンへ共にパッケージされるように、インビボの組み換えシグナルを有する。これら巨大なライブラリは、良好な親和性(約 10^{-8} Mの K_d^{-1})の多くの多様な抗体を提供する。

20

別法として、このレパートリーは、例えばBarbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7978-7982(1991)に記載のように同じベクターへ連続してクローニング、又は、Clackson等, Nature, 352: 624-628(1991)に記載のようにPCR後に、クローニングすることでアセンブリすることができる。PCRアセンブリは、また、柔軟なペプチドスパーサーをコードしているDNAとVH及びVL DNAを連結させて、単鎖のFv(scFv)レパートリーを形成することに利用することができる。さらに他の技術では、「細胞内でのPCRアセンブリ」は、Embleton等, Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837(1992)に記載のように、PCRによってリンパ球内のVH及びVL遺伝子を組み合わせ、その後、連結した遺伝子のレパートリーをクローニングするのに利用される。

30

【0195】

ナタイプのライブラリ(天然又は合成のいずれか)によって産生された抗体は中度の親和性(約 $10^6 \sim 10^7$ M⁻¹の K_d^{-1})である可能性があるが、Winterら(1994)、上掲に記載のように第二番目のライブラリから構築して遊離することによって、親和性成熟をインビトロで模倣することが可能である。例えば、Hawkins等, J. Mol. Biol. 226: 889-896(1992)の方法、又はGram等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 3576-3580(1992)の方法においてエラー・プローンポリメラーゼ(Leung等, Technique, 1:11-15(1989)で報告されている)を利用することによって、突然変異をインビトロでランダムに導入することができる。さらには、1つ又はそれより多いCDRをランダムに変異させることによって、例えば、選択した個々のFvクローンにおいて、対象のCDRまで及ぶランダム配列を有するプライマーによるPCRを利用して、そしてより高い親和性クローンをスクリーニングすることで親和性成熟をおこなうことが可能である。国際公開第9607754号(1996年3月14日に公開)は、免疫グロブリン軽鎖の相補性決定領域へ突然変異生成を誘導して軽鎖遺伝子のライブラリを作製する方法を記載している。その他の有効な手法は、Marks等, Biotechnol. 10: 779-783(1992)に記載のように、非免疫化供与体から得られた

40

50

天然で発生するVドメイン変異体のレパートリーによるファージディスプレイによって選択されたVH又はVLドメインを組み換えること、及び数回のチェーン・シャッフリングにおいてより高い親和性についてスクリーニングすることである。この技術は、 10^{-9} Mの範囲の親和性の抗体及び抗体断片の産生を可能にする。

ライブラリのスクリーニングは当分野で公知の様々な技術によって達成されうる。例えば、CD22は、吸収プレートのウェルをコーティングするために利用すること、吸収プレートへ付着させた宿主細胞上で発現させるか又はセルソーティングで利用すること、又はストレプトアビジンでコーティングしたビーズによる捕獲のためにビオチンとコンジュゲートすること、又はファージディスプレイライブラリをパニングするためのあらゆる他の方法において利用することが可能である。

【0196】

吸着剤との少なくともファージ粒子の一部分の結合に適した条件下で、ファージライブラリの試料を固定化CD22と接触させる。通常は、pH、イオン強度、温度等を含む条件を選択して、生理学的条件を模倣する。固相と結合したファージを洗浄し、その後、例えばBarbas等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982(1991)に記載されているように酸で、又は例えばMarks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597(1991)に記載にされているようにアルカリで、又は例えばClackson等, Nature, 352: 624-628(1991)の抗原競合法に類似の手法であるCD22抗原競合によって溶出する。ファージは、1回目の選択で20~1000倍に濃縮することが可能である。さらには、この濃縮したファージを細菌培養液で生育させ、さらなる回の選択に供することが可能である。

選択の効率は多くの要因に依存し、それには、洗浄の間の解離の動力学、そして単一のファージ上の複数の抗体断片が同時に抗原と関わるかどうかということが含まれる。一次解離定数(及び弱い結合親和性)を有する抗体は、短い洗浄、多価ファージディスプレイ及び固相の抗原の高いコーティング密度の利用によって保持することが可能である。高い密度は、多価相互作用を介してファージを安定化するだけでなく、解離したファージの再結合に有利に作用する。遅い解離動力学(及び良好な結合親和性)を有する抗体の選択は、Bass等, Proteins, 8: 309-314(1990)及び国際公開第92/09690号に記載されているような長い洗浄と単価ファージディスプレイの利用、そしてMarks等, Biotechnol., 10: 779-783(1992)に記載されているような抗原の低度のコーティング密度によって促進することが可能である。

【0197】

親和性に僅かな違いがあったとしても、CD22に対する異なる親和性のファージ抗体の中で選択することは可能である。しかしながら、選択した抗体のランダム変異(例えば、幾つかの親和性成熟の技術で行われているような)は、多くの変異を生じやすく、その殆どが抗原と結合し、僅かがより高い親和性である。CD22を限定すると、希な高い親和性のファージが競合して除かれることが可能である。すべてのより高い親和性の変異を保持するために、ファージは、過度のビオチン化CD22とインキュベートすることが可能であるが、CD22に対する標的モル濃度親和定数よりも低いモル濃度のビオチン化CD22とインキュベートできる。次いで、高親和性結合ファージをストレプトアビジンでコーティングした常磁性体ビーズによって捕獲することが可能である。そのような「平衡捕獲」は、結合の親和性に従い、親和性の低い過度のファージから、僅かに2倍高い親和性の変異体クローンの単離を可能にする感度で抗体を選択することを可能にする。固相と結合したファージを洗浄するのに用いる条件を操作して、解離定数を基礎として識別することも可能である。

抗CD22クローンは活性を元を選択されうる。ある実施態様では、本発明は、CD22を天然に発現する生細胞に結合する抗CD22抗体を提供する。一実施態様では、本発明は、CD22リガンドとCD22との結合をブロックするが、CD22リガンドと第二タンパク質との結合をブロックしない抗CD22抗体を提供する。このような抗CD22抗体に対応するFvクローンは、(1)上記のようなファージライブラリから抗CD22クローンを単離して、場合によって、好適な宿主細胞で個体集団を成長させることによって

、ファージクローンの単離した母集団を増幅する、(2) 望ましいブロック活性及び非ブロック活性のそれぞれについてCD22と第二タンパク質を選択する、(3) 固定されたCD22に抗CD22ファージクローンを吸着する、(4) 過剰量の第二タンパク質を用いて、第二タンパク質の結合決定基と共有するかオーバーラップするCD22-結合決定基を認識する任意の望ましくないクローンを溶出する、そして、(5) 工程(4)の後に吸着されたまま残ったクローンを溶出する、ことによって選別できる。場合によって、所望のブロック/非ブロック特性を有するクローンを、本明細書に記載の選別手順を一又は複数回繰り返すことによって、さらに濃縮できる。

【0198】

ハイブリドーマ由来のモノクローナル抗体をコードするDNA又は本発明のファージディスプレイFvクローンは、常法を用いて(例えば、ハイブリドーマの対象の領域をコードする重鎖及び軽鎖又はファージDNA鑄型を特異的に増幅するように設定したオリゴヌクレオチドプライマーを用いることにより)即座に分離されて、配列決定される。ひとたび分離されたならば、DNAを発現ベクター中に入れ、ついでこれを、この状況以外では抗体タンパク質を産生しない大腸菌細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は骨髓腫細胞のような宿主細胞中に形質移入し、組換え宿主細胞におけるモノクローナル抗体の合成を獲得することができる。抗体をコードするDNAの細菌での組み換え発現に関する概説論文には、Skerra等, *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262(1993)及びPluckthun, *Immunol. Revs.* 130: 151-188(1992)が含まれる。

本発明のFvクローンをコードするDNAは、重鎖及び/又は軽鎖定常領域をコードする公知のDNA配列(例えば好適なDNA配列は上掲のカバット等から得ることができる)と組み合わせて、完全長ないし一部の重鎖及び/又は軽鎖をコードするクローンを形成できる。このために、何れかのアイソタイプの定常領域、例えばIgG、IgM、IgA、IgD及びIgE定常領域を用いることができることが理解されるであろう。このような定常領域は任意のヒト又は動物種から得ることができる。ある動物(例えばヒト)種の可変ドメインDNAから得て、次いで「ハイブリッド」である完全長重鎖及び/又は軽鎖のコード配列を形成するために他の動物種の定常領域DNAに融合したFvクローンは、本明細書で用いられる「キメラ」及び「ハイブリッド」抗体の定義に含まれる。ある実施態様では、ヒト可変DNAから得たFvクローンをヒト定常領域DNAに融合して、完全長ないし一部のヒト重鎖及び/又は軽鎖のコード配列を形成する。

【0199】

また、本発明のハイブリドーマ由来の抗CD22抗体をコードするDNAは、例えば、ハイブリドーマクローン由来の相同的マウス配列の代わりにヒト重鎖及び軽鎖定常ドメインのコード化配列を置換すること(例えばMorrison等, *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 81:6851(1984)の方法)によって修飾することができる。ハイブリドーマ又はFvクローン由来の抗体ないし抗体断片をコードするDNAは、免疫グロブリンコード化配列に非免疫グロブリンポリペプチドのコード化配列の全て又は一部を共有結合させることによってさらに修飾することができる。そのように、「キメラ」又は「ハイブリッド」抗体は、本発明のFvクローン又はハイブリドーマクローン由来の抗体の結合特異性を有するように調製される。

【0200】

3. ベクター、宿主細胞及び組換え方法

本発明の抗体の組み換え生成のために、コードする核酸を単離して、更なるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために複製ベクターに挿入する。抗体をコードするDNAは従来の手順で簡単に単離し、配列決定される(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いて)。多くのベクターが利用可能である。用いる宿主細胞にある程度依存してベクターを選択する。一般的に、宿主細胞は原核生物又は真核生物(一般的に哺乳動物)由来の細胞である。IgG、IgM、IgA、IgD及びIgE定常領域を含め、任意のアイソタイプの定常領域がこの目的のために使われてもよく、このような定常領域はヒト又は動物種の何れかから得

られうることは理解されるであろう。

【0201】

原核生物の宿主細胞を用いた抗体生成
ベクターの構築

本発明の抗体のポリペプチド成分をコードしているポリヌクレオチド配列は標準的な組換え技術を使用して得ることができる。所望のポリヌクレオチド配列はハイブリドーマ細胞のような抗体産生細胞から単離し配列決定することができる。あるいは、ポリヌクレオチドはヌクレオチド合成機又はPCR法を使用して合成することができる。ひとたび得られると、ポリペプチドをコードしている配列は原核生物宿主中で異種ポリヌクレオチドを複製し、発現することが可能な組換えベクター中に挿入される。当該分野において入手でき知られている多くのベクターを本発明の目的のために使用することができる。適切なベクターの選択は、主として、ベクターに挿入される核酸のサイズとベクターで形質転換される特定の宿主に依存する。各ベクターは、機能(異種性ポリヌクレオチドの増幅又は発現ないしその両方)及び属する特定の宿主細胞への適合性に応じて、様々な成分を含む。一般的に、限定するものではないが、ベクター成分には複製起源、選択マーカー遺伝子、プロモータ、リボゾーム結合部位(RBS)、シグナル配列、異種性核酸挿入及び転写終末配列が含まれる。

10

【0202】

一般には、レプリコン及び宿主細胞と適合性のある種に由来するコントロール配列を含んでいるプラスミドベクターが、宿主細胞と関連して使用される。そのベクターは、通常、複製開始点並びに形質転換細胞において表現型の選択を提供可能なマーキング配列を有する。例えば、一般的に大腸菌は、大腸菌種由来のプラスミドであるpBR322を用いて形質転換する。pBR322はアンピシリン(Amp)及びテトラサイクリン(Tet)耐性のコード遺伝子を含んでいるため、形質転換細胞を容易に同定することができる。pBR322、その誘導体又は他の微生物プラスミド又はバクテリオファージも外来性タンパク質を発現する微生物によって使用可能なプロモータを含むか、含むように変更される。特定の抗体の発現に使用されるpBR322誘導体の例はCarter等の米国特許第5648237号に詳細に記載されている。

20

また、レプリコン及び宿主微生物と適合性のあるコントロール配列を含んでいるファージベクターを、これらの宿主との関連でトランスフォーミングベクターとして使用することができる。例えば、GEM.TM.-11のようなバクテリオファージを、大腸菌LE392のような感受性の宿主細胞を形質転換するために使用できる組換えベクターを作製する際に利用することができる。

30

【0203】

本発明の発現ベクターは各ポリペプチド成分をコードする2又はそれ以上のプロモータ-シストロン(翻訳単位)対を含みうる。プロモーターはその発現を調節するシストロンの上流(5')に位置している非翻訳配列である。原核生物のプロモーターは典型的には誘導性と構成的との二つのクラスのものがある。誘導性プロモーターは、例えば栄養分の有無又は温度の変化のような、培養条件の変化に応答してその調節下でシストロンの転写レベルを増大させるように誘導するプロモーターである。

40

様々な潜在的宿主細胞によって認識されるプロモータが非常にたくさん公知となっている。選択したプロモーターを、制限酵素消化によって供給源DNAからプロモータを除去し、本発明のベクター内に単離したプロモータを挿入することによって軽鎖又は重鎖をコードするシストロンDNAに作用可能に連結することができる。天然プロモーター配列と多くの異種プロモーターの双方を、標的遺伝子の増幅及び/又は発現を生じさせるために使用することができる。ある実施態様では、天然の標的ポリペプチドプロモーターと比較して、一般的に発現する標的遺伝子をより多く転写させ、効率をよくするので、異種プロモーターが有用である。

【0204】

原核生物宿主での使用に好適なプロモーターには、PhoAプロモーター、ガラクタ

50

マーゼ及びラクトースプロモーター系、トリプトファン(*trp*)プロモーター系及びハイブリッドプロモーター、例えば *tac* 又は *trc* プロモーターが含まれる。しかし、細菌中で機能性である他のプロモーター(例えば他の既知の細菌又はファージプロモーター)も好適である。そのヌクレオチド配列は発表されており、よって当業者は、任意の必要とされる制限部位を供給するリンカー又はアダプターを使用して標的軽鎖及び重鎖をコードするシストロンにそれらを作用可能に結合させることができる(Siebenlist等(1980) Cell 20:269)。

本発明の一態様では、組換えベクター内の各シストロンは、膜を貫通して発現されるポリペプチドの転写を誘導する分泌シグナル配列成分を含む。一般に、シグナル配列はベクターの成分でありうるか、ベクター中に挿入される標的ポリペプチドDNAの一部でありうる。この発明の目的のために選択されるシグナル配列は宿主細胞によって認識されプロセッシングされる(つまりシグナルペプチダーゼにより切断される)ものでなければならない。異種ポリペプチドに天然のシグナル配列を認識せずプロセッシングする原核生物宿主細胞に対しては、シグナル配列は、例えばアルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、Ippあるいは熱安定性エンテロトキシンII(STII)リーダー、LamB、PhoE、PelB、OmpA及びMBPからなる群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。一実施態様では、発現系の双方のシストロンに使用されるシグナル配列はSTIIシグナル配列又はその変異体である。

10

【0205】

他の態様では、本発明による免疫グロブリンは宿主細胞の細胞質内で産生されるので、各シストロン内に分泌シグナル配列の存在は必要でない。この点において、免疫グロブリン軽鎖及び重鎖は発現され、折り畳まれ、集合して細胞質内に機能的免疫グロブリンを形成する。ジスルフィド結合形成に好適な細胞質条件を示し、発現したタンパク質サブユニットを好適に折り畳み、集合することができる宿主系が存在する(例として大腸菌 *trxB* 系)。Proba及びPluckthun Gene, 159:203 (1995)。

20

また、本発明の抗体は、発現されるポリペプチド成分の量的な比を変更することにより、分泌されて適切に集合体化(アセンブル)される本発明の抗体の産出を最大化することができる発現系を用いても生成することができる。このような変更は、少なくとも部分的にはポリペプチド成分の翻訳強度を同時に変更することにより行われる。

【0206】

翻訳の強度を変更するための一つの技術は、Simmons等の米国特許第5840523号に開示されている。この方法は、シストロン内の翻訳開始領域(TIR)の変異体を利用する。任意のTIRについて、一連のアミノ酸又は核酸配列の変異体を一定の範囲の翻訳強度を有するように作製することができ、これにより特定の鎖に所望の発現レベルが得られるようにこの因子を調節する便利な手段が提供される。TIR変異体は、アミノ酸配列を変更しうるコドンの変化を起こす常套的な変異原性技術により生成することができる。特定の実施態様では、ヌクレオチド配列における変化はサイレントである。TIRにおける変更は、例えば、シャイン・ダルガノ配列の数又はスペーシングの変更、並びにシグナル配列の変更を含みうる。変異シグナル配列を生成するための一つの方法は、シグナル配列のアミノ酸配列を変更しない(つまり、変化がサイレントである)コード配列の始めに「コドンバンク」を生成することである。これは、各コドンの3番目のヌクレオチド位置を変更することにより達成することができる。さらに、いくつかのアミノ酸、例えばロイシン、セリン、及びアルギニンは、1番目及び2番目の位置を複数有しており、これによって前記バンクの作製が複雑になり得る。変異原性の方法は、Yansura等(1992)METHODS: A Companion to Methods in Enzymol. 4:151-158に詳細に記載されている。

30

40

一実施態様では、含有される各シストロンについて一定の範囲のTIR強度を有する一組のベクターを生成する。この限定された組により、各鎖の発現レベル、及び種々のTIR強度の組み合わせにおける所望の抗体産物の産出を比較することができる。TIR強度は、Simmons等による米国特許第5840523号に詳細に記載されているレセプター遺伝子の発現レベルを定量化することにより決定することができる。翻訳強度の比較に基づ

50

いて、所望の個々の T I R を選択し、本発明の発現ベクターコンストラクトと組み合わせる。

【 0 2 0 7 】

本発明の抗体を発現するのに適した原核生物宿主細胞には、古細菌及び真正細菌、例えばグラム陰性又はグラム陽性生物が含まれる。有用な細菌の例には、エシェリキア属(例えば大腸菌)、バシラス属(例えば枯草菌)、エンテロバクター属、シュードモナス種(例えば緑膿菌)、ネズミチフス菌、霊菌(*Serratia marcescans*)、クレブシエラ属、プロテウス属、赤痢菌、根粒菌、ビトレオシラ(*Vitreoscilla*)又はパラコッカス(*Paracoccus*)が含まれる。一実施態様では、グラム陰性菌が使用される。一実施態様では、大腸菌細胞が本発明の宿主として使用される。大腸菌株の例として、遺伝子型 W3110 fhuA (tonA) ptr3 lac Iq lacL8 ompT (nmpc-fepE) degP41 kanR を有する 3 3 D 3 株(米国特許第5,639,635号)を含む W3110 株 (Bachmann, Cellular and Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), 1190-1219頁 ; ATCC 寄託番号 27, 325) 及びその誘導体が含まれる。また、大腸菌 294 (ATCC 31,446), 大腸菌 B, 大腸菌 1 776 (ATCC 31,537) 及び大腸菌 RV308 (ATCC 31,608) など、他の株及びその誘導体も好適である。この例は限定的なものでなく例示的なものである。定義した遺伝子型を有する上記の何れかの細菌の誘導体の構築方法は当業者に公知であり、例として、Bass 等, Proteins , 8:309-314 (1990) に記載されている。一般的に、細菌細胞中でのレプリコンの複製能を考慮して適した細菌を選択することが必要である。p B R 3 2 2、p B R 3 2 5、p A C Y C 1 7 7、又は p K N 4 1 0 のようなよく知られたプラスミドを使用してレプリコンを供給する場合、例えば、大腸菌、セラシア属、又はサルモネラ種を宿主として好適に用いることができる。典型的に、宿主細胞は最小量のタンパク質分解酵素を分泌しなければならず、望ましくは更なるプロテアーゼインヒビターを細胞培養中に導入することができる。

10

20

【 0 2 0 8 】

抗体産生

上述した発現ベクターで宿主細胞を形質転換又は形質移入し、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードする遺伝子を増幅するのに適するように修飾された通常の栄養培地中で培養する。

形質転換とは、DNA を原核生物宿主中に導入し、その DNA を染色体外要素として、又は染色体組込みによって複製可能にすることを意味する。使用される宿主細胞に応じて、形質転換はそのような細胞に適した標準的技術を使用してなされる。塩化カルシウムを用いるカルシウム処理は実質的な細胞壁障害を含む細菌細胞のために一般に使用される。形質転換のための他の方法はポリエチレングリコール / DMSO を用いる。さらに別の方法はエレクトロポレーションである。

30

本発明のポリペプチドを生産するために使用される原核生物細胞は当該分野で知られ、選択された宿主細胞の培養に適した培地中で増殖させられる。好適な培地の例には、ルリア培地 (L B) プラス必須栄養分サプリメントが含まれる。ある実施態様では、培地は発現ベクターを含む原核生物細胞の増殖を選択的に可能にするために、発現ベクターの構成に基づいて選択される選択剤をまた含む。例えば、アンピシリンがアンピシリン耐性遺伝子を発現する細胞の増殖用培地に加えられる。

40

【 0 2 0 9 】

炭素、窒素及び無機リン酸源の他に任意の必要なサプリメントを、単独で、又は複合窒素源のような他のサプリメント又は培地との混合物として導入される適切な濃度で含有させられうる。場合によっては、培養培地はグルタチオン、システイン、シスタミン、チオグリコレート、ジチオエリトリール及びジチオトレイトールからなる群から選択される一又は複数の還元剤を含みうる。

原核生物宿主細胞は適切な温度で培養される。ある実施態様では、例えば、大腸菌の増殖に対しては、温度は約 2 0 から約 3 9 、約 2 5 から約 3 7 の範囲、又は約 3 0 である。培地の pH は、主として宿主生物に応じて、約 5 から約 9 の範囲の任意の pH

50

でありうる。ある実施態様では、大腸菌に対しては、pHは好ましくは約6.8から約7.4、又は約7.0である。

【0210】

本発明の発現ベクターに誘導性プロモータが用いられる場合、プロモータの活性に適する条件下でタンパク質発現を誘導する。本発明の一態様では、ポリペプチドの転写制御のためにPhoAプロモータが用いられる。したがって、形質転換した宿主細胞を誘導のためにリン酸限定培地で培養する。ある実施態様では、リン酸限定培地はC.R.A.P培地である(例として、Simmons等, *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147を参照)。様々な他の誘導因子は用いるベクターコンストラクトに応じて当業者に知りうるように用いてよい。

10

一実施態様では、発現された本発明のポリペプチドは宿主細胞の細胞膜周辺中に分泌され、そこから回収される。タンパク質の回収は、一般的には浸透圧ショック、超音波処理又は溶解のような手段によって典型的には微生物を破壊することを含む。ひとたび細胞が破壊されると、細胞片又は全細胞を遠心分離又は濾過によって除去することができる。タンパク質は、例えばアフィニティー樹脂クロマトグラフィーによって更に精製することができる。あるいは、タンパク質は培養培地に輸送しそこで分離することができる。細胞を培養物から除去することができ、培養上清は濾過され、生成したタンパク質の更なる精製のために濃縮される。発現されたポリペプチドを更に単離し、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法(PAGE)及びウェスタンブロットアッセイ法のような一般的に知られている方法を使用して同定することができる。

20

【0211】

本発明の一側面では、抗体産生は発酵法によって多量に受け継がれる。組換えタンパク質の生産には様々な大規模流加発酵法を利用することができる。大規模発酵は少なくとも1000リットルの容量、ある実施態様では約1000から100000リットルの容量である。これらの発酵槽は、酸素と栄養分、特にグルコース(好ましい炭素/エネルギー源)を分散させる攪拌翼を使用する。小規模発酵とは一般におよそ100リットル以下の容積で、約1リットルから約100リットルの範囲でありうる発酵槽での発酵を意味する。

発酵法では、タンパク質の発現の誘導は、典型的には、細胞が適切な条件下にて、初期定常期に細胞があるステージで、所望の密度、例えば約180-220のOD₅₅₀まで増殖したところで開始される。当該分野で知られ上述されているように、用いられるベクターコンストラクトに応じて、様々なインデューサーを用いることができる。細胞を誘導前の短い時間の間、増殖させてもよい。細胞は通常約12-50時間の間、誘導されるが、更に長い又は短い誘導時間としてもよい。

30

【0212】

本発明のポリペプチドの生産収量と品質を改善するために、様々な発酵条件を変更することができる。例えば、分泌される抗体ポリペプチドの正しい組み立てとフォールディングを改善するために、例えばDsbタンパク質(DsbA、DsbB、DsbC、DsbD及び/又はDsbG)又はFkpA(シャペロン活性を持つペプチジルプロピルシス、トランス-イソメラーゼ)のようなシャペロンタンパク質を過剰発現する更なるベクターを用いて宿主原核細胞を同時形質転換させることができる。シャペロンタンパク質は細菌宿主細胞中で生産される異種性タンパク質の適切な折り畳みと溶解性を容易にすることが実証されている。Chen等(1999) *J. Bio. Chem.* 274:19601-19605; Georgiou等, 米国特許第6083715号; Georgiou等, 米国特許第6027888号; Bothmann及びPluckthun(2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm及びPluckthun(2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie等(2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210。

40

発現された異種タンパク質(特にタンパク質分解を受けやすいもの)のタンパク質分解を最小にするために、タンパク質分解酵素を欠くある種の宿主株を本発明に用いることができる。例えば、原核生物宿主細胞株を改変して、プロテアーゼIII、OmpT、DegP、Tsp、プロテアーゼI、プロテアーゼMi、プロテアーゼV、プロテアーゼVI及び

50

その組合せのような既知の細菌プロテアーゼをコードしている遺伝子に遺伝子突然変異を生じさせることができる。幾つかの大腸菌プロテアーゼ欠損株が利用でき、例えば、上掲のJoly等(1998);Georgiou等, 米国特許第5264365号;Georgiou等, 米国特許第5508192号;Hara等(1996) Microbial Drug Resistance 2:63-72に記載されている。

ある実施態様では、タンパク質溶解性酵素を欠損した、一以上のシャペロンタンパク質を過剰発現するプラスミドで形質転換した大腸菌株を本発明の発現系の宿主細胞として用いる。

【0213】

抗体精製

一実施態様では、本明細書中で産生した抗体タンパク質は、更なるアッセイや使用のために実質的に均一である調製物を得るためにさらに精製される。当分野で公知の標準的なタンパク質精製方法を用いることができる。以下の方法は好適な精製手順の例である：免疫親和性又はイオン交換カラムによる分画化、エタノール沈降法、逆相HPLC、シリカ又はDEAEなどの陽性交換樹脂によるクロマトグラフィ、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、硫酸アンモニウム沈降法及び、例えばSephadex G-75を用いたゲル濾過法。

一態様では、固形層に固定したプロテインAを本発明の抗体産物の免疫親和性精製法に用いる。プロテインAは抗体のFc領域に高い親和性で結合する黄色ブドウ球菌から単離した41kDの細胞壁タンパク質である。Lindmark等(1983) J. Immunol. Meth. 62:1-13。プロテインAを固定した固形層は、ガラス又はシリカ表面、又は孔を調節したガラスカラム又はケイ酸カラムを含むカラムでありうる。ある方法では、カラムは非特異的な混入物の接着を防ぐ可能性があるグリセロールなどの試薬でコートされている。

精製の初めの工程では、上記に記載のように細胞培養物からの調製物をプロテインA固定固形層に適応し、プロテインAに対象とする抗体を特異的に結合させる。ついで、固形層を洗浄して、固形層に非特異的に結合した混入物を除去してもよい。最後に、対象とする抗体を溶出により固形層から除去する。

【0214】

真核生物の宿主細胞を用いた抗体の生成

一般的に、真核生物宿主細胞で用いるためのベクターは、以下の非限定的な成分の一以上を含む：シグナル配列、複製起点、一以上のマーカ遺伝子、エンハンサー因子、プロモータ及び転写終末因子。

【0215】

シグナル配列成分

真核生物の宿主細胞に用いるベクターは、シグナル配列あるいは成熟タンパク質あるいは対象とするポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有する他のポリペプチドを含んでもよい。選択された異種シグナル配列は宿主細胞によって認識され加工される(すなわち、シグナルペプチダーゼによって切断される)ものであってもよい。哺乳動物細胞での発現においては、哺乳動物のシグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば単純ヘルペスgDシグナルが利用できる。このような前駆体領域のDNAは、多価抗体をコードするDNAに読み取り枠を一致させて結合される。

【0216】

複製開始点

一般には、哺乳動物の発現ベクターには複製開始点成分は不要である。例えば、SV40開始点は典型的にはただ初期プロモーターを有しているために用いられる。

【0217】

選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択可能マーカーとも称される選択遺伝子を含む。典型的な選択遺伝子は、(a)アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキセートあるいはテトラサイクリンのような抗生物質あるいは他の毒素に耐性を与え、(b)必要があれば栄養

10

20

30

40

50

要求性欠陥を補い、又は(c)複合培地から得られない重要な栄養素を供給するタンパク質をコードする。

選択方法の一例では、宿主細胞の成長を抑止する薬物が用いられる。異種性遺伝子で首尾よく形質転換した細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を生産し、よって選択工程を生存する。このような優性選択の例は、薬剤ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

【0218】

哺乳動物細胞に適切な選択可能なマーカーの他の例は、抗体核酸を捕捉することのできる細胞成分を同定することを可能にするもの、例えばDHFR、チミジンキナーゼ、メタロチオネインI及びII、好ましくは、霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ等々である。

例えば、DHFR選択遺伝子によって形質転換された細胞は、先ず、DHFRの競合的アンタゴニストであるメトトリキセート(Mtx)を含む培地において形質転換物の全てを培養することで同定される。野生型DHFRを用いた場合の好適な宿主細胞は、DHFR活性に欠陥のあるチャイニーズハムスター卵巣(CHO)株化細胞である(例として、ATCC CRL-9096)。

あるいは、抗体をコードするDNA配列、野生型DHFRタンパク質、及びアミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)のような他の選択可能マーカーで形質転換あるいは同時形質転換した宿主細胞(特に、内在性DHFRを含む野生型宿主)は、カナマイシン、ネオマイシンあるいはG418のようなアミノグリコシド抗生物質のような選択可能マーカーの選択剤を含む培地中での細胞増殖により選択することができる。米国特許第4965199号を参照のこと。

【0219】

プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは通常は宿主生物体によって認識され対象のポリペプチド(例えば抗体)をコードする核酸に作用可能に結合しているプロモーターを含む。真核生物のプロモーター配列が知られている。例えば、実質的に全ての真核生物の遺伝子が、転写開始部位からおよそ25ないし30塩基上流に見出されるATリッチ領域を有している。多数の遺伝子の転写開始位置から70ないし80塩基上流に見出される他の配列は、Nが任意のヌクレオチドであるCNCAAT領域である。大部分の真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加に対するシグナルであるAATAA配列がある。ある実施態様では、これらの配列のいずれか又は全ては真核生物の発現ベクターに適切に挿入される。

【0220】

哺乳動物の宿主細胞におけるベクターからの転写は、例えば、ポリオーマウイルス、伝染性上皮腫ウイルス、アデノウイルス(例えばアデノウイルス2)、ウシ乳頭腫ウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス及びサルウイルス40(SV40)のようなウイルスのゲノムから得られるプロモーター、異種性哺乳動物プロモーター、例えばアクチンプロモーター又は免疫グロブリンプロモーター、熱ショックプロモーターによって、このようなプロモーターが宿主細胞系に適合し得る限り、調節される。

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルスの複製起点を更に含むSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII制限断片として簡便に得られる。ベクターとしてウシ乳頭腫ウイルスを用いて哺乳動物宿主中でDNAを発現させる系が、米国特許第4419446号に開示されている。この系の変形例は米国特許第4601978号に開示されている。また、単純ヘルペスウイルスからのチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒト-インターフェロンcDNAの発現を記載している、Reyes等、Nature 297:598-601 (1982)を参照。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復をプロモーターとして使用することができる。

10

20

30

40

50

【0221】

エンハンサーエレメント成分

より高等の真核生物によるこの発明の抗体をコードしているDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増強される。哺乳動物遺伝子由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、
-フェトプロテイン及びインスリン)。しかしながら、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーが用いられるであろう。例としては、複製起点の後期側のSV40エンハンサー(100 - 270塩基対)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後期側のポリオーマエンハンサー及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。また、真核生物プロモーターの活性化のためのエンハンサー要素を記載している、Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982)も参照のこと。エンハンサーは、抗体ポリペプチドコード配列の5'又は3'位でベクター中にスプライシングされうるが、一般にはプロモーターから5'位に位置している。

10

【0222】

転写終末成分

また、真核生物宿主細胞に用いられる発現ベクターは、典型的には、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列を含みうる。このような配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの5'、時には3'の非翻訳領域から一般に取得できる。これらの領域は、抗体をコードしているmRNAの非翻訳部分にポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。一つの有用な転写終結成分はウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号とそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

20

【0223】

宿主細胞の選択及び形質転換

ここに記載のベクター中のDNAをクローニングあるいは発現させるために適切な宿主細胞は、脊椎動物の宿主細胞を含む本明細書中に記載の高等真核生物細胞を含む。培養(組織培養)中での脊椎動物細胞の増殖は常套的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主株化細胞の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7, ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(293又は懸濁培養での増殖のためにサブクローン化された293細胞、Graham等, J. Gen. Virol., 36:59 (1977));ハムスター乳児腎細胞(BHK, ATCC CCL 10);チャイニーズハムスター卵巣細胞/ -DHFR(CHO, Urlaub等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980));マウスのセルトリ細胞(TM4, Mather, Biol. Reprod., 23:243-251 (1980));サルの腎細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザルの腎細胞(VERO-76, ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA, ATCC CCL 2);イヌ腎細胞(MDCK, ATCC CCL 34);パッファローラット肝細胞(BRL 3A, ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138, ATCC CCL 75);ヒト肝細胞(Hep G2, HB 8065);マウス乳房腫瘍細胞(MMT 060562, ATCC CCL 51);TRI細胞(Mather等, Annals N.Y. Acad. Sci., 383:44-68 (1982));MRC 5細胞;FS 4細胞;及びヒト肝癌株(Hep G2)である。

30

40

宿主細胞は、抗体生産のために上述の発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導し、形質転換体を選択し、又は所望の配列をコードしている遺伝子を増幅するために適切に修飾された常套的栄養培地で培養される。

【0224】

宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために用いられる宿主細胞は種々の培地において培養することができる。市販培地の例としては、ハム(Ham)のF10(シグマ)、最小必須培地((MEM), (シグマ)、RPMI-1640(シグマ)及びダルベッコの改良イーグル培地((DMEM), シグマ)が宿主細胞の培養に好適である。また、Ham等, Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等, Anal. Biochem. 102:255 (1980), 米国特許第4767704号;同46578

50

66号；同4927762号；同4560655号；又は同5122469号；国際公開第90/03430号；国際公開第87/00195号；又は米国再発行特許第30985号に記載された何れの培地も宿主細胞に対する培地として使用できる。これらの培地には何れもホルモン及び/又は他の成長因子(例えばインシュリン、トランスフェリン、又は表皮成長因子)、塩類(例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー(例えばH E P E S)、ヌクレオチド(例えばアデノシン及びチミジン)、抗生物質(例えば、GENTAMYCINTM薬)、微量元素(最終濃度がマイクロモル範囲で通常存在する無機化合物として定義される)及びグルコース又は等価なエネルギー源を必要に応じて補充することができる。任意の他の補充物質もまた当業者に知られている適当な濃度で含むことができる。培養条件、例えば温度、pH等々は、発現のために選ばれた宿主細胞について過去に用いられているものであり、当業者には明らかであろう。

【0225】

抗体の精製

組換え技術を用いる場合、抗体は細胞内で生成され、又は培地内に直接分泌される。抗体が細胞内に生成された場合、第1の工程として、宿主細胞が溶解された断片の何れにしても、粒子状の細片が、例えば遠心分離又は限外濾過によって除去される。抗体が培地に分泌された場合は、そのような発現系からの上清を、一般的には先ず市販のタンパク質濃縮フィルター、例えばAmicon又はPelliconの限外濾過装置を用いて濃縮してもよい。PMSFなどのプロテアーゼ阻害剤を上記の任意の工程に含めて、タンパク質分解を阻害してもよく、また抗生物質を含めて外来性の汚染物の成長を防止してもよい。

細胞から調製した抗体組成物は、例えば、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、及びアフィニティークロマトグラフィーを用いて精製でき、アフィニティークロマトグラフィーが従来技術である。アフィニティリガンドとしてのプロテインAの適合性は、抗体中に存在する免疫グロブリンFc領域の種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2、又は 4重鎖に基づく抗体の精製に用いることができる(Lindmark等, J. immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3に推奨されている(Guss等, EMBO J. 5: 16571575 (1986))。アフィニティリガンドが結合されるマトリクスはアガロースであってもよく、他の材料も使用可能である。孔制御ガラスやポリ(スチレンジビニル)ベンゼン等の機械的に安定なマトリクスは、アガロースで達成できるものより早い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体がC_H3ドメインを含む場合、Bakerbond ABXTM樹脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)が精製に有用である。イオン交換カラムでの分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカでのクロマトグラフィー、ヘパリンでのクロマトグラフィー、アニオン又はカチオン交換樹脂上でのSEPHAROSETMクロマトグラフィー(ポリアスパラギン酸カラム)、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿法も、回収される多価抗体に応じて利用可能である。

予備的精製工程に続いて、目的の抗体及び混入物を含む混合液を、例えばpH約2.5 - 4.5、好ましくは低塩濃度(例として、約0 - 0.25M塩)の溶出緩衝液を用いた低pH疎水性作用クロマトグラフィによってさらに精製してもよい。

一般に、研究、試験及び臨床において使用するための抗体を調製するために、上記の方法と一致しており、及び/又は当業者が対象の特定の抗体にふさわしいと思われる、様々な方法が当分野で確立されている。

【0226】

イムノコンジュゲート

また、本発明は、化学療法剤、薬剤、増殖阻害剤、毒素(例えば、細菌、糸状菌、植物又は動物由来の酵素活性毒素、又はその断片)、又は放射性同位体(すなわち放射性コンジュゲート)などの一又は複数の細胞毒性剤にコンジュゲートした本発明の何れかの抗CD22抗体を含む、イムノコンジュゲート(「抗体-薬剤コンジュゲート」又は「ADC」と交換可能に称される)を提供する。

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは抗CD22抗体と化学療法剤又は他の毒素とを含む。イムノコンジュゲートの生成に有用な化学治療薬を本明細書中(例えば、上記)に記載した。酵素活性毒素及びその断片も用いられてもよく、本明細書中に記載する。

ある実施態様では、イムノコンジュゲートは抗CD22抗体と一又は複数の小分子毒素、限定するものではないが、例えばカリケアマイシン、メイタンシノイド、ドラスタチン、アウロスタチン、トリコセン(trichothene)及びCC1065、及び毒性活性を有するこれら薬剤の誘導体などの小分子薬剤とを含む。このようなイムノコンジュゲートの例は以降にさらに詳細に検討される。

【0227】

1. 例示的なイムノコンジュゲート - 抗体薬剤コンジュゲート

本発明のイムノコンジュゲート(又は「抗体-薬剤コンジュゲート」(「ADC」))は、以下の式Iのものであり、任意のリンカー(L)を介して、一又は複数の薬剤部分(D)に抗CD22抗体がコンジュゲート(すなわち共有結合)しているものである。



したがって、抗CD22抗体は直接又はリンカーを介して薬剤にコンジュゲートしうる。式Iでは、pは抗体当たりの薬剤部分の平均数であり、例えば1抗体当たりおよそ1~およそ20の薬剤部分、ある実施態様では、抗体当たり1~およそ8の薬剤部分の範囲でありうる。

【0228】

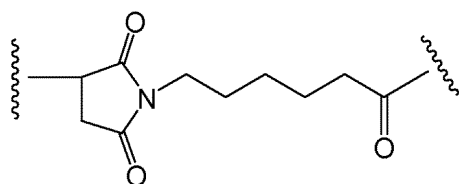
例示的なリンカー

例示的なリンカーと薬剤成分を本明細書中において開示する。リンカーは、一又は複数のリンカー成分を含む。例示的なリンカー成分には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」又は「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、及びN-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIAB」)が含まれる。様々なリンカー成分が当分野で公知であり、そのいくつかを以下に記載する。

リンカーは、細胞内での薬剤の放出を容易にする「切断可能なリンカー」でもよい。例えば、酸に弱いリンカー(例えばヒドラゾン)、プロテアーゼ感受性(例えばペプチダーゼ感受性)リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカー又はジスルフィド含有リンカー(Chari等, Cancer Research 52:127-131[1992]; 米国特許第5208020号)を使用してもよい。

【0229】

いくつかの実施態様では、リンカー成分は、抗体を他のリンカー成分又は薬剤部分に連結する「ストレッチャーユニット」を含んでもよい。例示的なストレッチャーユニットを以下に示す(波線は抗体への共有結合の部位を示す)。



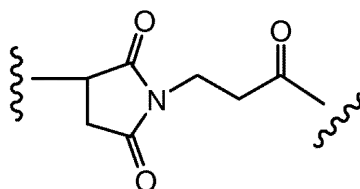
MC

10

20

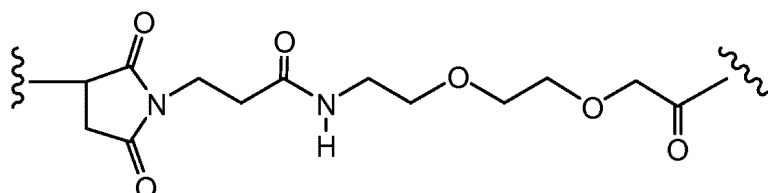
30

40



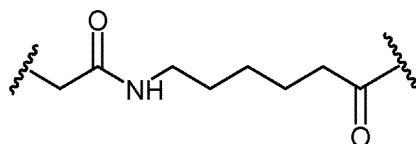
MP

10



MPEG

20



30

40

50

50

【0230】

いくつかの実施態様では、リンカーはアミノ酸ユニットを含みうる。そのような実施態様では、アミノ酸ユニットにより、プロテアーゼによるリンカーの切断が可能となり、それによってリソソーム酵素などの細胞内プロテアーゼへの曝露によってイムノコンジュゲートからの薬剤放出が促される。例としてDoronina等 (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784を参照。例示的なアミノ酸ユニットには、限定するものではないが、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドなどがある。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン(v c又はv a l - c i t)、アラニン-フェニルアラニン(a f又はa l a - p h e) ; フェニルアラニン-リジン(f k又はp h e - l y s) ; 又はN-メチル-バリン-シトルリン(M e - v a l - c i t)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン(g l y - v a l - c i t)及びグリシン-グリシン-グリシン(g l y - g l y - g l y)が含まれる。アミノ酸ユニットは、天然に生じるアミノ酸残基、並びに微量のアミノ酸及び非天然に生じるアミノ酸類似体、例えばシトルリンを含みうる。アミノ酸ユニットは設定され、特に酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD又はプラスミンプロテアーゼによる酵素的切断の選択性に最適化できる。

いくつかの実施態様では、リンカー成分は、直接又は、ストレッチャーユニット及び/又はアミノ酸ユニットにより、抗体を薬剤部分に連結する「スペーサー」ユニットを含みうる。スペーサーユニットは、「自己犠牲」又は「非自己犠牲」であってもよい。「非自己犠牲」のスペーサーユニットは、ADCの酵素的な(例えばタンパク質分解性の)切断によりスペーサーユニットの一部又はすべてが薬剤部分に結合したままとなるものである。非自己犠牲のスペーサーユニットの例には、限定するものではないが、グリシンスペーサーユニット及びグリシン-グリシンスペーサーユニットが含まれる。また、配列特異的な酵素的切断の影響を受けるペプチド性スペーサーの他の組合せも考慮される。例えば、グリシン-グリシンスペーサーユニットを含有するADCの腫瘍細胞関連のプロテアーゼによる酵素切断によって、残りのADCからグリシン-グリシン-薬剤部分が放出されるであ

ろう。そのような実施態様では、グリシン-グリシン-薬剤部分は腫瘍細胞の異なる加水分解処理を受け、それによってグリシン-グリシン Spacer ユニットの薬剤部分から分離する。

【0231】

「自己犠牲」のSpacerユニットは、異なる加水分解処理を経ずに薬剤部分を放出させる。ある実施態様では、リンカーのSpacerユニットはp-アミノベンジルユニットが含まれる。このような実施態様では、p-アミノベンジルアルコールはアミド結合によりアミノ酸ユニットに結合し、カルバメート、メチルカルバメート又はカルボネートがベンジルアルコールと細胞障害性剤との間に作られる。例としてHamann等 (2005) Expert Opin. Ther. Patents (2005) 15:1087-1103を参照。一実施態様では、Spacerユニットはp-アミノベンジロキシカルボニル(PAB)である。ある実施態様では、p-アミノベンジルユニットのフェニレン部分はQ_mに置き換えられ、このQは-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、そしてmは0~4の範囲の整数である。さらに、自己犠牲のSpacerユニットの例には、限定するものではないが、p-アミノベンジルアルコールに電子工学的に類似している芳香族化合物(例として米国特許公開第2005/0256030号A1を参照)、例えば2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(Hay等 (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)及びオルソ-ないしはパラ-アミノベンジルアセタール類が含まれる。アミド結合加水分解により環化されるSpacer、例として、置換されたないしは置換されていない4-アミノ酪酸アミド類(Rodrigues等, Chemistry Biology, 1995, 2, 223); 適切に置換されたビスクロ[2.2.1]及びビスクロ[2.2.2]環システム(Storm,等, J. Amer. Chem. Soc., 1972, 94, 5815); 及び、2-アミノフェニルプロピオン酸アミド類(Amsberry,等, J. Org. Chem., 1990, 55, 5867)が用いられうる。グリシンのα-位置で置換されているアミン含有薬剤の除去(Kingsbury,等, J. Med. Chem., 1984, 27, 1447)もまたADCに有用な自己犠牲のSpacerの例である。

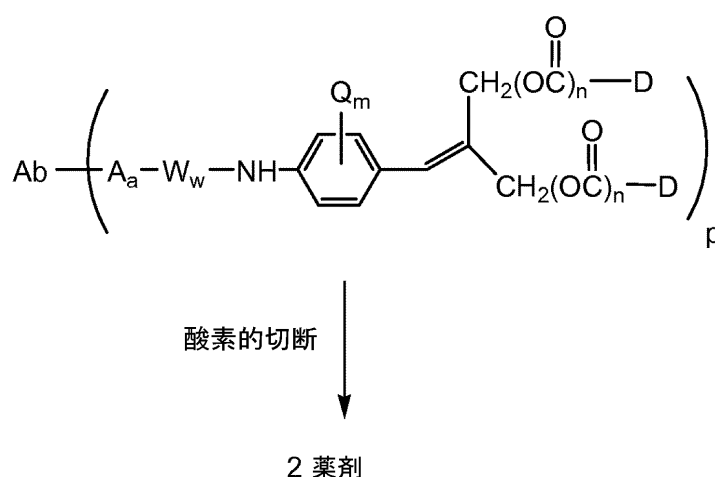
10

20

【0232】

一実施態様では、以下に示すように、Spacerユニットは分岐したビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)ユニットであり、これを用いて複数の薬剤の取り込みと放出が行われうる。

30



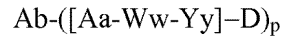
40

ここで、Qは-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、mは0~4の範囲の整数であり、nは0又は1であり、そして、pは1~およそ20の範囲である。

【0233】

50

リンカーは、上記いずれかの一又は複数のリンカー成分を含んでもよい。ある実施態様では、リンカーは、以下のADC式IIにおいて括弧で示す。



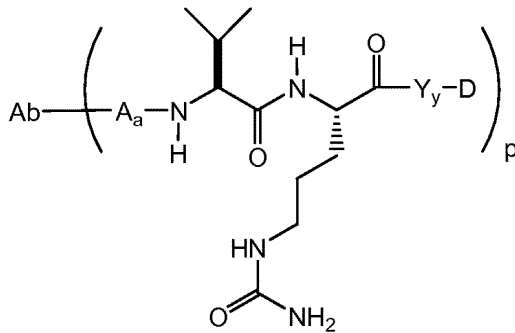
式II

ここで、Aはストレッチャーユニットであり、aは0～1の整数であり、Wはアミノ酸ユニットであり、wは0から12の整数であり、Yはスペーサーユニットであり、yは0、1又は2であり、そして、Ab、D及びpは、式Iに関して上記に定義した。このようなリンカーの例示的な実施態様は、米国特許公開第2005-0238649号A1に記載されており、出典明記によって本明細書中に明確に援用される。

10

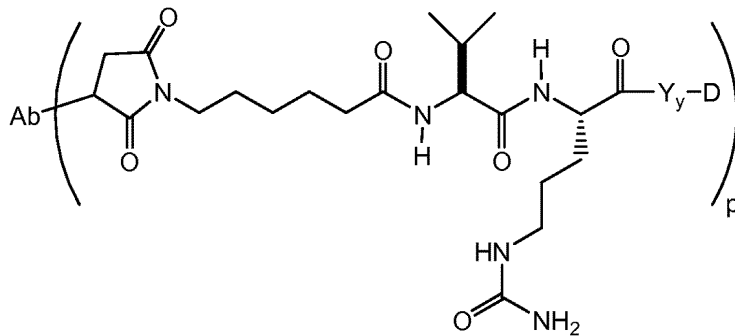
【0234】

例示的なリンカー成分及びその組合せは、式IIのADCについて以下に示す。



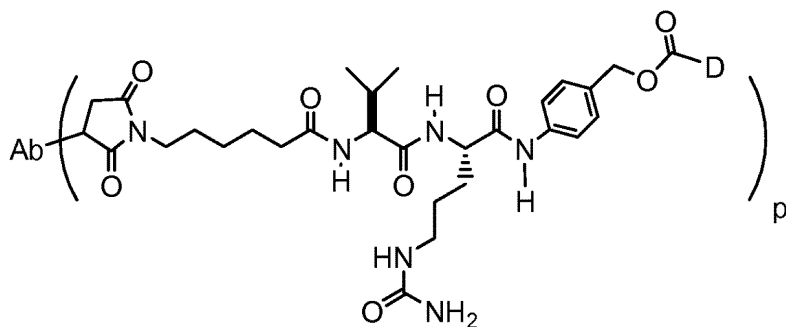
20

Val-Cit又はVC



30

MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

10

ストレッチャー、スペーサー及びアミノ酸ユニットを含むリンカー成分は、例えば米国特許公開第2005-0238649号A1に記載のものなど、当分野で公知の方法によって合成される。

【0235】

例示的な薬剤部分

メイタンシン及びメイタンシノイド

20

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは一又は複数のメイタンシノイド分子と結合している本発明の抗体(完全長又は断片)を含んでなる。メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害するように作用する分裂阻害剤である。メイタンシンは、最初、東アフリカシラブ *Maytenus serrata* から単離されたものである(米国特許第3896111号)。その後、ある種の微生物がメイタンシノイド類、例えばメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルを生成することが発見された(米国特許第4151042号)。合成メイタンシノール及びその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4137230号；同4248870号；同4256746号；同4260608号；同4265814号；同4294757号；同4307016号；同4308268号；同4308269号；同4309428号；同4313946号；同4315929号；同4317821号；同4322348号；同4331598号；同4361650号；同4364866号；同4424219号；同4450254号；同4362663号；及び同4371533号に開示されている。

30

メイタンシノイド薬剤成分は、(i) 発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化によって調製するために相対的に利用可能である(ii) 抗体に対する非ジスルフィドリンカーによる共役に好適な官能基による誘導体化に従う、(iii) 血漿中で安定、そして(iv) 様々な腫瘍細胞株に対して有効であるため、抗体薬剤コンジュゲートの魅力的な薬剤成分である。

メイタンシノイド薬剤部分としての使用に適切なメイタンシン化合物は当分野で周知であり、公知の方法に従って天然の供給源から単離してもよいし、又は遺伝子工学技術を用いて産生してもよい(Yu等(2002) PNAS 99:7968-7973を参照)。また、メイタンシノール及びメイタンシノール類似体は、公知の方法に従って合成して調製されてもよい。

40

メイタンシノイド薬剤部分の例示的な実施態様には、本明細書中において開示した構造を有するDM1；DM3；及びDM4が含まれる。

【0236】

アウリスタチン類及びドラスタチン類

いくつかの実施態様では、イムノコンジュゲートは、ドラスタチン又はドロスタチンペプチジル類似体ないしは誘導体、例えばアウリスタチン(auristatin)(米国特許第5635483号；同第5780588号)にコンジュゲートした本発明の抗体を含んでなる。ドラスタチン及びアウリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解及び核と細胞の分割を妨げ(Woyke等(2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12): 3580-3584)、抗癌

50

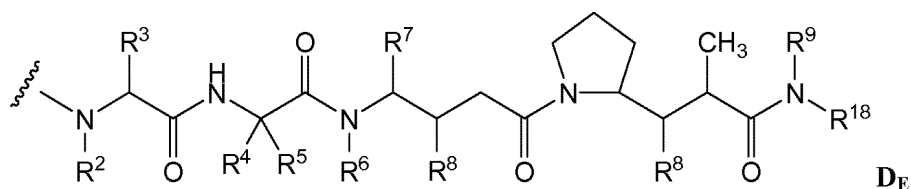
活性(米国特許第5663149号)及び抗真菌性活性(Pettit等(1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965)を有することが示されている。ドラスタチン又はアウリスタチン薬剤成分は、ペプチジル薬剤分子のN(アミノ)末端又はC(カルボキシル)末端により抗体に接着しうる(国際公開第02/088172号)。

例示的なアウリスタチンの実施態様には、N末端連結モノメチルアウリスタチン薬剤部分D_E及びD_Fを含み、2004年3月28日に公開されたSenter等, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623に開示される。この開示内容は出典明記によってその全体が特別に援用される。

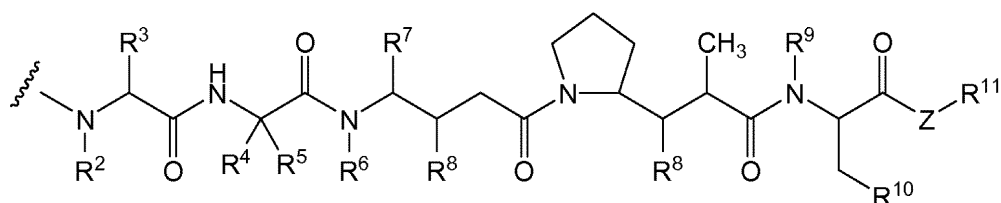
【0237】

ペプチド性薬剤部分は以下の式D_E及びD_Fから選択されうる。

10



20



D_F

ここで、D_E及びD_Fの波線は、独立して各々の位置で、抗体又は抗体-リンカー成分への共有結合部位を示す。

30

R²は、H及びC₁-C₈アルキルから選択され、

R³は、H、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環式化合物、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環式化合物)、C₃-C₈ヘテロ環及びC₁-C₈アルキル-(C₃-C₈ヘテロ環)から選択され、

R⁴は、H、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環式化合物、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環式化合物)、C₃-C₈ヘテロ環及びC₁-C₈アルキル-(C₃-C₈ヘテロ環)から選択され、

R⁵は、H及びメチルから選択され、

又はR⁴及びR⁵は共同で環状炭素を形成し、R^a及びR^bがH、C₁-C₈アルキル及びC₃-C₈炭素環式化合物からそれぞれ選択される式-(CR^aR^b)_n-を有し、nは2、3、4、5及び6から選択され、

40

R⁶は、H及びC₁-C₈アルキルから選択され、

R⁷は、H、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環式化合物、アリール、C₁-C₈アルキル-アリール、C₁-C₈アルキル-(C₃-C₈炭素環式化合物)、C₃-C₈ヘテロ環及びC₁-C₈アルキル-(C₃-C₈ヘテロ環)から選択され、

各々のR⁸は、H、OH、C₁-C₈アルキル、C₃-C₈炭素環及びO-(C₁-C₈アルキル)からそれぞれ選択され、

R⁹は、H及びC₁-C₈アルキルから選択され、

R¹⁰は、アリール又はC₃-C₈ヘテロ環から選択され、

50

ZはO、S、NH、又は R^{12} が $C_1 - C_8$ アルキルである NR^{12} であり、
 R^{11} は、H、 $C_1 - C_{20}$ アルキル、アリール、 $C_3 - C_8$ ヘテロ環、 $-(R^{13}O)_m - R^{14}$ 、又は $-(R^{13}O)_m - CH(R^{15})_2$ から選択され、
 mは、1 ~ 1000の範囲の整数であり、
 R^{13} は $C_2 - C_8$ アルキルであり、
 R^{14} は、H又は $C_1 - C_8$ アルキルであり、
 各々の R^{15} の発生は、独立してH、COOH、 $-(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ 、 $-(CH_2)_n - SO_3H$ 、又は $-(CH_2)_n - SO_3 - C_1 - C_8$ アルキルであり、
 各々の R^{16} の発生は、独立してH、 $C_1 - C_8$ アルキル、又は $-(CH_2)_n - COOH$ であり、
 R^{18} は、 $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 -$ アリール、 $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 (C_3 - C_8$ ヘテロ環)、及び $-C(R^8)_2 - C(R^8)_2 (C_3 - C_8$ 炭素環式化合物)から選択され、そして、nは0から6の範囲の整数である。

10

【0238】

一実施態様では、 R^3 、 R^4 及び R^7 は、それぞれイソプロピル又はsec-ブチルであり、 R^5 は-H又はメチルである。ある例示的な実施態様では、 R^3 及び R^4 は各々イソプロピルであり、 R^5 は-Hであり、そして R^7 はsec-ブチルである。

さらに他の実施態様では、 R^2 及び R^6 はそれぞれメチルであり、 R^9 は-Hである。

さらに他の実施態様では、各々の R^8 の発生は $-OCH_3$ である。

例示的な実施態様では、 R^3 及び R^4 は各々イソプロピルであり、 R^2 及び R^6 はそれぞれメチルであり、 R^5 は-Hであり、 R^7 はsec-ブチルであり、各々の R^8 の発生は $-OCH_3$ であり、そして R^9 は-Hである。一実施態様では、Zは-O-又は-NH-である。

20

一実施態様では、 R^{10} はアリールである。

ある例示的な実施態様では、 R^{10} は-フェニールである。

ある例示的な実施態様では、Zが-O-の場合、 R^{11} は-H、メチル又はt-ブチルである。

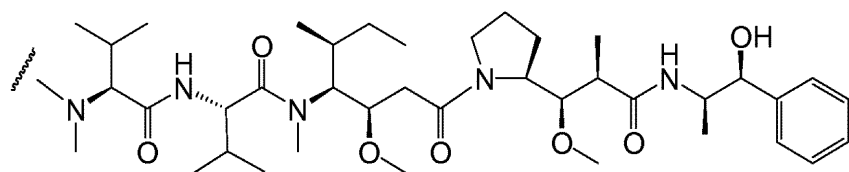
一実施態様では、Zが-NHである場合に、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ である。この R^{15} は $-(CH_2)_n - N(R^{16})_2$ であり、 R^{16} は $-C_1 - C_8$ アルキル又は $-(CH_2)_n - COOH$ である。

30

他の実施態様では、Zが-NHである場合に、 R^{11} は $-CH(R^{15})_2$ である。この R^{15} は $-(CH_2)_n - SO_3H$ である。

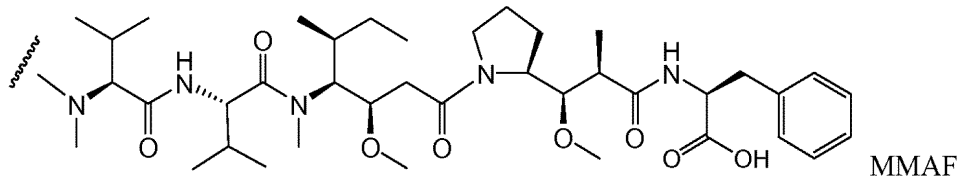
【0239】

式DEの例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAEである。ここで、波線は抗体-薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す。



40

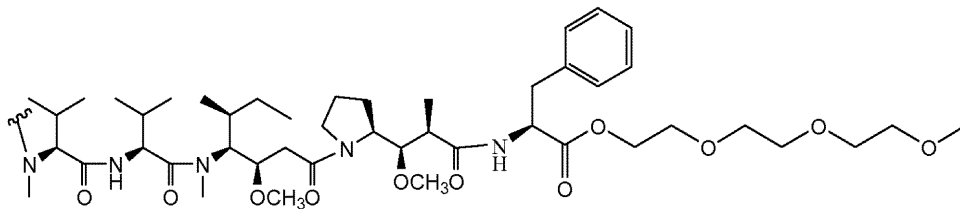
式DFの例示的なアウリスタチンの実施態様はMMAFである。ここで、波線は抗体-薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す(米国特許公開第2005/0238649号及びDoronina等(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124)を参照)。



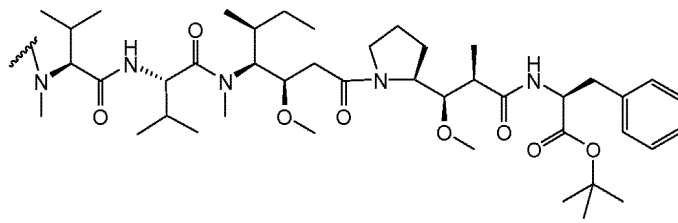
【 0 2 4 0 】

10

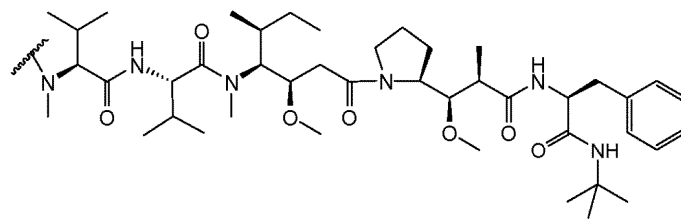
他の薬剤部分には以下のMMAF誘導体が含まれる。ここで、波線は抗体-薬剤コンジュゲートのリンカー(L)への共有結合を示す。



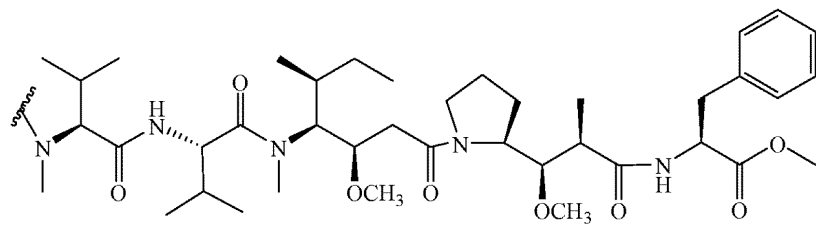
20

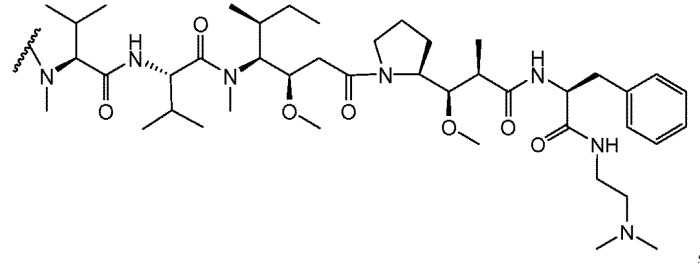


30

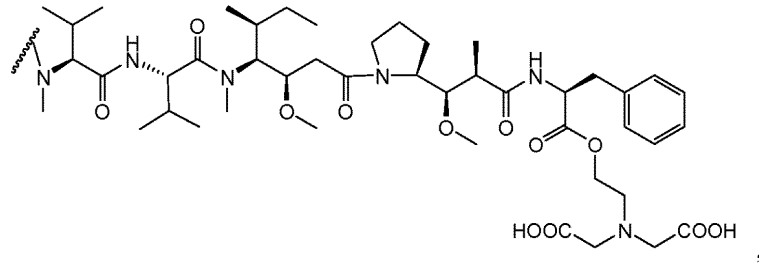


40

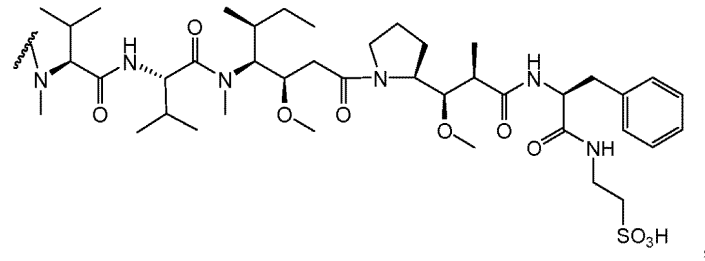




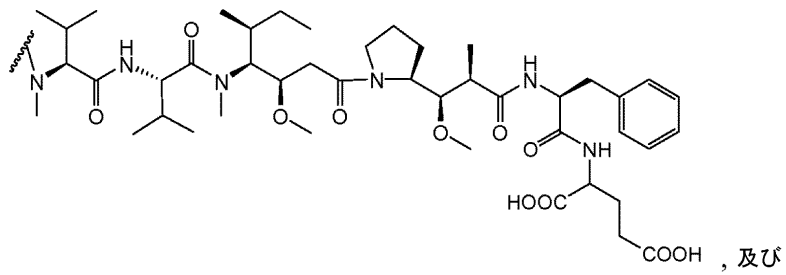
10



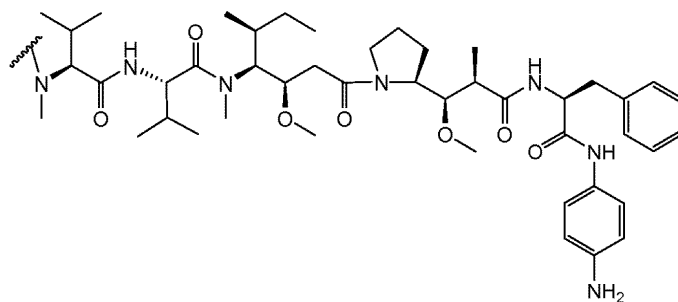
20



30



40



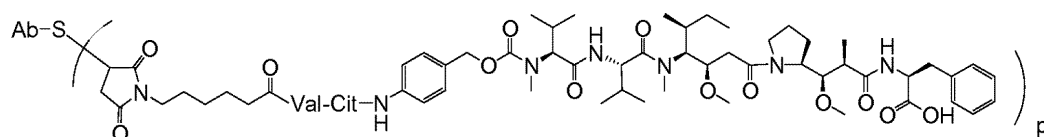
10

【0241】

一態様では、限定するものではないが、上記のようなトリエチレングリコールエステル (TEG) を含む親水基は R¹¹ で薬剤部分に結合することができる。ある特定の理論に縛られるものではないが、親水基は薬剤部分の内在化及び非凝集に存在する。

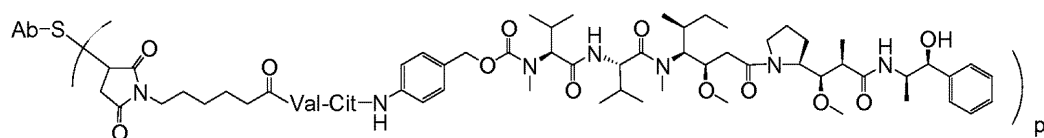
アウリスタチン/ドラスタチン又はその誘導体を含む式IのADCの例示的な実施態様は、米国特許公開第2005-0238649号A1及びDoronina等(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載されており、これは出典明記によってここに明確に援用される。MMAE又はMMAFと様々なリンカー成分を含む式IのADCの例示的な実施態様は、以下の構造及び略記号を有する(ここで、「Ab」は抗体であり、pは1~およそ8であり、「Val-Cit」はバリン-シトルリンジペプチドであり、そして「S」は硫黄原子である。

20



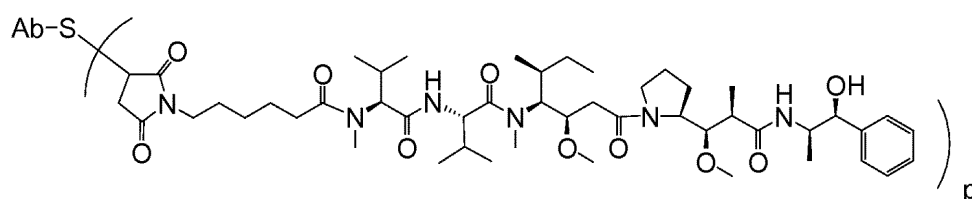
Ab-MC-vc-PAB-MMAF

30

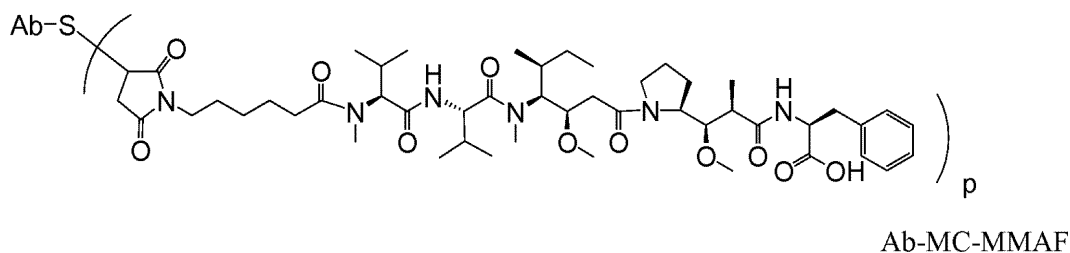


Ab-MC-vc-PAB-MMAE

40



Ab-MC-MMAE



10

【0242】

さらに、MMAFと様々なリンカー成分を含む式IのADCの例示的な実施態様には、Ab-MC-PAB-MMAF及びAb-PAB-MMAFが含まれる。興味深いことに、タンパク質分解性の切断を受けないリンカーによって抗体に結合しているMMAFを含むイムノコンジュゲートは、タンパク質分解で切断可能なリンカーによって抗体に結合しているMMAFを含むイムノコンジュゲートに比べて活性を有することが示されている。Doronina等(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124を参照。このような場合、薬剤放出は細胞内の抗体分解に影響を受けると思われる。同上。

一般的に、ペプチドベースの薬剤部分は、2以上のアミノ酸及び/又はペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野において周知の液相合成方法に従って調製することができる(E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Pressを参照)。アウリスタチン/ドラスタチン薬剤部分は、米国特許公開第2005-0238649号A1; 米国特許公開第5635483号; 米国特許第5780588号; Pettit等(1989) J. Am. Chem. Soc. 111: 5463-5465; Pettit等(1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., 等 Synthesis, 1996, 719-725; 及びPettit等(1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; 及びDoronina(2003) Nat. Biotechnol. 21(7): 778-784の方法に従って調製されうる。

20

特に、式DFのアウリスタチン/ドラスタチン薬剤部分、例えばMMAF及びその誘導体は、米国特許公開第2005-0238649号A1及びDoronina等(2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124に記載の方法を用いて調製されうる。式DEのアウリスタチン/ドラスタチン薬剤部分、例えばMMAE及びその誘導体は、Doronina等(2003) Nat. Biotech. 21:778-784に記載の方法を用いて調製されうる。薬剤-リンカー部分であるMC-MMAF、MC-MMAE、MC-vc-PAB-MMAF、及びMC-vc-PAB-MMAEは、例えばDoronina等(2003) Nat. Biotech. 21:778-784、及び米国特許公開第2005/0238649号A1に記載のような常套的な方法によって都合よく合成され、その後対象の抗体にコンジュゲートされてもよい。

30

【0243】

薬剤ローディング(Drug Loading)

薬剤ローディングは、式Iの分子において、抗体当たりの薬剤部分の平均数であり、pによって表される。薬剤ローディングは抗体当たり1~20の薬剤部分(D)の範囲であってもよい。式IのADCには、1から20の薬剤部分の範囲でコンジュゲートされる抗体の集まりが含まれる。コンジュゲート反応からのADCの調製において抗体当たりの薬剤部分の平均数は、質量分析、ELISAアッセイ及びHPLCなどの従来の方法によって特徴付けられうる。pに関するADCの定量的分布も決定されうる。いくつかの場合では、pが他の薬剤ローディングを有するADCの一定の値である場合の均質なADCの分離、精製及び特徴づけは、逆相HPLC又は電気泳動などの手段によって達成されうる。

40

ある抗体-薬剤コンジュゲートでは、pは抗体上の結合部位の数によって限定されうる。例えば、結合がシステインチオールである場合、上記の例示的な実施態様のように、抗体はたった1つ又は複数のシステインチオール基を有してもよいし、結合しうるリンカー

50

によってたった1つ又は複数の十分に活性なチオール基を有してもよい。ある実施態様では、薬剤ローディングが高いと、例えば $p > 5$ であると、特定の抗体-薬剤コンジュゲートの凝集、難溶性、毒性又は細胞透過性の喪失が起こりうる。ある実施態様では、本発明のADCの薬剤ローディングは、1からおよそ8、およそ2からおよそ6、およそ3からおよそ5、およそ3からおよそ4、およそ3.1からおよそ3.9、およそ3.2からおよそ3.8、およそ3.2からおよそ3.7、およそ3.2からおよそ3.6、およそ3.3からおよそ3.8、またはおよそ3.3からおよそ3.7の範囲である。実際、あるADCでは、抗体当たりの薬剤部分の適切な比は、8未満であってもよいし、およそ2~およそ5であってもよい。米国特許公開第2005-0238649号A1(出典明記によってこの全体が本明細書中に援用される)を参照。

10

【0244】

ある実施態様では、理論的な最大よりも少ない薬剤部分がコンジュゲート反応の間に抗体にコンジュゲートされる。抗体は、例えば、以下に検討するように、薬剤-リンカー中間体又はリンカー試薬と反応しないリジン残基を含みうる。ほとんどの反応性リジングループのみがアミン-反応性リンカー試薬と反応しうる。一般に、抗体は薬剤部分に結合しうる多くの遊離した反応性のシステインチオール基を含まず、実際、抗体のほとんどのシステインチオール残基はジスルフィド架橋として存在する。ある実施態様では、抗体は、反応性のシステインチオール基を生成するために、部分的ないしは完全に還元な条件下で、ジチオトレイトール(DTT)又はトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)などの還元剤により還元されうる。ある実施態様では、抗体は変性条件下に曝されるとリジンやシステインなどの反応性の求核基を現す。

20

ADCのローディング(薬剤/抗体比率)は、例えば、(i) 抗体に対して薬剤-リンカー中間体又はリンカー試薬のモル過剰量を限定する、(ii) コンジュゲートの反応時間又は温度を限定する、(iii) システインチオール修飾のための還元条件を限定する、(iv) システイン残基がリンカー-薬剤接着の数及び/又は位置の制御のために変更されるように、抗体のアミノ酸配列を組み換え技術によって改変する(例えば、本明細書及び国際公開第2006/034488号(出典明記によって本明細書中に全体が援用される)において開示されるように調製した

【0245】

1以上の求核基が薬剤部分試薬が続くリンカー試薬又は薬剤-リンカー中間体と反応する場合、その結果生じる生成物は、抗体に結合した一又は複数の薬剤部分を有するADC化合物の混合物であると考えられる。抗体当たりの薬剤の平均数は、抗体特異的かつ薬剤特異的である二重ELISAアッセイによって混合物から算出されうる。個々のADC分子は、質量分析によって混合物中で識別され、HPLC、例えば疎水性相互作用クロマトグラフィによって分離されうる(例としてHamblett, K.J.,等 "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody-drug conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C.,等 "Controlling the location of drug attachment in antibody-drug conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004を参照)。ある実施態様では、単一のローディング値をもつ均質なADCは、電気泳動又はクロマトグラフィによってコンジュゲート混合物から単離してもよい。

30

40

【0246】

イムノコンジュゲートの調製方法

式IのADCは、当業者に公知の有機化学的反応、条件及び試薬を用いた様々な手段、例えば、(1) 共有結合によってAb-Lを形成するための二価のリンカーと抗体の求核基との反応とその後の薬剤部分Dとの反応、及び(2) 共有結合によってD-Lを形成するための二価のリンカーと薬剤部分の求核基との反応とその後の抗体の求核基との反応などに

50

よって調製されてもよい。後者の手段による式IのADCを調製するための例示的な方法は米国特許公開第2005-0238649号A1に記載されており、出典明記によって本明細書中に明確に援用される。

抗体の求核基には、限定するものではないが、(i) N末端アミン基、(ii) 側鎖アミン基、例えばリジン、(iii) 側鎖チオール基、例えばシステイン、及び(iv) 抗体がグリコシル化される糖水酸基又はアミノ基が含まれる。アミン、チオール及び水酸基は、求核であり、反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性基により共有結合を形成することができる。このリンカー部分及びリンカー試薬には、(i) 活性エステル類、例えばNHSEステル類、HOBTエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。特定の抗体は、還元しうる鎖間ジスルフィド、すなわちシステイン架橋を有する。抗体は、抗体が完全ないしは部分的に還元されるように、還元剤、例えばDTT(ジチオトレイトール)又はトリカルボニルエチルホスフィン(TCEP)による処置によって、リンカー試薬を用いたコンジュゲート反応を行ってもよい。ゆえに、各々のシステイン架橋は、理論的には、2つの反応性のチオール求核基を形成する。あるいは、リジン残基の修飾によって、例えば、チオールにアミンを転換させる2-イミノチオラン(トラウトの試薬)を用いてリジンを反応させることによって、抗体にスルフヒドリル基を導入することができる。反応性のチオール基は、1、2、3、4又はそれ以上のシステイン残基を導入する(例えば、一又は複数の非天然のシステインアミノ酸残基を含んでなる変異体抗体を調製する)ことによって抗体に導入されてもよい。

【0247】

また、本発明の抗体-薬剤コンジュゲートは、アルデヒドないしはケトンカルボニル基などの抗体上の求電子性基とリンカー試薬や薬剤上の求核基との間の反応によって生成してもよい。リンカー試薬上の有用な求核基には、限定するものではないが、ヒドラジド、おきしむ、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレート、及びアリアルヒドラジドが含まれる。一実施態様では、抗体を修飾して、リンカー試薬又は薬剤上の求核置換基と反応させることができる求電子性の部分を導入する。他の実施態様では、グリコシル化された抗体の糖質を、例えば過ヨウ素酸塩酸化剤を用いて酸化して、リンカー試薬又は薬剤部分のアミン基と反応しうるアルデヒド又はケトン基を形成させてもよい。生じたイミンシッフ塩基群が安定結合を形成するか、又は例えば安定アミン結合を形成させるホウ化水素試薬によって、還元してもよい。一実施態様では、ガラクトースオキシダーゼ又はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩の何れかによるグリコシル化抗体の炭水化物部分の反応により、薬剤(Hermanson, Bioconjugate Techniques)上の適当な基と反応することができる抗体のカルボニル(アルデヒド及びケトン)基が生じうる。他の実施態様では、N末端セリン又はスレオニン残基を含む抗体はナトリウムメタ過ヨウ素酸塩と反応して、第一のアミノ酸の代わりにアルデヒドを生成する(Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852)。このようなアルデヒドは、薬剤部分又はリンカー求核基と反応することができる。

薬剤部分上の求核基には、限定するものではないが、反応して、リンカー部分及びリンカー試薬上の求電子性の基と共有結合することができるアミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステル及びアリアルヒドラジド基が含まれる。このリンカー部分及びリンカー試薬には、(i) 活性エステル類、例えばNHSEステル類、HOBTエステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物；(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類；(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、が含まれる。

【0248】

本発明の化合物は、限定するものではないが、以下の架橋剤：市販されている(例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.Aより)BMPS、EMCS、GMB S、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、S

MCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、及びスルホ-SMPB、及びSVSB (スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)安息香酸塩)にて調製したADCが特に考えられる。2003-2004 Applications Handbook and Catalogの467-498頁を参照。

また、抗体と細胞障害性剤のイムノコンジュゲートは、種々の二官能性タンパク質カップリング剤、例えばN-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオナート(SPPD)、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミダートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トリエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta等、Science 238:1098(1987)に記載されているようにして調製することができる。炭素-14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレン-トリアミン五酢酸(MX-DTPA)が抗体に放射性ヌクレオチドをコンジュゲートするためのキレート剤の例である。国際公開第94/11026号を参照されたい。

10

【0249】

別法として、抗体と細胞障害性剤を含有する融合タンパク質は、例えば組換え技術又はペプチド合成により作製される。組み換えDNA分子は、コンジュゲートの所望する特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域により離間しているか、又は互いに隣接しているコンジュゲートの抗体と細胞障害性の部分をコードする領域を含みうる。

20

更なる他の実施態様では、腫瘍の事前ターゲティングに利用するために、「レセプター」(例えばストレプトアビジン)に抗体をコンジュゲートし、ここで抗体-レセプターコンジュゲートを患者に投与し、続いて清澄剤を使用して循環から非結合コンジュゲートを除去し、細胞障害性剤(例えば放射性ヌクレオチド)にコンジュゲートする「リガンド」(例えばアビジン)を投与してもよい。

【0250】

2. 例示的なイムノコンジュゲート-Thio-抗体薬剤コンジュゲート

30

システイン改変抗CD22抗体の調製

本発明のシステイン改変抗CD22抗体及び親抗CD22抗体のアミノ酸配列変異体をコードするDNAは、限定するものではないが、(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合には)天然源からの単離、予め調製したポリペプチドをコードするDNAの、部位特異的(又はオリゴヌクレオチド媒介性)突然変異誘発(Carter (1985)等 Nucleic Acids Res. 13: 4431-4443; Ho等 (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; Kunkel等 (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu等 (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260)、PCR突然変異誘発(Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito等 (1991) Gene 102:67-70; Bernhard等 (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; 及びVallette等 (1989) Nuc. Acids Res. 17: 723-733)、及びカセット突然変異誘発(Wells等 (1985) Gene 34:315-323)を含む、様々な方法によって調製される。QuickChange(登録商標)多部位-特異的突然変異誘発キット(Stratagene, La Jolla, CA)などの、突然変異誘発プロトコール、キットおよび試薬は市販されている。また、PCRベースの突然変異誘発によって鑄型として二本鎖プラスミドDNAを用いたオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって、単一突然変異が生成される(Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller等 (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. and Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10: 6487-6500)。組み換え抗体の変異体も、制限酵素断片操作又は合成オリゴヌクレオチドによるオーバーラップ伸展PCRによって構築してもよい。突然変異誘発プライマーはシステインコドン置換(一又は複数)をコードする。標準的な突然変異誘発技術を用いて、このような変異体シス

40

50

テイン改変抗体をコードするDNAを生成することができる(Sambrook等 Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; 及びAusubel等 Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993)。

【0251】

ファージディスプレイ技術(McCafferty等 (1990) Nature 348:552-553)を使用して、非免疫化ドナーの免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、インビトロで抗CD22ヒト抗体及び抗体断片を産出させることができる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子を、繊維状バクテリオファージ、例えばM13又はfdの主要又は微量コートタンパク質遺伝子のどちらかをフレーム内にクローン化し、ファージ粒子の表面で機能的抗体断片として表示させる。繊維状粒子がファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含有するので、抗体の機能的特性に基づく選別を行ってもそれらの性質を表す抗体をコードする遺伝子が選別される。ゆえに、ファージはB細胞の性質のいくつかを模倣する(Johnson等 (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571; Clackson等 (1991) Nature, 352:624-628; Marks等 (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith等 (1993) EMBO J. 12:725-734; 米国特許第5565332号; 米国特許第5573905号; 米国特許第5567610号; 米国特許第5229275号)。

抗CD22抗体は、公知のオリゴペプチド合成法を使用して化学的に合成されてもよいし、組み換え技術を用いて調製して精製されてもよい。適切なアミノ酸配列、又はその一部を、固相法技術を用いた直接的なペプチド合成によって生成してもよい(Stewart等, Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154)。インビトロタンパク質合成は、手動の技術又は自動化によって実行されてもよい。例えば、t-BOC又はFmoc保護アミノ酸を使用して、そして製造業者の指示を用いたアプライドバイオシステムペプチド合成機(Foster City, CA)を用いて、自動固相合成法を行ってもよい。抗CD22抗体又はCD22ポリペプチドの様々な部分は、別々に化学的に合成されて、化学的又は酵素的な方法を用いて組み合わせ、所望の抗CD22抗体又はCD22ポリペプチドを生産させてもよい。

【0252】

抗体断片の産生のために様々な技術が開発されている。以前から、これらの断片はインタクトな抗体の蛋白分解によって生じるか(Morimoto等 (1992) Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; 及びBrennan等 (1985) Science, 229:81)、又は組換え宿主細胞によって直接生産された。Fab、FvおよびScFv抗CD22抗体断片はすべて、大腸菌において発現され、大腸菌から分泌されるため、大量の断片を容易に生成することができる。抗体断片は、本明細書において述べられる抗体ファージライブラリから単離してもよい。あるいは、Fab'-SH断片は、大腸菌から直接回収して、化学的にカップリングしてF(ab')₂断片を形成させてるか(Carter等 (1992) Bio/Technology 10:163-167)、または組換え宿主細胞培養物から直接単離されうる。抗CD22抗体は(scFv)単鎖Fv断片であってもよい(国際公開第93/16185号; 米国特許第5571894号; 米国特許第5587458号)。また、抗CD22抗体断片は「直鎖状抗体」であってもよい(米国特許第5641870号)。このような線形抗体断片は、単一特異性でも二重特異性でもよい。

以下の記載は主に、抗CD22抗体をコードする核酸を含むベクターにて形質転換した又は該ベクターを形質移入した細胞を培養することによる、抗CD22抗体の産生に関する。抗CD22抗体をコードするDNAは、抗CD22抗体のmRNAを有し、検出可能なレベルに発現すると思われる組織から調製したcDNAライブラリから得てもよい。したがって、ヒト抗CD22抗体ないしCD22ポリペプチドDNAは、ヒト組織から調製したcDNAライブラリから従来通りに得ることができる。また、抗CD22抗体コード遺伝子は、ゲノムライブラリから得るか、又は公知の合成手順(例えば自動核酸合成)によって得てもよい。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 3 】

本発明の設定、選別および調製方法により、求電子性の官能性と反応するシステイン改変抗CD22抗体が可能である。これらの方法によりさらに、所定の設定した選択した部位に薬剤分子を有する抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)化合物などの抗体複合体化合物が可能である。抗体表面上の反応性のシステイン残基により、マレイミド又はハロアセチルなどのチオール反応基を介した薬剤成分の特異的なコンジュゲートが可能である。マレイミド基に対するCys残基のチオール官能基の求核反応性は、リジン残基のアミノ基又はN-末端アミノ基などのタンパク質内の任意の他のアミノ酸官能性の、およそ1000倍である。ヨードアセチルおよびマレイミド試薬のチオール特異的官能性はアミン基と反応するが、より高いpH(>9.0)とより長い反応時間が必要である(Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London)。タンパク質内の遊離チオールの量は、標準的なエルマンのアッセイによって推定されてもよい。免疫グロブリンMはジスルフィド結合五量体の例であるのに対し、免疫グロブリンGは、サブユニットと一緒に結合している内部ジスルフィド架橋を有するタンパク質の例である。このタンパク質では、ジチオトレイトール(DTT)又はselenol(Singh等(2002) Anal. Biochem. 304:147-156)などの試薬によるジスルフィド結合の還元は、反応性の遊離チオールを生成するために必要である。この手法により、抗体立体構造および抗原結合特異性が失われうる。

10

【 0 2 5 4 】

Phe selector(反応性チオールの選別のためのファージELISA)アッセイにより、ELISAファージ様式での抗体の反応性システイン基の検出が可能であり、これによってシステイン改変抗体の設定の助けとなる(国際公開第2006/034488号)。システイン改変抗体をウェルの表面にコートし、ファージ粒子とインキュベートして、HRP標識した二次抗体を添加して、吸光度を検出する。ファージにディスプレイされる変異タンパク質は、迅速で、強力な、ハイ-スループット方法でスクリーニングされうる。システイン改変抗体のライブラリを生成して同じ手法を用いて結合選別を行い、抗体又は他のタンパク質のランダムなタンパク質-ファージライブラリから遊離Cys取込みの反応性の部位を適切に同定することができる。この技術は、ファージにディスプレイされるシステイン変異タンパク質を、チオール反応性でもあるレポーターグループ又は親和性試薬と反応させることを含む。

20

30

PHESELECTORアッセイにより、抗体の反応性のチオール基のスクリーニングが可能である。この方法によるA121C変異の同定は一例である。完全なFab分子は、反応性チオール基を有するThioFab変異体をより多く同定するために、効果的に検索されうる。パラメーターである断片的な表面のアクセス容易性を用いて、ポリペプチド内のアミノ酸残基に対する溶媒のアクセスしやすさを同定して、定量化した。表面のアクセス容易性は、溶媒分子、例えば水が接触することができる表面積(Å^2)として表されうる。水が占める面積は1.4半径球として概算される。アルゴリズムを用いて公知のX線結晶学由来の座標によりタンパク質の各アミノ酸の表面アクセス容易性を算出する結晶学プログラムのCCP4 Suiteとして("The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50: 760-763)、ソフトウェアは入手自由であるか許可されている(Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, or by internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html)。B.Lee and F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400のアルゴリズムに基づいて、表面アクセス容易性の算出を実行する2つの例示的なソフトウェアモジュールは、「AREAIMOL」および「SURFACE」である。AREAIMOLは、タンパク質のヴァンデルワールス表面を転がるので、プローブ球(溶媒分子を表す)の中心の座標としてタンパク質の溶媒にアクセスする表面を定義する。AREAIMOLは、各原子の周りの拡がった球上(原子とプローブの半径の合計に等しい原子中心からの距離)に表面ポイントを生成して、周囲の原子と関連する同等の球内にあるものを除くことによって溶媒にアクセス容易な表面を算出する。AREAIMOLは、PDB座標ファイルに原子

40

50

の溶媒にアクセス容易な領域を見つけ、残基、鎖、及び全分子がアクセス容易な領域をまとめる。個々の原子がアクセス容易な領域(または、領域の相違)は、偽PDB出力ファイルに書き込まれる。AREAIMOLは各エレメントについて単一の半径を仮定し、限られた数の異なるエレメントを認識するのみである。

【0255】

AREAIMOLおよびSURFACEは、絶対的なアクセス容易性、すなわち正方形のオングストローム()の数を示す。部分的な表面アクセス容易性は、ポリペプチド内のアミノ酸に関する標準の状態を参照することで算出される。基準状態はトリペプチドGly-X-Glyであり、ここで、Xは対象のアミノ酸であり、基準状態は「伸展した」高次構造、すなわち鎖内の高次構造様でなければならない。伸展した高次構造はXのアクセス容易性を最大にする。算出したアクセス容易な領域をGly-X-Glyトリペプチド基準状態のアクセス容易な領域で割って、比率を比率を示す。これが部分的なアクセス容易性となる。アクセス容易性の割合は、100を乗じた部分的アクセス容易性である。表面アクセス容易性を算出するための他の例示的なアルゴリズムは、ポリペプチドのX線座標に基づいて水球体に対するアミノ酸残基の部分的アクセス容易性を算出するプログラムxsaе (Broger, C., F. Hoffman-LaRoche, Basel)のSOLVモジュールに基づく。抗体のすべてのアミノ酸の部分的表面アクセス容易性は、利用できる結晶構造情報を使用して算出されてもよい(Eigenbrot等 (1993) J Mol Biol. 229:969-995)。

システイン改変抗体をコードするDNAを容易に単離し、従来の手順を用いて(例えば、マウス抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを用いることによって)配列決定される。ハイブリドーマ細胞はこのようなDNAの供与源として役立つ。単離した後、DNAを発現ベクターに入れ、ついでそれを、大腸菌、サルのコス細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、又は他の哺乳動物の宿主細胞、例えば抗体タンパク質を産生しない骨髓腫細胞(米国特許第5807715号;米国公開特許第2005/0048572号;米国公開特許第2004/0229310)などの宿主細胞に形質移入して、組み換え宿主細胞内でモノクローナル抗体の合成を得てもよい。

【0256】

設定および選別の後、改変された、非常に反応性のある対になっていないCys残基を有するシステイン改変抗体、例えばThioFabが、(i)細菌、例えば大腸菌システム(Skerra等 (1993) Curr. Opin. in Immunol. 5:256-262; Pluckthun (1992) Immunol. Revs. 130:151-188)又は哺乳類の細胞培養システム(国際公開第01/00245号)、例えばチャイニーズハムスター卵巣細胞(CHO)における発現、および(ii)一般的なタンパク質精製技術を用いた精製(Lowman等 (1991) J. Biol. Chem. 266(17): 10982-10988)によって産生されてもよい。

改変されたCysチオール基は、求電子性リンカー試薬および薬剤-リンカー中間生成物と反応して、システイン改変抗体薬剤コンジュゲートおよび他の標識したシステイン改変抗体を形成する。親抗体に存在し、鎖内および鎖間のジスルフィド結合を形成するシステイン改変抗体Cys残基は、反応性チオール基を全く持っておらず(還元剤で処理されない限り)、求電子性のリンカー試薬又は薬剤-リンカー中間生成物と反応しない。新規に改変されたCys残基は対形成せずに、反応することができる。すなわち求電子性のリンカー試薬又は薬剤-マレイミドなどの薬剤-リンカー中間生成物にコンジュゲートすることができる。例示的な薬剤-リンカー中間生成物には、MC-MMAE、MC-MMAF、MC-vc-PAB-MMAEおよびMC-vc-PAB-MMAFが含まれる。重鎖および軽鎖の改変したCys残基の構造位置は連続する番号付けシステムに従って番号付けする。この連続する番号付けシステムは、N末端から始まるカバット番号付けシステム(Kabat等, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)に関連しており、a、b、cで示す挿入がカバット番号付けスキーム(下列)とは異なる。カバット番号付けシステムを用いると、実際の直鎖のアミノ酸配列は、可変ドメインのFRないしCDRが短

くなっているアミノ酸か、又はFRないしCDRに挿入を含むアミノ酸を含みうる。システイン改変重鎖変異体部位は連続する番号付けおよびカバット番号付けスキームによって同定される。

【0257】

一実施態様では、システイン改変抗CD22抗体は、

- (a) システインによって親抗CD22抗体の一又は複数のアミノ酸残基を置換する、そして、
- (b) チオール反応性の試薬とシステイン改変抗体を反応させることによって、システイン改変抗CD22抗体のチオール反応性を決定することを
含む方法によって調製される。

10

システイン改変抗体は親抗体よりチオール反応性の試薬との反応性が高くてもよい。

遊離システインアミノ酸残基は、重鎖ないし軽鎖、又は定常ドメインないし可変ドメインに位置してもよい。また、抗体断片、例えばFabは、抗体断片のアミノ酸を置換する一又は複数のシステインアミノ酸によって改変して、システイン改変抗体断片を形成してもよい。

本発明の他の実施態様は、

- (a) 一又は複数のシステインアミノ酸を親抗CD22抗体に導入して、システイン改変抗CD22抗体を生成する、そして、
- (b) チオール反応性の試薬によりシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを
含む、

20

このとき、システイン改変抗体は親抗体よりもチオール反応性の試薬と反応性が高いものである、システイン改変抗CD22抗体を調製する(作製する)方法を提供する。

【0258】

システイン改変抗体を調製する方法の工程(a)は、

- (i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する、
- (ii) システイン改変抗体を発現させる、そして、
- (iii) システイン改変抗体を単離して、精製することを
含む。

システイン改変抗体を調製する方法の工程(b)は、ファージ又はファジミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン改変抗体を発現させることを含んでもよい。

30

また、システイン改変抗体を調製する方法の工程(b)は、

- (i) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、
- (ii) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定することを
含んでもよい。

本発明の他の実施態様は、

- (a) 親抗体に一又は複数のシステインアミノ酸を導入して、システイン改変抗体を生成する、
- (b) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、
- (c) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定する、そして、
- (d) チオール反応性の試薬によりシステイン改変抗体のチオール反応性を決定することを
含む、チオール反応のために高い反応性を有し、対形成をしないシステインアミノ酸を有するシステイン改変抗体をスクリーニングする方法である。

40

【0259】

システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(a)は、

- (i) システイン改変抗体をコードする核酸配列を突然変異誘発する、
- (ii) システイン改変抗体を発現させる、そして、
- (iii) システイン改変抗体を単離して、精製することを
含んでもよい。

50

システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(b)は、ファージ又はファジミド粒子から選択されるウイルス粒子上にシステイン改変抗体を発現させることを含んでもよい。

また、システイン改変抗体をスクリーニングする方法の工程(b)は、

(i) システイン改変抗体をチオール反応性の親和性試薬と反応させ、親和性標識した、システイン改変抗体を生成させる、そして、

(ii) 親和性標識したシステイン改変抗体のキャプチャ培地への結合を測定することを含んでもよい。

【0260】

抗CD22 10F4 IgG変異体のシステイン改変

本明細書中に記載のシステイン改変方法によって、完全長キメラ親モノクローナル抗CD22抗体の重鎖118(EU番号付け)(連続する番号付けで言うと重鎖位置121に相当)部位にシステインを導入した。

親抗体、「std抗-CD22 Hu 10F4 v3 Fc」(重鎖配列：配列番号：88、軽鎖配列：配列番号：87、図5B)をシステイン改変して、「A118C thio hu抗CD22 10F4 v3」(重鎖配列：配列番号：92、軽鎖配列：配列番号：91、図17)、「S400C thio hu抗CD22 10F4 v3」(重鎖配列：配列番号：93、軽鎖配列：配列番号：91、図17)、又は「V205C thio抗CD22 10F4 v3」(重鎖配列：配列番号：88、軽鎖配列：配列番号：91、図5Bおよび17)とした。

これらのシステイン改変モノクローナル抗体を、1mMのシステインを含有する培地における一過性の発酵によって、CHO(チャイニーズハムスター卵巣)細胞に発現させた。

【0261】

標識したシステイン改変抗CD22抗体

システイン改変抗CD22抗体は部位特異的であり、チオール反応性の試薬と効率よくカップリングしうる。チオール反応性の試薬は、多機能性リンカー試薬、キャプチャ、すなわち親和性、標識試薬(例えばビオチン-リンカー試薬)、検出標識(例えば蛍光体試薬)、固相固定化試薬(例えばSEPHAROSETM、ポリスチレン又はガラス)、又は薬剤-リンカー中間生成物であってもよい。チオール反応性試薬の一例はN-エチルマレイミド(NEM)である。ある例示的な実施態様では、ビオチン-リンカー試薬とのThioFabの反応によりビオチン化されたThioFabが生じ、これによって改変されたシステイン残基の存在および反応性が検出され、測定されうる。多機能リンカー試薬とのThioFabの反応により、薬剤成分試薬又は他の標識とさらに反応しうる官能化されたリンカーを有するThioFabが生じる。薬剤-リンカー中間生成物とのThioFabの反応により、ThioFab薬剤コンジュゲートが生じる。

本明細書中で記述される例示的な方法は一般に、抗体の同定および産生、さらに一般的には、本明細書中に記載の設定およびスクリーニングの工程によって他のタンパク質に応用されてもよい。

【0262】

このような手法は、反応基が例えばマレイミド、ヨードアセトアミド、ピリジルジスルフィド、又は他のチオール反応性の結合パートナーである他のチオール反応性試薬のコンジュゲーションに応用されてもよい(Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671)。チオール反応性の試薬は、薬剤成分、フルオロホア、例としてフルオレセインまたはローダミンのような蛍光染料、イメージングまたは放射性治療用金属のためのキレート剤、ペプチジルまたは非ペプチジル標識ないしは検出用タグ、又はポリエチレングリコールの各種アイソフォームなどのクリアランス-改変剤、第三成分に結合するペプチド、ま

10

20

30

40

50

たは他の炭水化物または親油性剤であってもよい。

【0263】

システイン改変抗CD22抗体の使用

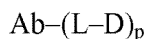
システイン改変抗CD22抗体とそのコンジュゲートは治療用及び/又は診断用の薬剤としての使用が明らかにされうる。本発明はさらに、B細胞関連疾患と関係する一又は複数の症状を予防するか、管理するか、治療するかまたは、寛解する方法を提供する。特に、本発明は、癌、例えばリンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫などの細胞増殖性疾患と関係する一又は複数の症状を予防するか、管理するか、治療するかまたは、寛解する方法を提供する。本発明はまた更に、CD22関連の疾患又はこのような疾患を発達させる素因を診断するための方法、並びに好ましくはB細胞関連のCD22ポリペプチドを結合する抗体、及び抗体の抗原結合断片を同定するための方法を提供する。

本発明の他の実施態様は、B細胞関連の疾患に应答する状態の治療において有用な医薬の調製のためのシステイン改変抗CD22抗体の使用に関する。

【0264】

システイン改変抗体薬剤コンジュゲート(Thio-抗体薬剤コンジュゲート)

本発明の他の態様は、システイン改変抗CD22抗体(Ab)と、アウリスタチン薬剤成分(D)を含む抗体-薬剤コンジュゲート化合物であって、このときシステイン改変抗体はリンカー成分(L)によって一又は複数の遊離したシステインアミノ酸を介してDに付着され、この化合物は式Iを有するものであり、



式 I

このとき p は 1、2、3 又は 4 であり、システイン改変抗体は、親抗 CD 2 2 抗体の一又は複数のアミノ酸残基を一又は複数の遊離したシステインアミノ酸に置換することを含む方法によって調製される。

【0265】

図 10 は、アウリスタチン薬剤成分が軽鎖(LC-ADC)、重鎖(HC-ADC)、及びFc領域(Fc-ADC)内の改変したシステイン基に付着している、システイン改変抗CD22抗体薬剤コンジュゲート(ADC)の実施態様を示す。

システイン改変抗CD22抗体薬剤コンジュゲートの考えられる利点には、PKパラメータの改善である安全性の改善(より大きな治療係数)が挙げられ、コンジュゲートを安定化し、かつその活性な結合高次構造を保持しうる抗体鎖間ジスルフィド結合が保たれており、薬剤コンジュゲートの部位が決定され、そして、システイン改変抗体の薬剤-リンカー試薬へのコンジュゲートからシステイン改変抗体薬剤コンジュゲートを調製することでより均一な産物が得られる。

【0266】

リンカー

「リンカー」、「リンカーユニット」又は「連結」は、共有結合を含む化学的成分又は共有結合にて抗体を薬剤成分に付着させる原子の鎖を意味する。様々な実施態様では、リンカーはLと表される。「リンカー」(L)は、一又は複数の薬剤成分(D)と抗体ユニット(Ab)を連結させて、式Iの抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を形成させるために用いられうる、二官能性成分又は多機能性成分である。抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は、薬剤及び抗体への結合について反応性機能を有するリンカーを用いて都合良く調製されうる。システイン改変抗体(Ab)のシステインチオールは、リンカー試薬、薬剤成分又は薬剤-リンカー中間生成物の求電子性の官能基と結合することができる。

一態様では、リンカーは、抗体に存在する求核性システインに反応することができる求電子性基を有する反応部位を有する。抗体のシステインチオールは、リンカー上の求電子

10

20

30

40

50

性基と反応することができ、リンカーに共有結合する。有用な求電子性の基には、マレイミドおよびハロアセトアミド基を含むが、これらに限定されるものではない。

リンカーには、二価の基、例としてalkyldiyl、アリーレン、ヘテロアリーレン、アルキロキシ(例としてポリエチレンオキシ、PEG、ポリメチレンオキシ)及びアルキラミノ(例えばポリエチレンアミノ、Jeffamine™)の繰り返しユニットである $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$ などの成分、及び、スクシナート、スクシンアミド、ジグリコレート、マロネート及びカプロアミドを含む二酸エステル及びアミドが含まれる。

システイン改変抗体は、Klussman, 等 (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4): 765-773 の 766 ページのコンジュゲート法及び、実施例 x のプロトコールに従って、マレイミド又は $-$ ハロカルボニルなどの求電子性の官能基を有するリンカー試薬又は薬剤 - リンカー中間生成物と反応する。

【0267】

リンカーは $-$ 又は複数のリンカー成分から成ってもよい。例示的なリンカー成分には、6-マレイミドカプロイル(「MC」)、マレイミドプロパノイル(「MP」)、バリン-シトルリン(「val-cit」又は「vc」)、アラニン-フェニルアラニン(「ala-phe」)、p-アミノベンジルオキシカルボニル(「PAB」)、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルチオ)ペンタノエート(「SPP」)、N-スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1カルボキシレート(「SMCC」)、N-スクシンイミジル(4-イオド-アセチル)アミノ安息香酸エステル(「SIAB」)、 $-$ 又は複数の繰り返しユニットとしてのエチレンオキシ- CH_2CH_2O- (「EO」又は「PEO」)が含まれる。更なるリンカー成分は当分野において周知であり、そのいくつかを本明細書中に記載する。

$-$ 実施態様では、ADCのリンカーLは以下の式を有する。



このとき、

- A - は、抗体(Ab)のシステインチオールに共有結合にて付着したストレッチャーユニットであり、

a は 0 又は 1 であり、

各々の - W - は、独立したアミノ酸ユニットであり、

w はそれぞれ、0 から 12 まで変動する整数であり、

- Y - は、薬剤成分に共有結合にて付着したスペーサーユニットであり、そして、y は 0、1 又は 2 である。

【0268】

ストレッチャーユニット

ストレッチャーユニット(- A -)は、存在する場合には、抗体ユニットをアミノ酸ユニット(- W -)に連結することができる。この点に関しては、抗体(Ab)は、ストレッチャーの官能基と結合することができる官能基を有する。天然ないし化学的操作のいずれにかよって抗体に存在することができる有用な官能基には、スルフヒドリル(- SH)、アミノ、ヒドロキシル、カルボキシ、炭水化物のアノマー水酸基およびカルボキシルが含まれるがこれらに限定されるものではない。 $-$ 態様では、抗体官能基はスルフヒドリル又はアミノである。スルフヒドリル基は、抗体の分子内ジスルフィド結合の還元によって生成される。あるいは、2-イミノチオラン(トラウトの試薬)又は他のスルフヒドリル生成試薬を用いて、抗体のリジン成分のアミノ基を反応させることによって、スルフヒドリル基を生成することができる。 $-$ 実施態様では、抗体(Ab)は、ストレッチャーユニットの求電子性の官能基と結合することができる遊離したシステインチオール基を有する。式Iのコンジュゲートの例示的なストレッチャーユニットは、式II及び式IIIで示すものであり、このときAb、- W -、- Y -、- D、w 及び y は前記に定義した通りであり、R¹

10

20

30

40

50

⁷ は、 $(CH_2)_r$ 、 $C_3 - C_8$ カルボシクリル、 $O - (CH_2)_r$ 、アリーレン、 $(CH_2)_r -$ アリーレン、 $-$ アリーレン $- (CH_2)_r -$ 、 $(CH_2)_r - (C_3 - C_8$ カルボシクリル)、 $(C_3 - C_8$ カルボシクリル) $- (CH_2)_r$ 、 $C_3 - C_8$ ヘテロシクリル、 $(CH_2)_r - (C_3 - C_8$ ヘテロシクリル)、 $- (C_3 - C_8$ ヘテロシクリル) $- (CH_2)_r -$ 、 $- (CH_2)_r C(O)NR^b (CH_2)_r -$ 、 $- (CH_2 CH_2 O)_r -$ 、 $- (CH_2 CH_2 O)_r - CH_2 -$ 、 $- (CH_2)_r C(O)NR^b (CH_2 CH_2 O)_r -$ 、 $- (CH_2)_r C(O)NR^b (CH_2 CH_2 O)_r - CH_2 -$ 、 $- (CH_2 CH_2 O)_r C(O)NR^b (CH_2 CH_2 O)_r - CH_2 -$ 、及び $- (CH_2 CH_2 O)_r C(O)NR^b (CH_2)_r -$ から選択される二価の基であり、 R^b はH、 $C_1 - C_6$ アルキル、フェニル又はベンジルであり、そして、 r はそれぞれ、1から10の範囲の整数である。

10

【0269】

アリーレンには、芳香族環システムから2つの水素原子を除去して得られる6~20の炭素原子の二価の芳香族炭化水素基が含まれる。代表的なアリーレン基には、ベンゼン、置換されたベンゼン、ナフタレン、アントラセン、ビフェニルなどから得られる基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

ヘテロシクリル基には、一又は複数の環原子がヘテロ原子、例えば窒素、酸素及び硫黄である環式システムが含まれる。複素環基は、1~20の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1~3のヘテロ原子を含む。複素環は、3~7員環を有するモノシクロ(2~6の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1~3のヘテロ原子)又は7~10員環を有するビシクロ(4~9の炭素原子とN、O、P及びSから選択される1~3のヘテロ原子)、例えばビシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]、又は[6,6]システムであつてもよい。複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968)、特に第1, 3, 4, 6, 7及び9章; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present)、特に13, 14, 16, 19及び28号; 及び、J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566に記載される。

20

【0270】

複素環の例には、例示のためであつて限定するものではなく、ピリジル、ジヒドロピリジル、テトラヒドロピリジル(ピペリジル)、チアゾリル、テトラヒドロチオフェニル、硫黄酸化型テトラヒドロチオフェニル、ピリミジニル、フラニル、チエニル、ピロリル、ピラゾリル、イミダゾリル、テトラゾリル、ベンゾフラニル、チアナフタレニル、インドリル、インドレニル、キノリニル、イソキノリニル、ベンズイミダゾリル、ピペリジニル、4-ピペリドニル、ピロリジニル、2-ピロリドニル、ピロリニル、テトラヒドロフラニル、ピス-テトラヒドロフラニル、テトラヒドロピラニル、ピス-テトラヒドロピラニル、テトラヒドロキノリニル、テトラヒドロイソキノリニル、デカヒドロキノリニル、オクタヒドロイソキノリニル、アゾチニル、トリアジニル、6H-1,2,5-チアジアジニル、2H,6H-1,5,2-ジチアジニル、チエニル、チアンスレニル、ピラニル、イソベンゾフラニル、クロメニル、キサントニル、フェノキサチニル、2H-ピロリル、イソチアゾリル、イソキサゾリル、ピラジニル、ピリダジニル、インドリジニル、イソインドリル、3H-インドリル、1H-インダゾリル、プリニル、4H-キノリジニル、フタラジニル、ナフチリジニル、キノキサリニル、キナゾリニル、チノリニル、プテリジニル、4aH-カルバゾリル、カルバゾリル、 $-$ カルボリニル、フェナンスリジニル、アクリジニル、ピリミジニル、フェナンスロリニル、フェナジニル、フェノチアジニル、フラザニル、フェノキサジニル、イソクロマニル、クロマニル、イミダゾリジニル、イミダゾリニル、ピラゾリジニル、ピラゾリニル、ペラジニル、インドリニル、イソインドリニル、キヌクリジニル、モルホリニル、オキサゾリジニル、ベンゾトリアゾリル、ベンズイソキサゾリル、オキシンドリル、ベンズオキサゾリニル、及びイサチノイルが含まれる。

30

40

「カルボシクリル基(Carbocyclyl)」には、単環として3~7の炭素原子又は二環として7~12の炭素原子を有する飽和ないしは不飽和の環が含まれる。単環の炭素環は3~

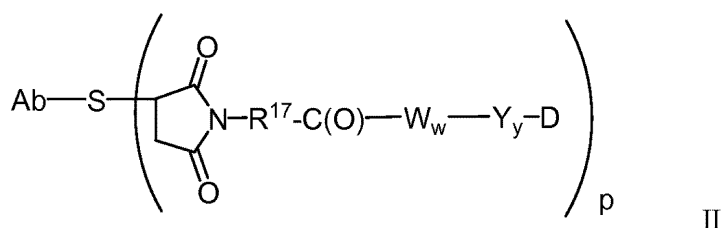
50

6の環状原子、より一般的には5又は6の環状原子を有する。二環式の炭素環は、例えばピシクロ[4,5]、[5,5]、[5,6]又は[6,6]システムとして配置した7~12の環状原子、又はピシクロ[5,6]又は[6,6]システムとして配置した9又は10の環状原子を有する。単環の炭素環の例には、シクロプロピル、シクロブチル、シクロペンチル、1-シクロペント-1-エニル、1-シクロペント-2-エニル、1-シクロペント-3-エニル、シクロヘキシル、1-シクロヘキス-1-エニル、1-シクロヘキス-2-エニル、1-シクロヘキス-3-エニル、シクロヘプチル、及びシクロオクチルが含まれる。

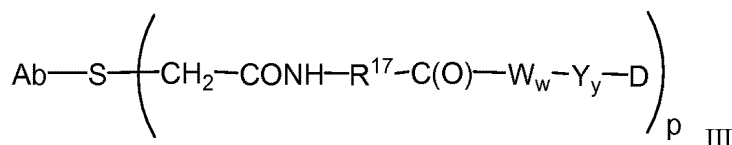
【0271】

IIからVIなどの式IのADCのすべての例示的な実施態様から、明確に示していない場合であっても、改変したシステイン残基の数に応じて、1から4の薬剤成分が抗体に連結している($p = 1 \sim 4$)ことが理解される。

10

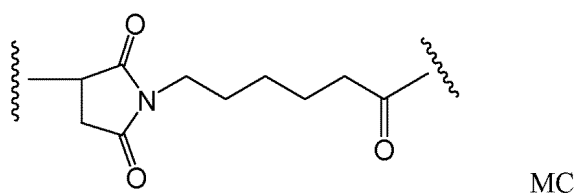


20



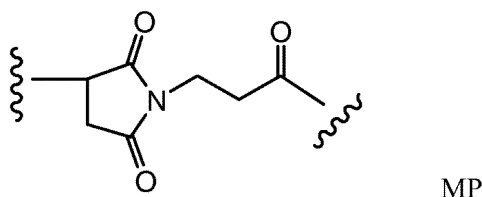
図示する式IIのストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(\text{CH}_2)_5-$ である、マレイミド-カプロイル(MC)から得られる。

30



図示する式IIのストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(\text{CH}_2)_2-$ である、マレイミド-プロパノイル(MP)から得られる。

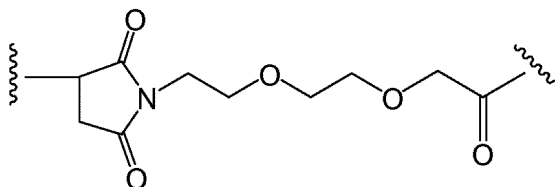
40



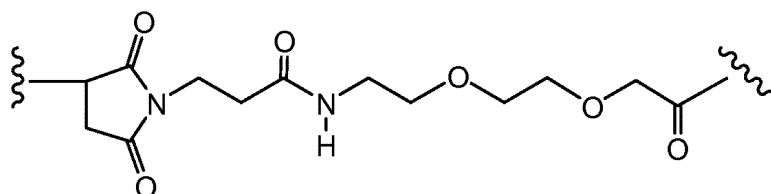
【0272】

50

他の図示する式 I I のストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2CH_2O)_r - CH_2 -$ であり、 r が 2 である。

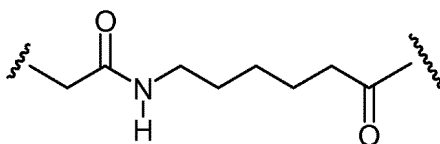


他の図示する式 I I のストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2)_r C(O)NR^b - (CH_2CH_2O)_r - CH_2 -$ であり、 R^b が H であり、各々の r が 2 である。



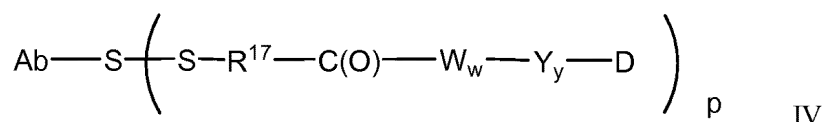
MPEG

図示する式 I I I のストレッチャーユニットは、 R^{17} が $-(CH_2)_5 -$ である。

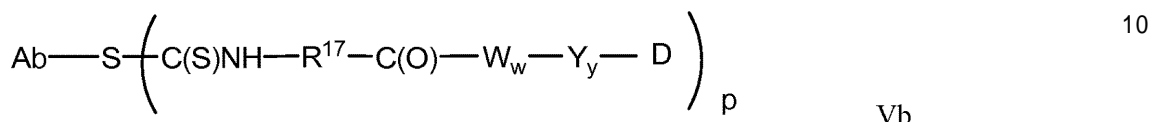
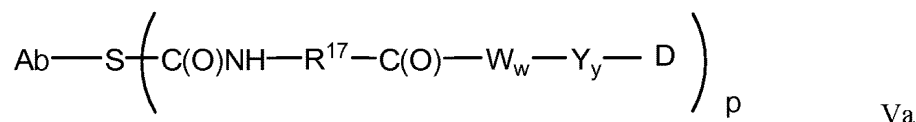


【0273】

他の実施態様では、ストレッチャーユニットは、抗体の改変されたシステイン硫黄原子とストレッチャーユニットの硫黄原子との間のジスルフィド結合により、システイン改変抗 CD22 抗体に連結する。この実施態様の代表的なストレッチャーユニットは、式 IV で表され、 R^{17} 、 $Ab-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w および y は前記に定義する通りである。



さらに他の実施態様では、ストレッチャーの反応基は、抗体の遊離したシステインチオールと結合することができるチオール反応性の官能基を含む。チオール反応性の官能基の例には、限定するものではないが、マレイミド、 α -ハロアセチル、活性エステル、例として、スクシンイミドエステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸クロリド、塩化スルホニル、イソシアネートおよびイソチオシアネートが含まれる。この実施態様の代表的なストレッチャーユニットは、式 Va および Vb に表され、このとき、 $-R^{17}-$ 、 $Ab-$ 、 $-W-$ 、 $-Y-$ 、 $-D$ 、 w および y は前記に定義した通りである。



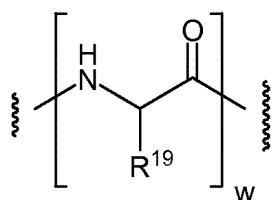
他の実施態様では、リンカーは、分岐した多機能性リンカー成分を介して一より多い薬剤成分を抗体へ共有結合的に付着させるために樹枝状型である(Sun等 (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215 ; Sun等 (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-176 ; King (2002) Tetrahedron Letters 43:1987-1990)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増やす、すなわち負荷することができ、これはADCの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は1つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着されうる。

【0274】

アミノ酸ユニット

リンカーはアミノ酸残基を含んでいてもよい。アミノ酸ユニット(-Ww-)は、存在する場合には、抗体(Ab)を本発明のシステイン改変抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)の薬剤成分(D)に連結する。

-Ww-は、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド、ペンタペプチド、ヘキサペプチド、ヘプタペプチド、オクタペプチド、ノナペプチド、デカペプチド、ウンデカペプチドまたはドデカペプチドのユニットである。アミノ酸ユニットを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びにシトルリンなどの微量アミノ酸及び天然に生じないアミノ酸類似体が含まれる。各々の-W-ユニットはそれぞれ、以下の角括弧で示す式を有し、wは、0から12の範囲の整数である。



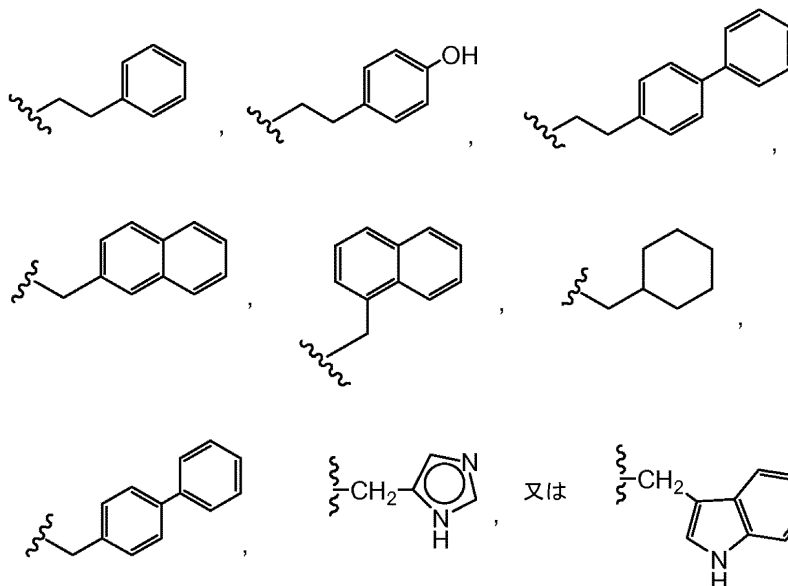
このとき、R¹⁹は、ヒドロゲン、メチル、イソプロピル、イソブチル、sec-ブチル、ベンジル、p-ヒドロキシベンジル、-CH₂OH、-CH(OH)CH₃、-CH₂CH₂SCH₃、-CH₂CONH₂、-CH₂COOH、-CH₂CH₂CONH₂、-CH₂CH₂COOH、-(CH₂)₃NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₃NH₂、-(CH₂)₃NHCOCH₃、-(CH₂)₃NHCHO、-(CH₂)₄NHC(=NH)NH₂、-(CH₂)₄NH₂、-(CH₂)₄NHCOCH₃、-(CH₂)₄NHCHO、-(CH₂)₃NHCONH₂、-(CH₂)₄NHCONH₂、-CH₂CH₂CH(OH)CH₂NH₂、2-pyridylmethyl-、3-ピリジルメチル-、4-ピリジルメチル-、フェニル、シクロヘキシル、

20

30

40

50



10

であり、

R^{19} が水素以外である場合に、 R^{19} が付着される炭素原子はキラルである。 R^{19} が付着される各々の炭素原子は、独立して(S)又は(R)配位又はラセミ混合物にある。したがって、アミノ酸ユニットは、鏡像異性的に純粋であるか、ラセミ性であるか、又はジアステレオ異性であってもよい。

20

【0275】

例示的な -Ww- アミノ酸ユニットには、ジペプチド、トリペプチド、テトラペプチド又はペンタペプチドが含まれる。例示的なジペプチドには、バリン-シトルリン(v c 又は v a l - c i t)、アラニン-フェニルアラニン(a f 又は a l a - p h e)が含まれる。例示的なトリペプチドには、グリシン-バリン-シトルリン(g l y - v a l - c i t) およびグリシン-グリシン-グリシン(g l y - g l y - g l y)が含まれる。アミノ酸リンカーを含むアミノ酸残基には、天然に生じるもの、並びにシトルリンなどの微量アミノ酸及び天然に生じないアミノ酸類似体が含まれる。

30

アミノ酸ユニットは、腫瘍関連プロテアーゼを含む一又は複数の酵素によって切断され、薬剤成分(-D)を遊離する。この薬剤成分は、一実施態様では、薬剤(D)を提供するために、放出時にインピボでプロトン化される。アミノ酸リンカー構成成分は、特定の酵素、例えば腫瘍関連プロテアーゼ、カテプシンB、C及びD、又はプラスミンプロテアーゼによって酵素的に切断されるために設定し、その選択性が最適化されうる。

【0276】

スペーサーユニット

スペーサーユニット(-Yy-)は、存在する場合($y = 1$ 又は 2)には、アミノ酸ユニットが存在する($w = 1 \sim 12$)場合に、アミノ酸ユニット(-Ww-)を薬剤部分(D)に連結する。あるいは、アミノ酸ユニットがない場合には、スペーサーユニットはストレッチャーユニットを薬剤成分に連結する。アミノ酸ユニットおよびストレッチャーユニットがともにない($w, y = 0$)場合には、スペーサーユニットも薬剤成分を抗体ユニットに連結する。スペーサーユニットは、自己犠牲型及び非自己犠牲型の2つの一般的なタイプである。非自己犠牲的なスペーサーユニットは、抗体-薬剤コンジュゲート又は薬剤成分-リンカーからアミノ酸ユニットが切断、特に酵素的に切断された後に、スペーサーユニットの一部ないしはすべてが薬剤成分に結合したままとなるものである。グリシン-グリシンスペーサーユニット又はグリシンスペーサーユニットを含むADCが腫瘍細胞関連プロテアーゼ、癌細胞関連プロテアーゼ又はリンパ球関連プロテアーゼによって酵素切断される場合、グリシン-グリシン-薬剤成分又はグリシン-薬剤成分が $A b - A_a - W w -$ から切断

40

50

される。一実施態様では、独立した加水分解反応が標的細胞の中で起こり、グリシン - 薬剤成分の結合が切断され、薬剤が遊離される。

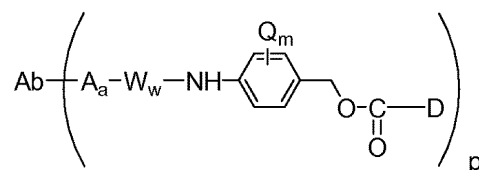
他の実施態様では、 $-Y_y-$ は、フェニレン部分が Q_m に置換している p -アミノベンジルカルバモイル(PAB)ユニットであり、このとき Q は $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-$ ハロゲン、 $-$ ニトロ、又は $-$ シアノであり、そして、 m は $0 \sim 4$ の範囲の整数である。

【0277】

非自己犠牲型スペーサーユニット($-Y-$)の例示的な実施態様は、 $-Gly-Gly-$ 、 $-Gly-$ 、 $-Ala-Phe-$ 、 $-Val-Cit-$ である。

一実施態様では、スペーサーユニットがない($y = 0$)、又は薬学的に許容可能な塩ないしはその溶媒和化合物である、薬剤成分-リンカー又はADCが提供される。

あるいは、自己犠牲的なスペーサーユニットを含むADCは $-D$ を放出しうる。一実施態様では、 $-Y-$ はPABグループのアミノ窒素原子を介して $-W_w-$ に連結されるPABグループであり、カルボナート、カルバメートまたはエーテル基を介して $-D$ に直接連結しており、このときADCは以下のような例示的な構造を有する。

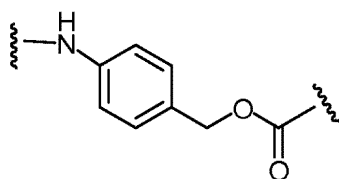


このとき、 Q は、 $-C_1-C_8$ アルキル、 $-O-(C_1-C_8$ アルキル)、 $-$ ハロゲン、 $-$ ニトロ、又は $-$ シアノであり、 m は $0 \sim 4$ の範囲の整数であり、そして、 p は 1 から 4 の範囲である。

【0278】

自己犠牲的なスペーサーの他の例には、PABグループに電子的に類似している芳香族化合物、例として、2-アミノイミダゾール-5-メタノール誘導体(Hay等 (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237)、複素環式のPAB類似体(米国公開特許2005/0256030)、 $-$ グルクロニド(国際公開2007/011968)、およびオルトないしはパラ-アミノベンジルアセタールが含まれるが、これらに限定されるものではない。アミド結合加水分解の際に環化されるスペーサー、例として、置換した、及び、置換していない4-アミノ酪酸アミド(Rodrigues等 (1995) Chemistry Biology 2:223)、適切に置換されたピシクロ[2.2.1]、及び、ピシクロ[2.2.2]環システム(Storm等 (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94: 5815)、及び2-アミノフェニルプロピオン酸アミド(Amsberry, 等 (1990) J. Org. Chem. 55:5867)などが使われてもよい。また、グリシンで置換されるアミン含有薬剤の除去(Kingsbury等 (1984) J. Med. Chem. 27:1447)は、ADCに有用な自己犠牲的なスペーサーの例である。

例示的なスペーサーユニット($-Y_y-$)を式X~XIIIに示す。



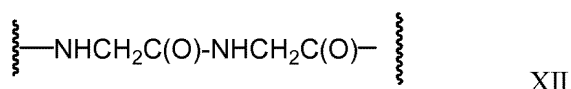
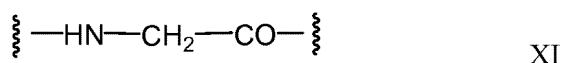
X

10

20

30

40



10

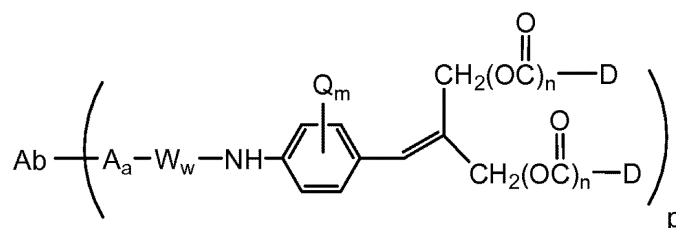
【0279】

樹枝状リンカー

他の実施態様では、リンカー L は、分岐状の、多機能リンカー成分により一又は複数の薬剤成分が抗体に共有結合するために樹枝型のリンカーであってもよい(Sun等 (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215 ; Sun等 (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768)。樹枝状のリンカーは抗体に対する薬剤のモル比を増す、すなわち負荷することができ、これはADCの力価に関連がある。したがって、システイン改変抗体は1つの反応性のシステインチオール基のみを有する場合、多くの薬剤成分が樹枝状のリンカーを介して付着されうる。分岐状の、樹枝状リンカーの例示的な実施態様には、2,6-ビス(ヒドロキシメチル)-p-クレゾールおよび2,4,6-トリス(ヒドロキシメチル)-フェノール dendrimer ユニット(国際公開2004/01993 ; Szalai等 (2003) *J. Amer. Chem. Soc.* 125: 15688-15689 ; Shamis等 (2004) *J. Amer. Chem. Soc.* 126: 1726-1731 ; Amir等 (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4494-4499)が含まれる。

20

一実施態様では、スペーサーユニットは分岐状ビス(ヒドロキシメチル)スチレン(BHMS)であり、これを用いて複数の薬剤を取り込み、放出することができ、以下の構造を有し、



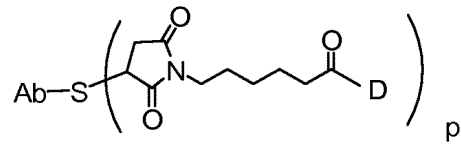
30

2-(4-アミノベンジリデン)プロパン1,3-ジオール dendrimer ユニットを含み(国際公開2004/043493 ; de Groot等 (2003) *Angew. Chem. Int. Ed.* 42: 4490-4494)、Qは、-C₁-C₈アルキル、-O-(C₁-C₈アルキル)、-ハロゲン、-ニトロ、又は-シアノであり、mは0~4の範囲の整数であり、nは0又は1であり、そして、pは1から4の範囲である。

40

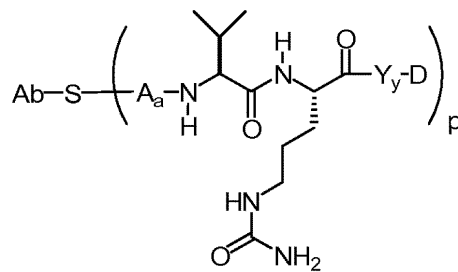
【0280】

式Iの抗体-薬剤コンジュゲート化合物の例示的な実施態様には、XIIIIa(MC)、XIIIIb(val-cit)、XIIIIc(MC-val-cit)、及びXIIII d(MC-val-cit-PAB)が含まれる。



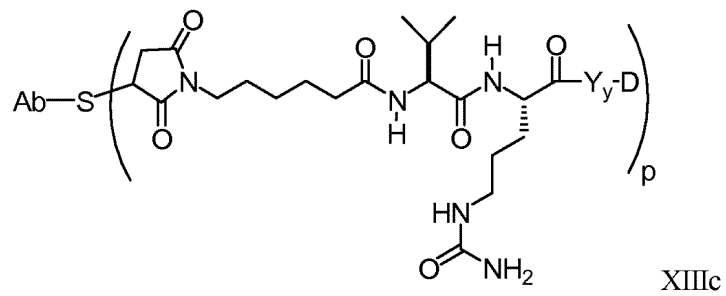
XIIIa

10



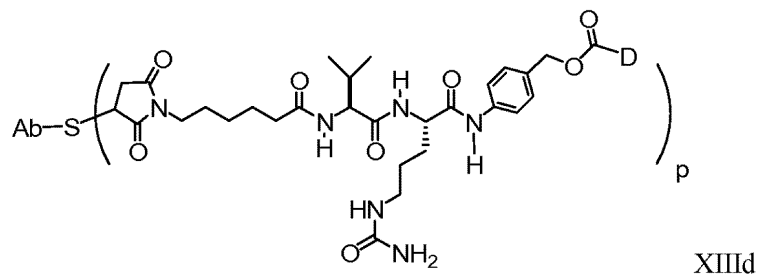
XIIIb

20



XIIIc

30

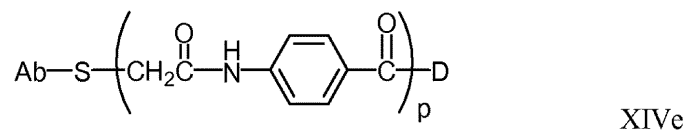
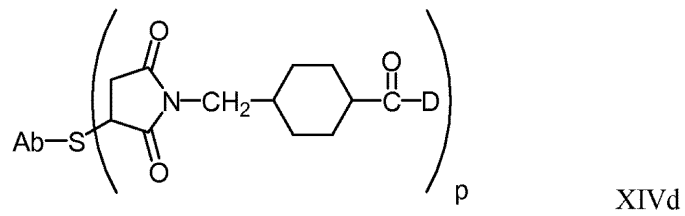
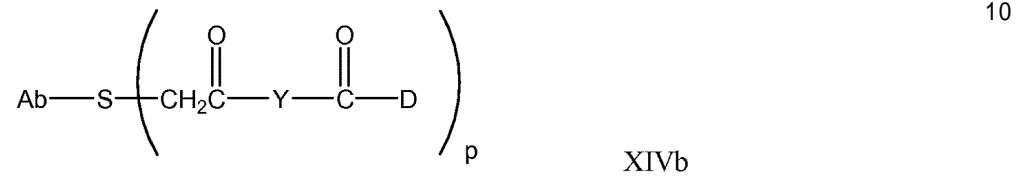
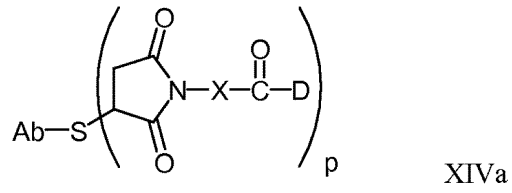


XIII d

40

【 0 2 8 1 】

式 I a の抗体 - 薬剤コンジュゲート化合物の他の例示的な実施態様には、X I V a - e が含まれる。

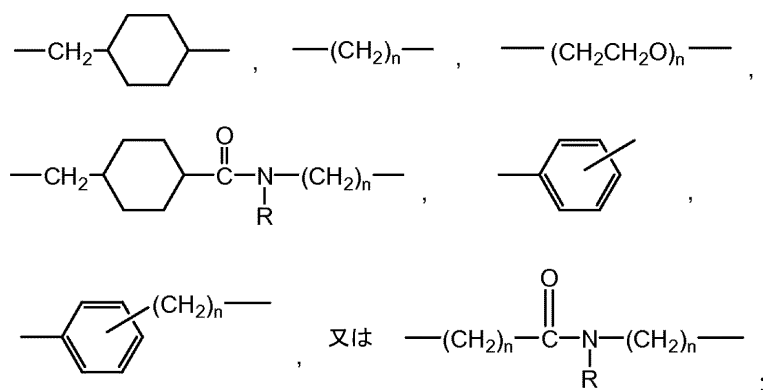


このとき、Xは以下のものであり、

10

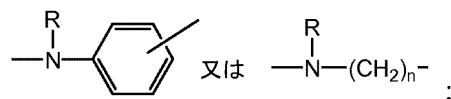
20

30



10

Y は以下の通りであり、



20

そして、R はそれぞれ H 又は C₁ - C₆ アルキルであり、そして、n は 1 ~ 12 である。

【0282】

他の実施態様では、リンカーは、抗体に存在する求電子性の基に反応することができる求核基を有する反応性の官能基を有する。抗体上の有用な求電子性の基は、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が含まれるが、これらに限定されるものではない。リンカーの求核基のヘテロ原子は抗体上の求電子性の基と反応して、抗体ユニットに共有結合することができる。リンカーの有用な求核基には、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボキシレートおよびアリアルヒドラジドが含まれるが、これらに限定されるものではない。抗体の求電子性の基は、リンカーへの付着に都合の良い部位を提供する。

30

一般的に、ペプチド - タイプのリンカーは、2 以上のアミノ酸および / またはペプチド断片間でペプチド結合を形成することによって調製されうる。このようなペプチド結合は、例えば、ペプチド化学の分野では周知である液相合成方法 (E. Schroder and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press) に従って調製されうる。リンカー中間生成物は、スペーサー、ストレッチャーおよびアミノ酸ユニットを含む反応のいずれかの組合せ又は連続によってアセンブリされてもよい。スペーサー、ストレッチャー及びアミノ酸ユニットは、天然で求電子性、求核性、又は遊離の基である反応性官能基を用いる。反応性官能基には、カルボキシル、ヒドロキシル、パラ - ニトロフェニルカルボネート、イソチオシアネート、及び O - メシル、O - トシル、- Cl、- Br、- I などの脱離基、又はマレイミドが含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

他の実施態様では、リンカーは、溶解性又は反応性を変更した基に置換されてもよい。例えば、ADC を調製するために用いる合成手段に応じて、スルホン酸 (-SO₃⁻) 又はアンモニウムなどの荷電性の置換基は、試薬の水溶性を増し、抗体又は薬剤成分とリンカー試薬とのカップリング反応を容易にしうるか、または D と Ab - L (抗体 - リンカー中間生成物) とのカップリング反応、又は Ab と D - L (薬剤 - リンカー中間生成物) とのカップリング反応を容易にしうる。

【0283】

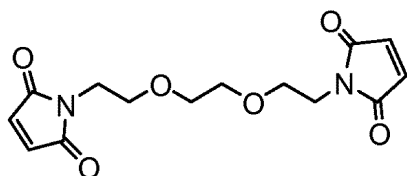
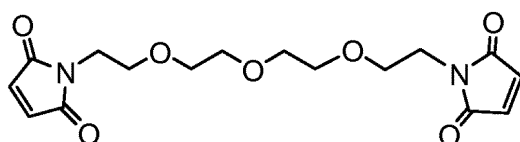
リンカー試薬

抗体とアウリスタチンとのコンジュゲートは、種々の二官能性リンカー試薬、例えば N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP)、スクシンイミジ

50

ル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシラート(SMCC)、イミノチオラン(IT)、イミドエステル類の二官能性誘導体(例えばジメチルアジピミデートHCL)、活性エステル類(例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル)、アルデヒド類(例えば、グルタルアルデヒド)、ビスアジド化合物(例えば、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン)、ビス-ジアゾニウム誘導体(例えば、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン)、ジイソシアネート(例えば、トルエン-2,6-ジイソシアネート)、及び二活性フッ素化合物(例えば、1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン)を使用して作製することができる。

また、抗体薬剤コンジュゲートは、以下のリンカー試薬、BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、S
IAB、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、及びSVSB(スクシンイミジル-(4-ビニルスルホン)ベンゾアート)、及びビスマレイミド試薬、例えばDTME、BMB、BMDB、BMH、BMOE、BM(PEO)₃、及びBM(PEO)₄にて調製されうる。これらはPierce Biotechnology, Inc., Customer Service Department, P.O. Box 117, Rockford, IL. 61105 U.S.A, U.S.A 1-800-874-3723, International +815-968-0747から市販されている。ビスマレイミド試薬により、連続した様式又は同時の様式で、チオール含有薬剤成分、標識又はリンカー中間生成物にシステイン改変抗体のチオール基が付着することができる。システイン改変抗体、薬剤成分、標識又はリンカー中間生成物のチオール基と反応することができるマレイミド以外の他の官能基には、ヨードアセトアミド、プロモアセトアミド、ビニルピリジン、ジスルフィド、ピリジジスルフィド、イソシアネートおよびイソチオシアネートが含まれる。

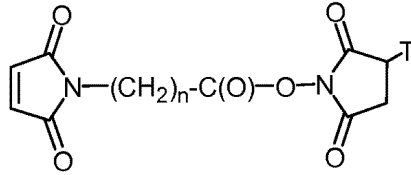
BM(PEO)₃BM(PEO)₄

【0284】

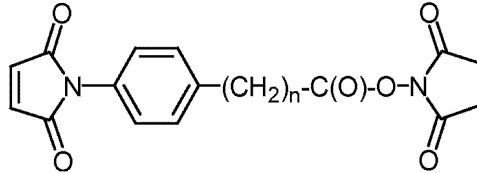
また、有用なリンカー試薬は、Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO)などの他の商業的供給源により得ることができるし、Toki等(2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch等(1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; 米国特許第6214345号; 国際公開02/088172; 米国特許公開2003130189; 米国特許公開2003096743; 国際公開03/026577; 国際公開03/043583; 及び国際公開04/032828に記載の手段に従って合成してもよい。

【0285】

式(IIIa)のストレッチャーは、以下のリンカー試薬をアミノ酸ユニットのN末端と反応させることによって、リンカーに導入することができる。

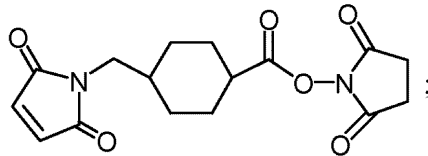


このとき n は 1 ~ 10 の範囲の整数であり、 T は - H 又は - SO_3Na であり、

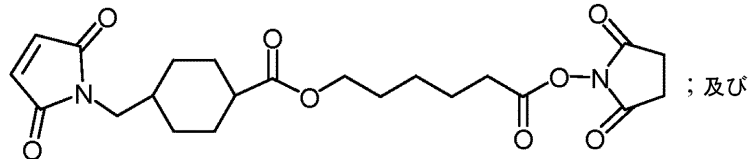
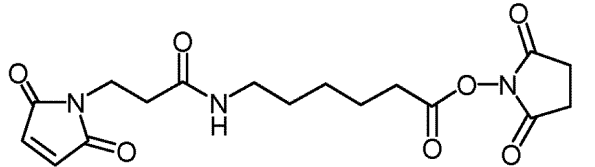


10

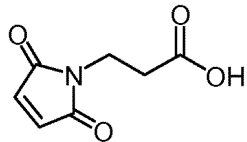
このとき n は 0 ~ 3 の範囲の整数である。



20

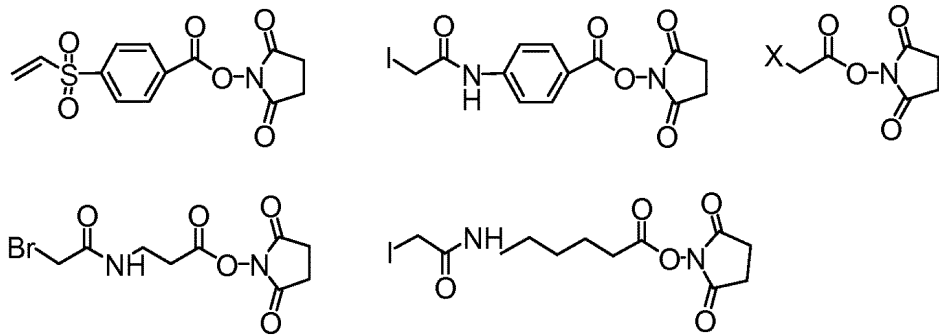


30



ストレッチャーユニットは、以下の二官能試薬をアミノ酸ユニットの N 末端と反応させることによってリンカーに導入することができる。

40

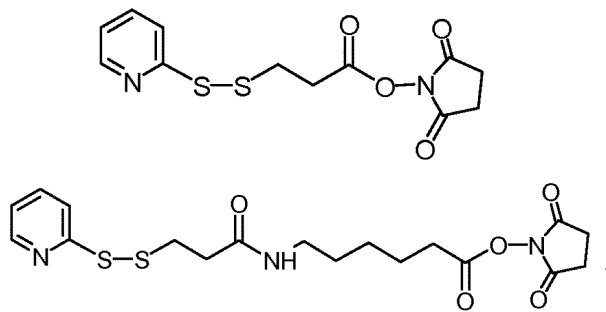


10

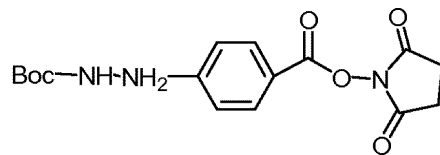
このとき X は Br 又は I である。

【0286】

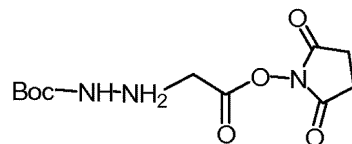
また、式のストレッチャーユニットは、以下の二官能試薬をアミノ酸ユニットの N 末端と反応させることによってリンカーに導入することができる。



20



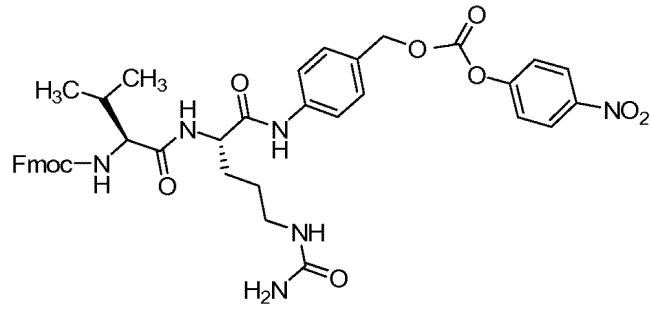
30



40

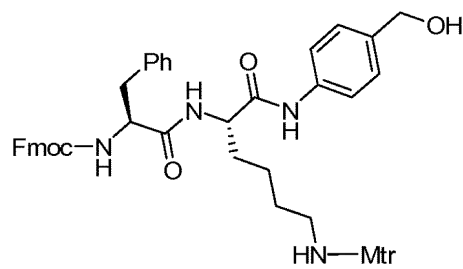
【0287】

マレイミドストレッチャーとパラ - アミノベンジルカルバモイル (P A B) 自己犠牲的スパーサーとを有する例示的なバリン - シトルリン (val - cit 又は vc) ジペプチドリナー試薬は、以下の構造を有する。



10

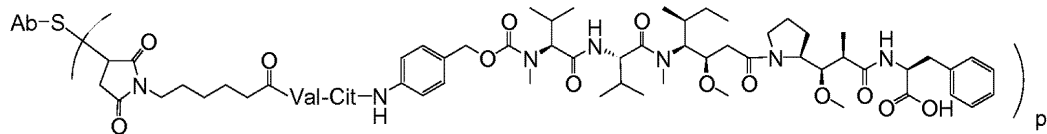
マレイミドストレッチャーユニットとPAB自己-犠牲的スペーサーユニットとを有する例示的なphe-lys(Mtr、モノ-4-メトキシトリチル)ジペプチドリンカー試薬は、Dubowchik,等(1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60に従って調製されてもよく、以下の構造を有する。



20

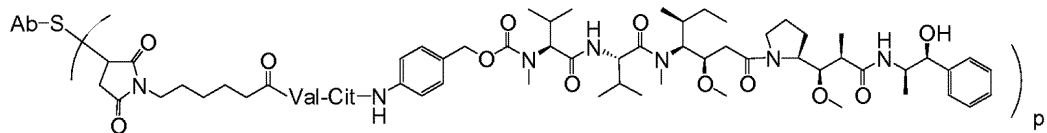
【0288】

本発明の例示的な抗体-薬剤コンジュゲート化合物には、以下のものが含まれる。



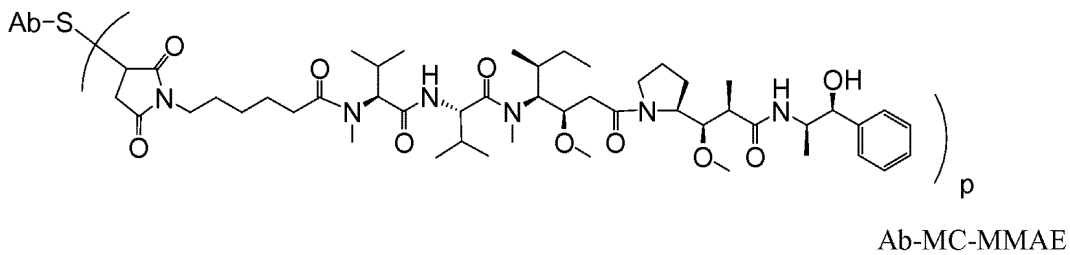
30

Ab-MC-vc-PAB-MMAF

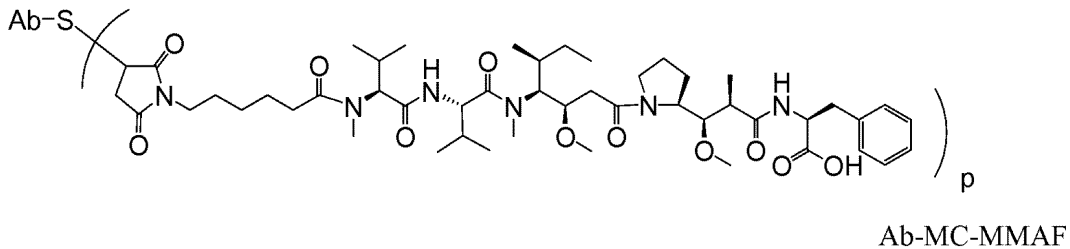


40

Ab-MC-vc-PAB-MMAE



10



20

このとき $V a l$ はバリンであり、 $C i t$ はシトルリンであり、 p は 1、2、3 又は 4 であり、そして、 $A b$ はシステイン改変抗 CD 2 2 抗体である。

【 0 2 8 9 】

システイン改変抗 CD 2 2 抗体 - 薬剤コンジュゲートの調製

式 I の A D C は、当業者に公知の有機化学的反應、条件及び試薬を用いた様々な手段、例えば、(1) システイン改変抗体のシステイン基をリンカー試薬と反応させて、共有結合によって抗体 - リンカー中間生成物 $A b - L$ を形成させ、その後に薬剤成分 D と反応させる、及び(2) 薬剤成分の求核基をリンカー試薬と反応させて、共有結合によって薬剤 - リンカー中間生成物 $D - L$ を形成させ、その後にシステイン改変抗体のシステイン基と反応させる、などによって調製されてもよい。コンジュゲート方法(1)及び(2)は、様々なシステイン改変抗体、薬剤成分及びリンカーを用いて行い、式 I の抗体 - 薬剤コンジュゲートを調製してもよい。

30

抗体システインチオール基は求核基であり、反応して、リンカー試薬及び薬剤 - リンカー中間生成物の求電子基と共有結合することができる。このリンカー試薬及び薬剤 - リンカー中間生成物には、(i) 活性エステル類、例えば N H S エステル類、H O B t エステル類、ハロギ酸類及び酸ハロゲン化物、(ii) アルキル及びベンジルハロゲン化物、例えばハロアセトアミド類、(iii) アルデヒド類、ケトン類、カルボキシル及びマレイミド基、及び(iv) スルフィド交換による、ピリジルジスルフィドを含むジスルフィドが含まれる。薬剤成分の求核基には、リンカー成分及びリンカー試薬の求電子基と共有結合するために反応することができる、アミン、チオール、ヒドロキシル、ヒドラジド、オキシム、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、ヒドラジンカルボン酸エステルおよびアリールヒドラジド基が含まれるが、これらに限定されるものではない。

40

【 0 2 9 0 】

システイン改変抗体は、D T T (クリーランド試薬、ジチオトレイトール)又は T C E P (トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンヒドロクロライド; Getz等 (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA)などの還元剤にて処理した後に、鎖間及び鎖内のジスルフィド結合を再形成させるために再酸化させることによって、リンカー試薬とのコンジュゲートに対して反応性にしてもよい(実施例 x)。例えば、C H O 細胞に発現される完全長のシステイン改変モノクローナル抗体(T h i o M a b)を、新たに導入したシステイン残基と培養培地中に存在するシステインとの間で形成しうるシステイ

50

ン付加物のジスルフィド結合を還元するために、およそ50倍の過剰なTCEPにて37で3時間かけて還元する。還元されたThioMabを希釈して、10mM酢酸ナトリウム、pH5にてHiTrapSカラムに流し、0.3M塩化ナトリウムを含むPBSにて溶出する。希釈(200nM)硫酸銅水(CuSO₄)、室温に終夜置くことにより親Mabに存在するシステイン残基間にジスルフィド結合が再構築された。あるいは、デヒドロアスコルビン酸(DHAA)は、システイン付加物の還元分解反応の後にシステイン改変抗体の鎖内ジスルフィド基を再構築させるための有効な酸化体である。当分野で公知の他の酸化体、すなわち酸化剤および酸化条件が用いられてもよい。外気酸化も有効である。この低刺激性の部分的な再酸化工程により、高品位の鎖内ジスルフィドが効率よく形成され、新たに導入されたシステイン残基のチオール基が維持される。およそ10倍過剰な薬剤-リンカー中間生成物、例えばMC-vc-PAB-MMAEを添加し、混合して、室温におよそ1時間置いて、コンジュゲートに作用させ、10F4v3抗CD22抗体-薬剤コンジュゲートを形成させた。コンジュゲート混合物をゲル濾過し、HiTrapSカラムに流して溶出させ、過剰な薬剤-リンカー中間生成物と他の不純物を除去した。

【0291】

図12は、コンジュゲートのために細胞培養物から発現されるシステイン改変抗体を調製するための一般的な方法を示す。細胞培養培地にシステインを含む場合、新たに導入されたシステインアミノ酸と培地のシステインとの間にジスルフィド付加物が形成しうる。これらのシステイン付加物(図12の例示的なThioMab(左)に示す)は、コンジュゲートのために反応するシステイン改変抗体を生成するために還元されなければならない。システイン付加物は、おそらく様々な鎖間ジスルフィド結合とともに、TCEPなどの還元剤によって抗体の還元型を生じさせるために、還元により切断される。対形成したシステイン残基間の鎖間ジスルフィド結合は、硫酸銅、DHAA又は周囲酸素への曝露による不完全酸化条件下で再形成される。新たに導入され、改変され、対形成しないシステイン残基は、リンカー試薬や薬剤-リンカー中間生成物と反応して本発明の抗体コンジュゲートを形成するために利用されうる状態にある。哺乳類の細胞株において発現されるThioMabは、-S-S-結合形成によって外部からコンジュゲートされた改変CysへのCys付加物となる。したがって、精製されたThioMabを、実施例Xに記載の還元及び再酸化の手順にて処理して、反応性のThioMabsを生産する。これらのThioMabを用いて、細胞障害性剤、蛍光体および他の標識を含むマレイミドとコンジュゲートさせる。

【0292】

スクリーニング方法

本発明の更なる他の実施態様は、CD22ポリペプチドを含むと思われる試料においてCD22ポリペプチドの存在を決定する方法であって、CD22ポリペプチドに結合するシステイン改変抗CD22抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートに該試料を曝し、システイン改変抗CD22抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートの該試料中のCD22ポリペプチドへの結合を決定することを含み、この結合が存在する場合に該試料においてCD22ポリペプチドの存在が示される方法に関する。場合によって、前記試料は、CD22ポリペプチドを発現すると思われる細胞(癌細胞でもよい)を含みうる。前記方法に用いられるシステイン改変抗CD22抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートは、場合によって、検出可能に標識されても、固体支持体に付着されなどしていてもよい。

本発明の他の実施態様は、哺乳動物における腫瘍の存在を診断する方法であって、(a)該哺乳動物から得た組織細胞を含む試験試料を、CD22ポリペプチドに結合するシステイン改変抗CD22抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートと接触させ、(b)試験試料中において、システイン改変抗CD22抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートとCD22ポリペプチドとの複合体の形成を検出することを含み、複合体が形成される場合に該哺乳動物での腫瘍の存在が示される方法に関する。場合によって、システイン改変抗CD22抗体又はこの抗体薬剤コンジュゲートは、検出可能に標識されるか、固体支持体に付着されなどし、及び/又は組織細胞の試験試料は癌性腫瘍を有すると思われる個体から得られる。

【0293】

抗体-薬剤コンジュゲートの代謝産物

代謝産物が先行技術に対して新規性及び非自明性を有する限りにおいて、本明細書中に記載のADC化合物のインビボ代謝産物も、本発明の権利内である。このような生成物は、投与された化合物の、例えば酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素切断などから生じうる。したがって、本発明は、代謝産物が生じるために十分な時間、本発明の化合物を哺乳動物と接触させることを含む方法によって生成される新規の自明でない化合物を包含する。

典型的には、代謝産物は、放射性標識した(例えば ^{14}C 又は ^3H)ADCを調製して、ラット、マウス、モルモット、サルなどの動物又はヒトに検出可能な用量(例えば、およそ 0.5mg/kg 以上)で非経口投与し、代謝が生じるために十分な時間(典型的にはおよそ30秒から30時間)をおいて、尿、血液又は他の生体試料から変換生成物を単離することによって同定される。標識されているので、これら生成物は容易に単離される(他のものは、代謝産物中に残っているエピトープを結合することができる抗体を用いて単離される)。代謝産物の構造は従来の様式、例えばMS、LC/MS又はNMR分析によって決定される。通常、当分野の技術者に周知の従来薬物代謝研究と同じ方法で代謝産物の分析が行われる。インビボで見られない限り、変換生成物は本発明のADC化合物の治療的投薬のための診断検査法において有用である。

【0294】

薬学的製剤

Thio-抗体薬剤コンジュゲートを含む抗体-薬剤コンジュゲートの投与

thio-抗体薬剤コンジュゲート(TDC)を含む本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は、治療される症状に適切な任意の手段によって投与されてもよい。典型的にADCは、非経口的に、すなわち注入、皮下、筋肉内、静脈内、皮内、くも膜下腔内および硬膜外投与される。

これらの癌を治療するために、一実施態様では、抗体-薬剤コンジュゲートは静脈内注入により投与される。注入により投与される用量は、1用量当たりおよそ $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $10000\mu\text{g}/\text{m}^2$ の範囲で、一般に週1回、合計1、2、3又は4回の用量である。あるいは、用量範囲は、およそ $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $1000\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $800\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $600\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $400\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $500\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $300\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およそ $10\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $200\mu\text{g}/\text{m}^2$ 、およびおよそ $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $200\mu\text{g}/\text{m}^2$ である。投薬は、1日1回、1週間に1回、1週間に複数回(1日1回より少ない)、1か月に複数回(1日1回より少ない)、1か月に複数回(1週間に1回より少ない)、1か月に1回又は疾患の症状が寛解又は緩和するように間欠的に投与されてもよい。投与は、腫瘍又はリンパ腫の症状、治療される白血病が寛解するまで開示したいずれかの間隔で継続されてもよい。このような寛解又は軽減がこのような継続的な投与によって延長される症状の寛解又は軽減が達成される後に、投与を続けてもよい。

【0295】

また、本発明は、自己免疫性疾患に罹っている患者に、治療的に有効な量の前記実施態様のいずれか一のヒト化10F4抗体-薬剤コンジュゲートを投与することを含む、自己免疫性疾患の緩和方法を提供する。好ましい実施態様では、抗体は、静脈内または皮下に投与される。抗体-薬剤コンジュゲートは1用量につきおよそ $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $100\text{mg}/\text{m}^2$ の範囲の用量で静脈内投与され、そして具体的な実施態様では、用量は $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $500\mu\text{g}/\text{m}^2$ である。投薬は、1日1回、1週間に1回、1週間に複数回(1日1回より少ない)、1か月に複数回(1日1回より少ない)、1か月に複数回(1週間に1回より少ない)、1か月に1回又は疾患の症状が寛解又は緩和するように間欠的に投与されてもよい。投与は、治療される自己免疫性疾患の症状が寛解又は緩和するまで開示したいずれかの間隔で継続されてもよい。このような寛解又は軽減がこのような継

10

20

30

40

50

続的な投与によって延長される症状の寛解又は軽減が達成される後に、投与を続けてもよい。

また、本発明は、B細胞増殖性疾患(リンパ腫及び白血病を含むがこれらに限定するものではない)又は自己免疫性疾患などのB細胞疾患を患っている患者に、治療的に有効な量の前記実施態様のいずれか一に記載のヒト化10F4抗体であって、細胞障害性分子や検出可能な分子にコンジュゲートされていない抗体を投与することを含むB細胞疾患の治療方法を提供する。抗体は一般的に、およそ $1\mu\text{g}/\text{m}^2$ からおよそ $1000\text{mg}/\text{m}^2$ の用量範囲で投与されるであろう。

【0296】

一態様では、本発明はさらに、少なくとも一の本発明の抗CD22抗体及び/又は少なくとも一のこのイムノコンジュゲート及び/又は少なくとも一の本発明の抗CD22抗体-薬剤コンジュゲートを含有する薬学的製剤を提供する。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、1)抗CD22抗体及び/又は抗CD22抗体-薬剤コンジュゲート及び/又はこのイムノコンジュゲートと、2)薬学的許容性のある担体とを含有する。いくつかの実施態様では、薬学的製剤は、1)抗CD22抗体及び/又はこのイムノコンジュゲートと、場合によって2)少なくとも一の付加的治療剤とを含有する。

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲート又は本発明の抗体-薬剤コンジュゲートを含んでなる治療用製剤は、所望の純度を持つ抗体又は抗体-薬剤コンジュゲートと、場合によっては生理学的に許容される担体、賦形剤又は安定化剤を混合することにより(Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980))、水溶液又は凍結乾燥又は他の乾燥製剤の形態に調製されて保存される。許容される担体、賦形剤又は安定化剤は、用いられる用量と濃度でレシピエントに非毒性であり、ホスフェート、シトレート、ヒスチジン及び他の有機酸等のバッファー；アスコルビン酸及びメチオニンを含む酸化防止剤；保存料(例えばオクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロリド；ベンザルコニウムクロリド、ベンズエトニウムクロリド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；メチル又はプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール)；低分子量(約10残基未満)のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、又は免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリシン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、又はデキストリンを含む単糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTA等のキレート化剤；スクロース、マンニトール、トレハロース又はソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体(例えば、Zn-タンパク質複合体)；及び/又はTWEENTM、PLURONICSTM又はポリエチレングリコール(PEG)等の非イオン性界面活性剤を含む。インピボ投与に用いられる薬学的製剤は一般に滅菌されている。これは滅菌濾過メンブレンによる滅菌によって容易に達成される。

【0297】

また活性成分は、例えばコアセルベーション技術あるいは界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えばそれぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ-(メタクリル酸メチル)マイクロカプセルに、コロイド状ドラッグデリバリー系(例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフィア、マイクロエマルジョン、ナノ-粒子及びナノカプセル)に、あるいはマクロエマルジョンに捕捉させてもよい。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

徐放性調合物を調製してもよい。徐放性調合物の好ましい例は、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートを含む疎水性固体ポリマーの半透性マトリクスを含み、そのマトリクスは成形物、例えばフィルム又はマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリクスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル(例えば、ポリ(2-ヒドロキシエチルメタクリレート)、又はポリ(ビニルアルコール))、ポリラクチド(米国特許第3773919号)、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタメートのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-

10

20

30

40

50

グリコール酸コポリマー、例えばLUPRON DEPOT™(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドからなる注射可能なマイクロスフィア)、及びポリ-D-(-)-3-ヒドロキシブチル酸が含まれる。エチレン-酢酸ビニル及び乳酸-グリコール酸等のポリマーは、分子を100日以上かけて放出することを可能にするが、ある種のヒドロゲルはタンパク質をより短い時間で放出する。カプセル化された抗体ないしイムノコンジュゲートが体内に長時間残ると、37の水分に暴露された結果として変性又は凝集し、生物活性を喪失させ免疫原性を変化させるおそれがある。合理的な戦略を、関与するメカニズムに応じて安定化のために案出することができる。例えば、凝集機構がチオ-ジスルフィド交換による分子間S-S結合の形成であることが見いだされた場合、安定化はスルフヒドリル残基を修飾し、酸性溶液から凍結乾燥させ、水分含有量を制御し、適当な添加剤を使用し、また特定のポリマーマトリクス組成物を開発することによって達成されうる。

【0298】

抗体-薬剤コンジュゲート治療

本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)を用いて、例えば腫瘍抗原の過剰発現に特徴がある様々な疾患ないしは疾病を治療することが考慮される。例示的な症状又は過剰増殖性疾患には、良性ないし悪性の腫瘍；白血病およびリンパ系の悪性腫瘍が含まれる。他には、神経系、神経膠、星状性、視床下部、腺性、マクロファージ性、上皮性、間質性、胚盤胞性、炎症性、血管形成性、及び、自己免疫性を含む免疫性の疾患が含まれる。

動物モデルおよび細胞に基づくアッセイにおいて同定されるADC化合物はさらに、腫瘍を有する高次霊長類及びヒトの臨床試験で試験されうる。ヒトの臨床試験は、B細胞増殖性疾患、例えば限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫を経験する患者において、本発明の抗CD22モノクローナル抗体ないしイムノコンジュゲートの有効性を試験するために設定されうる。臨床試験は、公知の治療的投薬計画、例えば放射線および/または公知の化学療法剤および/または細胞障害性剤を伴う化学療法と組み合わせるADCの有効性を評価するように設定されてもよい。

【0299】

通常、治療される疾患ないし疾病は、過剰増殖性疾患、例えばB細胞増殖性疾患および/またはB細胞癌である。本明細書中で治療される癌の例には、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択されるB細胞増殖性疾患が含まれる。

癌はCD22発現細胞を含んでおり、本発明のADCは癌細胞に結合することが可能である。癌のCD22発現を決定するために、様々な診断用/予後用のアッセイが利用できる。一実施態様では、CD22過剰発現はIHCによって分析されてもよい。腫瘍生検のパラフィン包埋組織切片はIHCアッセイに用い、試験した腫瘍細胞の割合や染色の程度に関して、CD22タンパク質染色強度判定基準に照らし合わせてもよい。

【0300】

疾患の予防又は治療のために、ADCの好適な用量は、上記のように、治療する疾患のタイプ、疾患の重症度及び経過、分子を予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体への応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。分子は一時的又は一連の治療にわたって好適に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約1µg/kg~15mg/kg(例えば0.1~20mg/kg)の分子が、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初回候補用量である。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約1µg/kg~約100mg/kg以上の範囲であろう。患者に投与されるADCの例示的な用量は、およそ0.1からおよそ10mg/kg患者体重kgの範囲である。

10

20

30

40

50

症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。例示的な用量投薬計画は、およそ4 mg / kgの初回負荷投与量の後に、およそ2 mg / kgの抗ErbB2抗体の維持用量を毎週投与することを含む。他の投与計画が有用でもよい。この治療の経過は従来技術及びアッセイにより容易にモニターされる。

【0301】

併用療法

本発明の抗体-薬剤コンジュゲート(ADC)は、薬学的組合せ製剤又は併用療法としての用量投薬計画において、抗癌性質を有する第二の化合物を組み合わされてもよい。薬学的併用製剤又は用量投薬計画の第二の化合物は、それらが互いに悪影響を与えないように、併用のADCに対して相補的な活性を有するのが好ましい。

第二の化合物は、化学療法剤、細胞障害性剤、サイトカイン、増殖阻害性剤、抗ホルモン剤および/または心臓保護剤であってもよい。このような分子は、意図する目的のために有効である量で好適に組み合わせられる。また、本発明のADCを含有する製薬的組成物は、治療的に有効な量の化学療法剤、例えばチューブリン形成インヒビター、トポイソメラーゼインヒビター又はDNA結合剤を有してもよい。

一態様では、第一の化合物は本発明の抗CD22 ADCであり、第二の化合物は抗CD20抗体(ネキッド抗体ないしはADC)である。一実施態様では、第二の化合物は、抗CD20抗体リツキシマブ(リツキサン(登録商標))又は2H7(Genentech, Inc., South San Francisco, CA)である。本発明の抗CD22 ADCとの併用免疫療法に有用な他の抗体には、抗VEGF(例えば、アバスチン(登録商標))が挙げられるが、これに限定されるものではない。

【0302】

他の治療的投薬計画は、放射線療法および/または骨髄および末しょう血液移植、および/または細胞障害性剤、化学療法剤又は増殖阻害性剤を含むがこれらに限定されない本発明に従って同定される抗癌剤の投与と組み合わせられてもよい。前記のうちの一実施態様では、化学療法剤は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルビシン、アドリアマイシン、ドキシソルビシン、ピンクリスチン(オンコピンTM)、プレドニゾロン、CHOP、CVPないしはCOP、又は抗CD20(例えばリツキサン(登録商標))ないしは抗VEGF(例えばアバスチン(登録商標))などの免疫治療法などの薬剤又は薬剤の組合せである。併用療法は同時又は連続的な投薬計画として投与されてもよい。連続して投与される場合、組合せは2以上の投与で投与されてもよい。組合せ投与には、別々の製剤又は単一の製薬的製剤を用いての同時投与や、いずれかの順序での連続投与が含まれ、このとき、両方(又はすべて)の活性剤が同時にその生物学的活性を及ぼす一定時間があるのが好ましい。

一実施態様では、ADCによる治療は、本明細書において同定される抗癌剤、および異なる化学療法剤の混合物の同時投与を含む一又は複数の化学療法剤又は増殖阻害性剤の併用投与を伴う。化学療法剤には、タキサン(例えばバクリタキセルおよびドセタキセル)および/またはアンスラサイクリン抗生物質が含まれる。このような化学療法剤のための調製や投薬計画は、製造業者の指示に従って使われてもよいし、又は経験的に熟練した専門家によって測定されうる。このような化学療法の調製や投薬計画は、"Chemotherapy Service", (1992) Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.にも記載される。

【0303】

前記いずれかの同時投与される薬剤の好適な用量は現在用いられている通りでもよいし、新規に同定される薬剤と他の化学療法剤ないしは治療の組み合わせられる作用(相乗)に応じて低くしてもよい。

併用療法により「相乗効果」が生じ得、「相乗的」、すなわち、同時に用いた活性成分が別々に該化合物を用いて生じる効果の合計よりも多い場合に生じる効果が生じうる。活性成分が、(1) 組み合わせた単位用量製剤に同時に製剤化され、投与されるか、又は同時に送達される場合、(2) 別々の製剤として交互に又は同時に送達される場合、または、(3

) いくつかの他の投薬計画によってなされる場合に、相乗効果が達成されうる。交替療法で送達される場合、例えば異なる注射器での異なる注入によって、化合物が投与されるかまたは順次送達される場合に、相乗効果が達成されてもよい。通常は、交替療法の間、各々の活性成分の有効用量は順次、すなわち連続的に投与されるのに対して、併用療法では、2以上の活性成分の有効用量は一緒に投与される。

【0304】

抗体-薬剤コンジュゲートの代謝産物

代謝産物が先行技術に対して新規性及び非自明性を有する限りにおいて、本明細書中に記載のADC化合物のインビボ代謝産物も、本発明の権利内である。このような生成物は、投与された化合物の、例えば酸化、還元、加水分解、アミド化、エステル化、酵素切断などから生じうる。したがって、本発明は、代謝産物が生じるために十分な時間、本発明の化合物を哺乳動物と接触させることを含む方法によって生成される新規の自明でない化合物を包含する。

典型的には、代謝産物は、放射性標識した(例えば ^{14}C 又は ^3H)ADCを調製して、ラット、マウス、モルモット、サルなどの動物又はヒトに検出可能な用量(例えば、およそ 0.5mg/kg 以上)で非経口投与し、代謝が生じるために十分な時間(典型的にはおよそ30秒から30時間)をおいて、尿、血液又は他の生体試料から変換生成物を単離することによって同定される。標識されているので、これら生成物は容易に単離される(他のものは、代謝産物中に残っているエピトープを結合することができる抗体を用いて単離される)。代謝産物の構造は従来の様式、例えばMS、LC/MS又はNMR分析によって決定される。通常、当分野の技術者に周知の従来薬物代謝研究と同じ方法で代謝産物の分析が行われる。インビボで見られない限り、変換生成物は本発明のADC化合物の治療的投薬のための診断検査法において有用である。

【0305】

抗CD22抗体及びイムノコンジュゲートの更なる使用方法

診断法と検出の方法

一態様では、本発明の抗CD22抗体及びイムノコンジュゲートは、生体試料中のCD22の存在を検出するために有用である。本明細書中で用いる「検出する」なる用語は、定量的又は定性的な検出を包含する。ある実施態様では、生体試料は、細胞又は組織を含む。ある実施態様では、このような組織には、他の組織、例えばB細胞及び/又はB細胞関連組織と比較して高いレベルでCD22を発現する正常及び/又は癌性組織が含まれる。

一態様では、本発明は、生体試料中のCD22の存在を検出する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、CD22への抗CD22抗体の結合に許容される条件下で抗CD22抗体と生体試料を接触させ、抗CD22抗体とCD22との間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。

【0306】

一態様では、本発明は、CD22の発現増加と関係している疾患を診断する方法を提供する。ある実施態様では、前記方法は、抗CD22抗体と試験細胞を接触させ、CD22への抗CD22抗体の結合を検出することによって試験細胞によるCD22の発現レベル(量的に又は質的に)を測定し、そして、試験細胞によるCD22の発現レベルをコントロール細胞(例えば、試験細胞と同じ組織起源の正常細胞、又はこの正常細胞と同等のレベルでCD22を発現する細胞)によるCD22の発現レベルと比較することを含み、コントロール細胞と比べて試験細胞によるCD22の発現レベルが高い場合にCD22の発現の増加に関連する細胞増殖性疾患の存在が示される。ある実施態様では、試験細胞は、CD22の発現の増加に関連する疾患があると疑われる患者から得られる。ある実施態様では、前記疾患は、癌又は腫瘍などの細胞増殖性疾患である。

本発明の抗体を用いて診断されうる例示的な細胞増殖性疾患には、B細胞疾患及び/又はB細胞増殖性疾患、例として限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NH

L、抵抗性低悪性度 NHL、慢性リンパ球性白血病 (CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病 (HCL)、急性リンパ球性白血病 (ALL) およびマントル細胞リンパ腫が含まれる。

【0307】

ある実施態様では、上記のような診断ないし検出の方法は、表面に CD22 を発現する細胞から得た膜調製物中又は細胞の表面において発現される CD22 に対する抗 CD22 抗体の結合を検出することを含む。ある実施態様では、前記方法は、CD22 への抗 CD22 抗体の結合に許容される条件下で抗 CD22 抗体と細胞を接触させ、抗 CD22 抗体と細胞表面上の CD22 との間に複合体が形成されるか否かを検出することを含む。細胞の表面上に発現された CD22 への抗 CD22 抗体の結合を検出するための例示的なアッセイは「FACS」アッセイである。

ある他の方法は、CD22 に対する抗 CD22 抗体の結合を検出するために用いてもよい。前期の方法には、限定するものではないが、当分野で周知である抗原-結合アッセイ、例えばウェスタンブロット、放射性免疫アッセイ、ELISA (抗体結合免疫吸着検定)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテイン A イムノアッセイ、及び免疫組織化学 (IHC) が含まれる。

ある実施態様では、抗 CD22 抗体は標識される。標識には、限定するものではないが、直接検出される標識又は分子 (例えば、蛍光、発色、高電子密度、化学発光、及び放射性標識)、並びに、例えば酵素反応又は分子相互作用によって間接的に検出される酵素ないしはリガンドなどの分子が含まれる。例示的な標識には、限定するものではないが、放射性同位体である ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^{125}I 、 ^3H 及び ^{131}I 、フルオロフォア、例えば希有土類キレート又はフルオレセイン及びその誘導体、ローダミン及びその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルシフェラーゼ、例えばホタルルシフェラーゼ及び細菌ルシフェラーゼ (米国特許第 4737456 号)、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタルアジネジオン (dihydrophthalazinediones)、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP)、アルカリホスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リソチーム、サッカライドオキシダーゼ、例えばグルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ及びグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、複素環のオキシダーゼ、例えばウリカーゼ及びキサンチンオキシダーゼ、HRP、ラクトペルオキシダーゼ又はマイクロペルオキシダーゼなどの色素前駆体を酸化するために水素ペルオキシダーゼを用いる酵素とカップリングさせたもの、ビオチン/アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定した遊離基などが含まれる。

【0308】

ある実施態様では、抗 CD22 抗体は不溶性基質に固定される。固定化は、溶液中で遊離したままであるいずれかの CD22 から抗 CD22 抗体を分離することを伴う。これは従来、水不溶性基質ないしは表面に吸着させる (Bennich 等, 米国特許第 372760 号) 又は共有的にカップリングさせる (例えば、グルタルアルデヒド架橋結合を使用する) などしてアッセイ手順の前に抗 CD22 抗体を不溶化するか、又は抗 CD22 抗体と CD22 との複合体の形成の後に、例えば免疫沈降によって抗 CD22 抗体を不溶化することによって達成される。

診断ないし検出の上記いずれかの実施態様は、抗 CD22 抗体の代わりに、ないしは抗 CD22 抗体に加えて本発明のイムノコンジュゲートを用いて行われうる。

【0309】

治療法

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、例えばインビトロ、エクスピボ、及びインピボの治療法で使われてもよい。一態様では、本発明は、CD22 へのイムノコンジュゲートの結合が許容される条件下で抗 CD22 抗体ないしはそのイムノコンジュゲートに細胞を曝すことを含む、インピボ又はインビトロでの細胞の成長ないしは増殖を阻害するための方法を提供する。「細胞成長又は増殖を阻害する」ことは、細胞の成長ないしは増殖を少なくとも 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、9

10

20

30

40

50

0%、95%又は100%低減することを意味し、細胞死を誘導することを含む。ある実施態様では、細胞は腫瘍細胞である。ある実施態様では、細胞はB細胞である。ある実施態様では、細胞は、例えば本明細書中に例示したような異種移植片である。

一態様では、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、B細胞増殖性疾患を治療するか又は予防するために用いる。ある実施態様では、細胞増殖性疾患は、CD22の発現及び/又は活性の増加と関係している。例えば、ある実施態様では、B細胞増殖性疾患は、B細胞の表面上のCD22の発現増加と関係している。ある実施態様では、B細胞増殖性疾患は腫瘍又は癌である。本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートによって処置されるB細胞増殖性疾患の例には、限定するものではないが、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫が含まれる。

【0310】

一態様では、本発明は、抗CD22抗体ないしそのイムノコンジュゲートの有効量を個体に投与することを含むB細胞増殖性疾患を治療するための方法を提供する。ある実施態様では、B細胞増殖性疾患を治療するための方法は、抗CD22抗体又は抗CD22イムノコンジュゲートと、場合によって以下に挙げるような少なくとも一の付加的治療剤とを含有する薬学的製剤の有効量を個体に投与することを含む。ある実施態様では、細胞増殖性疾患を治療するための方法は、1) 抗CD22抗体と細胞障害性剤とを含むイムノコンジュゲートと、場合によって2) 以下に挙げるような少なくとも一の付加的治療剤とを含有する薬学的製剤の有効量を個体に投与することを含む。

一態様では、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの少なくともいくつかは、ヒト以外の種のCD22を結合しうる。したがって、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは、例えば、CD22を含む細胞培養物において、ヒトにおいて、又は、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートが交差反応するCD22を有する他の哺乳動物(例えばチンパンジー、ヒヒ、マーモセット、カニクイザル及びアカゲザル、ブタ又はマウス)においてCD22を結合するために用いてもよい。一実施態様では、抗CD22抗体ないしイムノコンジュゲートは、イムノコンジュゲートのコンジュゲートした細胞毒素が細胞内部に送達するように、CD22を抗体ないしイムノコンジュゲートと接触させて抗体ないしイムノコンジュゲート-抗原複合体を形成させることによってB細胞上のCD22をターゲティングするために使われてもよい。一実施態様では、CD22はヒトCD22である。

【0311】

一実施態様では、抗CD22抗体ないしイムノコンジュゲートは、個体のCD22が結合されるように抗体ないしイムノコンジュゲートを個体に投与することを含む、CD22発現及び/又は活性の増加と関係する疾患を患っている個体において抗体を結合させるための方法に用いられうる。一実施態様では、結合した抗体ないしイムノコンジュゲートはCD22を発現するB細胞内に取り込まれる。一実施態様では、CD22はヒトのCD22であり、個体はヒト個体である。あるいは、個体は、抗CD22抗体が結合するCD22を発現している哺乳動物であってもよい。また更に、個体は、CD22が(例えば、CD22の投与によって、又はCD22をコードする導入遺伝子の発現によって)導入された哺乳動物であってもよい。

抗CD22抗体ないしイムノコンジュゲートは、治療目的のためにヒトに投与されうる。さらに、抗CD22抗体ないしイムノコンジュゲートは、獣医学の目的のため又はヒト疾患の動物モデルとして、抗体が交差反応するCD22を発現する非ヒト哺乳動物(例えば、霊長類、ブタ、ラット又はマウス)に投与されうる。後者に関して、このような動物モデルは、本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートの治療有効性を評価するため(例えば、投与の用量及び時間経過の試験する)に有用となりうる。

【0312】

本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートが、治療において単独、又は他の組成物と組

10

20

30

40

50

み合わせて使われてもよい。例えば、本発明の抗体ないシイムノコンジュゲートは、少なくとも一の付加的治療剤及び/又はアジュバントと同時に投与されてもよい。ある実施態様では、付加的治療剤は、細胞障害性剤、化学療法剤又は増殖阻害性剤である。このような実施態様のうちの一つでは、化学療法剤は、例えば、シクロホスファミド、ヒドロキシダウノルピシン、アドリアマイシン、ドキシソルピシン、ビンクリスチン(オンコピンTM)、プレドニゾロン、CHOP、CVPないしはCOP、又は抗CD20(例えばリツキサン(登録商標))ないしは抗VEGF(例えばアバスタチン(登録商標))などの免疫治療法などの薬剤又は薬剤の組合せであって、この併用療法は、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫を含むB細胞増殖性疾患などの癌及び/又はB細胞疾患の治療に有用である。

【0313】

上記の併用治療には、併用投与(2以上の治療剤が同じか又は別の製剤に包含される)、及び別々の投与、別々の場合には、本発明の抗体ないシイムノコンジュゲートは付加的治療剤及び/又はアジュバントの前、同時及び/又はその後投与することができる。また、本発明の抗体ないシイムノコンジュゲートは、放射線療法と組み合わせて使われてもよい。

本発明の抗体ないシイムノコンジュゲートは、非経口的、皮下、腹膜内、肺内、及び鼻腔内、そして、必要に応じて局所の治療のために、病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与することができる。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹膜内、又は皮下的な投与を含む。加えて、抗体ないシイムノコンジュゲートを、特に抗体ないシイムノコンジュゲートの用量を減少して、パルス注入によって好適に投与する。投与が短期のものであるか長期のものであるかある程度依存して、任意の好適な経路、例えば、静脈内又は皮下注射などの注射によって投与することができる。

本発明の抗体ないシイムノコンジュゲートは、医学的実用性に合わせた様式で調製し、1回分に分けて、投与される。ここで考慮する要因は、治療する特定の疾患、治療する特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、疾患の原因、薬剤の運搬部位、投与の方法、投与の日程計画、及び医師が知る他の因子を含む。必要ではないが場合によっては、問題の疾患を予防するか又は治療するために一般に用いられる一つ以上の作用剤と抗体ないシイムノコンジュゲートとを調製する。そのような他の作用剤の有効量は、製剤中の抗体ないシイムノコンジュゲートの量、疾患の型又は治療、及び上記の他の因子に依存する。これらは、一般的に、ここに記載されるものと同じ用量及び投与経路で、又はここに記載される用量の1~99%で、或いは経験的/臨床的に適切と判断される任意の用量及任意の投与経路で、用いられる。

【0314】

疾患の予防又は治療のために、本発明の抗体ないシイムノコンジュゲートの好適な用量は(単独で用いる場合、又は化学療法剤などの一又は複数の他の付加的な治療剤と組み合わせて用いる場合)、治療する疾患のタイプ、抗体ないシイムノコンジュゲートのタイプ、疾患の重症度及び経過、抗体ないシイムノコンジュゲートを予防目的で投与するか治療目的で投与するか、以前の治療法、患者の病歴及び抗体ないシイムノコンジュゲートへの応答性、及び担当医師の判断に依存するであろう。抗体ないシイムノコンジュゲートは一時的又は一連の治療にわたって適切に患者に投与される。疾患のタイプ及び重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{mg}/\text{kg}$ (例えば $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ~ $20\text{mg}/\text{kg}$)の抗体ないシイムノコンジュゲートを、例えば一以上の分割投与又は連続注入による患者投与の初期候補用量とすることができる。ある典型的な1日量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ~ $100\text{mg}/\text{kg}$ 以上の範囲であろう。症状に応じて、数日間以上にわたる繰り返し投与は、通常、所望の疾患症状の抑制が得られるまで持続する。抗体ないシイムノコンジュゲートの用量の例は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ~約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲であろう。ゆえに、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ 又は $10\text{mg}/$

10

20

30

40

50

kgの抗体ないしイムノコンジュゲートの一以上の用量を(又はそれらを組み合わせて)患者に投与してもよい。このような用量は、間欠的に、例えば週ごと又は3週ごとに投与してもよい(例えば患者に約2~約20、例えば約6用量の抗体ないしイムノコンジュゲートが投与される)。初期のより高い負荷投与量の後、一以上のより低い用量を投与してもよい。例示的用量療法は、約4mg/kgの初期負荷投与量の後、約2mg/kgの毎週の維持用量抗体を投与することを含む。しかしながら、他の投与計画が有効かもしれない。この治療の進行は、従来技術及びアッセイにより容易にモニターすることができる。

【0315】

アッセイ

本発明の抗CD22抗体及びイムノコンジュゲートは、当分野で公知の様々なアッセイによって、それらの物理的/化学的な性質及び/又は生物活性について特徴付けされうる。

10

【0316】

活性アッセイ

一態様では、アッセイは、生物学的な活性を有する抗CD22抗体ないしそのイムノコンジュゲートを同定するために提供される。生物学的な活性には、例えば、細胞成長又は増殖の阻害能(例えば「細胞殺傷」活性)、又はプログラムされた細胞死(アポトーシス)を含む細胞死誘導能が含まれうる。また、インビボ及び/又はインビトロでのこのような生物学的な活性を有する抗体ないしイムノコンジュゲートが提供される。

ある実施態様では、抗CD22抗体又はそのイムノコンジュゲートは、インビトロでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。細胞成長又は増殖の阻害のためのアッセイは当分野で周知である。本明細中に記載の「細胞殺傷」アッセイにて例示した細胞増殖のためのあるアッセイは、細胞生存度を測定する。このようなあるアッセイは、Promega (Madison, WI)から市販されているCellTiter-GloTM発光細胞生存率アッセイである。このアッセイは、代謝活性のある細胞の指標であるATPの存在の量に基づいて生細胞数を決定する。Crouch等(1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88、米国特許第6602677号を参照。アッセイは、自動ハイスループットスクリーニング(HTS)に用いられるように96-又は384-ウェルフォーマットで行ってもよい。Cree等(1995) AntiCancer Drugs 6:398-404を参照。アッセイ手順は、単一の試薬(CellTiter-Glo(登録商標)試薬)を直接培養細胞に加えることを伴う。この結果細胞溶解が生じ、ルシフェラーゼ反応によって生産される発光シグナルが生成される。この発光シグナルは、培養物中に存在する生細胞の数に直接比例している、ATPの存在の量に比例する。データは、ルミノメーター又はCCDカメラ画像デバイスによって記録することができる。発光の結果は相対的な光の単位(RLU)として表す。

20

30

【0317】

細胞増殖についての他のアッセイは「MTT」アッセイであり、これは、ミトコンドリアレダクターゼによる3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイドのホルマザンへの酸化を測定する比色アッセイである。CellTiter-GloTMアッセイのように、このアッセイは、細胞培養物に存在する代謝活性のある細胞の数を表す。例としてMosmann(1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63及びZhang等(2005) Cancer Res. 65:3877-3882を参照。

40

一態様では、抗CD22抗体は、インビトロでの細胞死を誘導する能力について試験される。細胞死の誘導についてのアッセイは当分野で周知である。いくつかの実施態様では、このようなアッセイは、例えば、プロピジウムヨウ素(PI)トリパンブルー(Moore等(1995) Cytotechnology, 17:1-11を参照)、又は7AADの取り込みによって示される膜統合性の喪失を測定する。例示的なPI取り込みアッセイでは、細胞は、10%の熱不活性化FBS(Hyclone)と2mMのL-グルタミンを添加した、ダルベッコ変更イーグル培地(DMEM):ハムF-12(50:50)中で培養する。したがって、このアッセイは、補体と免疫エフェクター細胞の非存在下で行う。100×20mmのディッシュにディッシュ当たり3×10⁶の密度で細胞を播き、終夜接着させる。培地を取り除き、新鮮な培地の

50

み、又は様々な濃度の抗体ないしイムノコンジュゲートを含む培地と交換する。細胞を3日間インキュベートする。処置後、単層をPBSにて洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、1200rpmで4分で5分間遠心して、ペレットを3mlの冷却Ca²⁺結合バッファ(10mM HEPES、pH7.4、140mM NaCl、2.5mM CaCl₂)に再懸濁し、細胞凝集塊を取り除くために35mmのストレーナーを取り付けた12×75mmチューブ(チューブ当たり1ml、1処理群につき3チューブ)に分注する。次いで、チューブにPI(10μg/ml)を加える。試料は、FACSCANT^Mフローサイトメーター及びFACSCONVERT^M CellQuestソフトウェア(Becton Dickinson)を用いて分析される。次いで、PI取り込みによって定まる統計学的に有意なレベルの細胞死を誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートを同定する。

10

【0318】

一態様では、抗CD22抗体ないしイムノコンジュゲートは、インビトロでのアポトーシス(プログラムされた細胞死)を誘導する能力について試験される。アポトーシスを誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートの例示的なアッセイはアネキシン結合アッセイである。例示的なアネキシン結合アッセイでは、細胞を培養し、前段落で述べたようにディッシュに播く。培地を取り除き、新鮮培地のみ、又は0.001~10μg/mlの抗体ないしイムノコンジュゲートを含む培地と交換する。3日間のインキュベート後、単層をPBSで洗浄し、トリプシン処理によって脱離させる。次いで、細胞を遠心して、Ca²⁺結合バッファに再懸濁し、前段落で述べたようにチューブに分注する。その後、チューブに標識したアネキシン(例えばアネキシンV-FITC)(1μg/ml)を加える。試料は、FACSCANT^Mフローサイトメーター及びFACSCONVERT^M CellQuestソフトウェア(BD Biosciences)を用いて分析される。次いで、コントロールと比べて統計学的に有意なレベルのアネキシン結合を誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートを同定する。アポトーシスを誘導する抗体ないしイムノコンジュゲートの他の例示的なアッセイは、ゲノムDNAのヌクレオソーム間分解を検出するためのヒストンDNA ELISA比色アッセイである。このアッセイは、例えば細胞死検出ELISAキット(Roche, Palo Alto, CA)を用いて行うことができる。

20

上記いずれかのインビトロアッセイに用いるための細胞には、天然でCD22を発現する又はCD22を発現するように操作された細胞ないしは細胞株が含まれる。このような細胞には、同じ細胞起源の正常細胞と比べてCD22を過剰発現する腫瘍細胞が含まれる。また、このような細胞には、CD22を発現する細胞株(腫瘍細胞株を含む)や、正常にCD22を発現しないがCD22をコードする核酸を形質移入してある細胞株が含まれる。

30

【0319】

一態様では、抗CD22抗体ないしそのイムノコンジュゲートは、インビボでの細胞成長又は増殖を阻害する能力について試験される。ある実施態様では、抗CD22抗体ないしそのイムノコンジュゲートは、インビボでの腫瘍成長を阻害する能力について試験される。異種移植片モデルなどのインビボモデルシステムが前記の試験のために用いられる。例示的な異種移植片システムでは、好適に免疫を低下させた非ヒト動物、例えばSCIDマウスにヒト腫瘍細胞が導入される。本発明の抗体ないしイムノコンジュゲートは動物に投与される。抗体ないしイムノコンジュゲートの腫瘍成長を阻害するか又は減少させる能力が測定される。上記の異種移植片システムのある実施態様では、ヒト腫瘍細胞はヒト患者の腫瘍細胞である。このような異種移植片モデルを調製するために有用な細胞には、ヒトの白血病およびリンパ腫細胞株が含まれ、これには、限定されるものではないが、BJAB-1uc細胞(ルシフェラーゼレポーター遺伝子を形質移入したEBV陰性パーキットリンパ腫細胞株)、ラモス細胞(ATCC, Manassas, VA, CRL-1923)、ラーゼ細胞(ATCC, Manassas, VA, CCL-86)、SUDHL-4細胞(DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495)、DohH2細胞(Kluin-Neilemans, H.C.等, Leukemia 5:221-224 (1991)およびKluin-Neilemans, H.C.等, Leukemia 8:1385-1391 (1994)を参照)、Grant-519細胞(Jadayel, D.M.等, Leukemia 11(1): 64-72 (1997)を参照)が含まれる。ある実施態様では、皮下

40

50

投与や、哺乳動物の脂肪体などの好適な部位に移植することによって好適に免疫を低下させた非ヒト動物にヒト腫瘍細胞を導入する。

【0320】

結合アッセイ及び他のアッセイ

一態様では、抗CD22抗体はその抗原結合活性について試験される。例えば、ある実施態様では、抗CD22抗体は、細胞の表面に発現されるCD22に結合する能力について試験される。FACSアッセイが前記の試験に用いられてもよい。

一態様では、競合アッセイを用いて、CD22への結合についてマウス10F4.4.1抗体、ヒト化10F4v1抗体、ヒト化10F4v3抗体及び/又はマウス5E8.1.8抗体と競合するモノクローナル抗体を同定してもよい。ある実施態様では、前記の競争する抗体は、マウス10F4.4.1抗体、ヒト化10F4v1抗体、ヒト化10F4v3抗体及び/又はマウス5E8.1.8抗体が結合する同じエピトープ(例えば線形又は立体のエピトープ)に結合する。例示的な競合アッセイには、限定するものではないが、Harlow and Lane (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)に挙げられるものなどの常套的アッセイが含まれる。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法は、*Methods in Molecular Biology* vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ)のMorris (1996) "Epitope Mapping Protocols,"に示される。2つの抗体のそれぞれが50%以上他の結合をブロックする場合、これらの抗体は同じエピトープに結合すると言える。

【0321】

例示的な競合アッセイでは、固定されたCD22は、CD22に結合する第一標識抗体(例えばマウス10F4.4.1抗体、ヒト化10F4v1抗体、ヒト化10F4v3抗体及び/又はマウス5E8.1.8抗体)と、CD22への結合について第一抗体と競合する能力について試験されている第二非標識抗体とを含む溶液中でインキュベートされる。二次抗体はハイブリドーマ上清に存在してもよい。コントロールとして、固定したCD22を第一標識抗体を含むが第二非標識抗体は含まない溶液中でインキュベートする。CD22への第一抗体の結合に許容される条件下でのインキュベートの後、過剰な結合していない抗体を取り除き、固定されたCD22と結合している標識の量を測定する。固定されたCD22と結合している標識の量がコントロール試料と比較して試験試料において実質的に減少している場合、二次抗体がCD22への結合について第一抗体と競合していることが示唆される。ある実施態様では、固定されたCD22は、細胞の表面上に、又はその表面上にCD22を発現する細胞から得た膜調製物中に存在する。

一態様では、精製した抗CD22抗体はさらに、限定するものではないが、N末端配列決定法、アミノ酸分析、非変性サイズ排除高圧液体クロマトグラフィ(HPLC)、質量分析、イオン交換クロマトグラフィ及びパepsin消化を含む、一連のアッセイによって特徴付けることができる。

【0322】

一実施態様では、本発明は、全てではないが幾つかのエフェクター機能を有する変更された抗体を考慮し、この抗体は、抗体のインビボ半減期が重要であり、更に特定のエフェクター機能(補体又はADCCなど)が不要又は有害である多くの用途の好ましい候補となる。特定の実施態様では、抗体のFc活性を測定して、所望の特性だけが維持されていることを確認する。インビボ及び/又はインビトロ細胞障害アッセイを行って、CDC及び/又はADCC活性の減少/枯渇を確認することができる。例えば、Fcレセプター(FcR)結合アッセイを行って、抗体がFcR結合を欠損している(すなわちADCC活性を欠損していると思われる)が、FcRn結合能は維持していることを確認することができる。ADCCを仲介する第一細胞であるNK細胞は、FcRIIIのみを発現し、その一方で単核細胞はFcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血系細胞でのFcR発現については、Ravetch及びKinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991)の464頁の表3に要約されている。対象とする分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの一例は、米国特許第5500362号又は同第5821337号に記載されてい

る。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞(PBMC)及びナチュラルキラー(NK)細胞が含まれる。あるいは、又は加えて、対象とする分子のADC活性は、例えばClynes等のPNAS(USA)95:652-656(1998)に開示されているような動物モデルにおいてインビボに評価することができる。また、C1q結合アッセイを行って、抗体がC1qに結合できない、つまりCDC活性を欠損していることを確認してもよい。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163(1996)に記載のように、CDCアッセイを行ってもよい。また、FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期測定を、当分野で公知の方法を用いて行うことができる。

【実施例】

【0323】

以下は本発明の方法および組成物の例である。前述の一般的な記載から、様々な他の実施態様が実施されることが理解されるであろう。

【0324】

実施例1：マウス抗ヒトCD22モノクローナル抗体の調製

ヒトCD22を特異的に結合することができるマウスモノクローナル抗体を調製した。6週齢のBALB/c雌マウスの足蹠に、ドメイン3及び4を欠く精製したヒトCD22 his-8タグ化細胞外ドメイン(配列番号：30(ECD)+C末端の配列GRAHHHHHHH)又はドメイン1-7を含むCD22 his-8タグ化細胞外ドメイン(配列番号：28(ECD)+上記のHis配列タグ)にRib iのアジュバントを含むものを投与して免疫化した。初回免疫化の1週間及び3週間後に同じ様式で投与を行った。最終投与の3日後、鼠径部及び膝窩部のリンパ節を取り出して回収し、組織をスティールガーゼに通して単細胞懸濁液を作製した。細胞を、50%w/vポリエチレングリコール4000を含む高グルコース(DMEM)中でP3X63-Ag8.653(ATCC CRL 1580)などのマウス骨髄腫と4:1の比で融合させた。ついで、融合した細胞を96ウェル組織培養プレートのウェルに 2×10^5 の濃度で播いた。24時間後にHAT選択培地(ヒポキサンチン/アミノプテリン/チミジン、Sigma, #H0262)を添加した。融合の15日後、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を用いて、成長している細胞の上清をヒトCD22に特異的な抗体の存在下において試験した。

マウス抗ヒトCD22 10F4.4.1(μ 10F4)及び5E8.1.8(μ 5E8)モノクローナル抗体を、細胞ベースのアッセイに基づく更なる試験と抗体がヒトCD22に特異的に結合することを示すプレートアッセイのために選別した。以降の段落にアッセイを記載する。

ELISAベースのアッセイ：ELISAによる抗CD22抗体のスクリーニングは以下の通りに行い、すべてのインキュベートは室温で行った。試験プレート(Nunc Immunoplate)を精製したCD22を含む50mM炭酸ナトリウムバッファ、pH9.6にて2時間コートし、その後、0.5%ウシ血清アルブミンを含むリン酸緩衝生理食塩水(PBS)にて30分間ブロックし、その後0.05%Tween20を含むPBS(PBST)にて4回洗浄した。試験抗体上清を添加して、振とうしながら2時間インキュベートし、その後PBSTにて4回洗浄した。25mlのリン酸クエン酸バッファ、pH5.0中に10mgのo-フェニレンジアミンジヒドロクロライド(Sigma, #P8287)と10 μ lの30%過酸化水素溶液を含む溶液を100 μ l/ウェル添加して15分間インキュベートしてプレートを反応させる。2.5M硫酸を100 μ l/ウェル添加して反応を止める。自動ELISAプレート読み取り機にてプレートの490nmの吸光度を読み取ってデータを得る。

【0325】

実施例2：抗ヒトCD22モノクローナル抗体(MAb)の分析のためのFACSに基づくアッセイ

表面上にヒトCD22を発現するCHO細胞を、抗CD22ハイブリドーマ上清を含む100 μ lのFACSバッファ(0.1%BSA、10mMアジ化ナトリウムを含むPBS, pH7.4)とともに4で30分間インキュベートした後、FACSバッファにて1回洗浄した。一定量の抗体/細胞混合物を、ポリクローナルFITCコンジュゲートヤギ

10

20

30

40

50

ないしウサギの抗マウス I g G (Accurate Chem. Co., Westbury, NY) (マウス試験抗体用) 又はヤギないしウサギの抗ヒト I g G (ヒト化抗体用) とともに 4 で 30 分間インキュベートした後に F A C S バッファにて 3 回洗浄して、抗 C D 2 2 結合の量を決定した。

【0326】

実施例 3 : ヒト化抗 C D 2 2 抗体の調製

高頻度可変領域 (H V R) アミノ酸残基 (相補性決定領域又は C D R と交換可能に称される) を部位特異的突然変異誘発 (Kunkel 等, Methods Enzymol. (1987), 154:367-382) によって改変して、ヒト化 1 0 F 4 抗体をヒト化 1 0 F 4 v 1 及びヒト化 1 0 F 4 v 2 の 2 つの変異体 (それぞれ「1 0 F 4 v 1」、「h u 1 0 F 4 v 1」、「1 0 F 4 v 2」又は「h u 1 0 F 4 v 2」とも称される) に生成した。本明細書中に開示したいくつかの研究に用いた第三のバージョンであるヒト化 1 0 F 4 v 3 («1 0 F 4 v 3」又は「h u 1 0 F 4 v 3») は、h u 1 0 F 4 v 2 と同じ成熟タンパク質の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を有するが、タンパク質発現に用いたベクターに含まれるシグナル配列が異なる。

マウス 1 0 F 4 抗体のヒト化を本明細書中に開示するように行った。簡単に言うと、マウス 1 0 F 4 の軽鎖及び重鎖の高頻度可変領域を改変したコンセンサスフレームワーク配列内にクローニングし、図 2 A 及び図 2 B に示す軽鎖及び重鎖の可変領域アミノ酸配列を生成した。本発明の抗体のフレームワーク配列として用いるオルタナティブな軽鎖及び重鎖のフレームワーク配列を図 3 及び図 4 に示す。

基本的には Lee 等, J. Mol. Biol. 340:1073-93 (2004) に記載のように、p h o A プロモーターの制御下に 2 つのオープンリーディングフレームを有する一価の F a b - g 3 ディスプレイベクター (p V 0 3 5 0 - 2 B) ファジミドを、1 0 F 4 抗体のヒト化に用いた。第一のオープンリーディングフレームには、アクセプター軽鎖配列の V L 及び C H 1 ドメインに融合したタンパク質分泌のための大腸菌熱安定 S T II シグナル配列が含まれる。第二のオープンリーディングフレームには、アクセプター重鎖配列の V H 及び C H 1 ドメインに融合した S T II シグナル配列とその後ろに切断型微量ファージコートタンパク質 P 3 が含まれる。

【0327】

マウス 1 0 F 4 の V H ドメイン及び V L ドメイン (それぞれ配列番号 : 8 9 及び 9 0) をヒトサブグループ III コンセンサス V H (h u III) ドメイン (配列番号 : 2 4) 及びヒトコンセンサス I (h u K I) ドメイン (配列番号 : 2 5) とそれぞれ配列比較した。マウス抗ヒト C D 2 2 M A b 1 0 F 4 の高頻度可変領域 (H V R、本明細書中では相補性決定領域 (C D R) と交換可能に称される) のアミノ酸配列を以下のようにコンセンサスフレームワーク配列内に挿入した。m u 1 0 F 4 抗体の軽鎖 H V R (H V R - L 1 (カバット位 2 4 - 3 4)、H V R - L 2 (カバット位 5 0 - 5 6)、及び H V R - L 3 (カバット位 8 9 - 9 7)) を、ヒト I (h u K I) コンセンサス配列抗体フレームワーク内に改変して、ヒト化 1 0 F 4 v 1 軽鎖 (配列番号 : 1 7、図 2 B) を生成した。m u 1 0 F 4 抗体の重鎖 H V R (H V R - H 1 (カバット位 2 6 - 3 5)、H V R - H 2 (カバット位 4 9 - 6 5)、及び H V R - H 3 (カバット位 9 5 - 1 0 2)) を、h u m III 配列と 3 つの位置が異なる (R 7 1 A、N 7 3 T 及び L 7 8 A) (Carter 等 I, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992) を参照) 改変したヒトサブグループ III (h u m III) コンセンサス V H ドメイン内に改変して、ヒト化 1 0 F 4 v 1 重鎖可変領域 (配列番号 : 1 6、図 2 A) を生成した。アクセプターフレームワーク内への H V R の遺伝子改変は、各高頻度可変領域用の異なるオリゴヌクレオチドを用いたクンケル突然変異誘発によって行った。各クローンの配列は標準的な D N A 配列決定技術によって決定した。図 2 A 及び 2 B に示す高頻度可変領域とフレームワーク領域はカバット番号付けに従って番号を付けた (上掲の Kabat 等 (1991))。軽鎖及び重鎖を配列決定し、h u K I、h u m I I I、マウス 1 0 F 4、ヒト化 1 0 F 4 v 1 及びヒト化 1 0 F 4 v 2 の可変領域 (H V R 及びフレームワーク領域 (F R) を含む) のアミノ酸配列を図 2 A 及び 2 B に示す。ヒト化 1 0 F 4 v 3 抗体は 1 0 F 4 v 2 と同じアミノ酸配列である。

抗体、抗体断片、V L ドメイン又は V H ドメインのアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子を、当分野で公知の様々な方法によって調製する。これらの方法には、限定するも

のではないが、天然源からの単離(天然に生じるアミノ酸配列変異体の場合)又は初期に調製された抗体、抗体断片、V Lドメイン又はV Hドメインの変異体ないしは非変異体の、オリゴヌクレオチド媒介(又は部位特異的)突然変異誘発、PCR突然変異誘発、及びカセット突然変異誘発による調製が含まれる。例えば、キュンケル法を用いた変異アミノ酸を有するアミノ酸置換のために、V H内、場合によって一又は複数のC D R内のV Lの利用可能なアミノ酸位置をターゲットとすることによってライブラリを作製することができる。例えば、Kunkel等, Methods Enzymol. (1987), 154:367-382及び本明細書中の実施例を参照のこと。また、ランダム化配列の生成も以下の実施例に記載する。

【0328】

オリゴヌクレオチド配列は、本発明のポリペプチドのC D R(H V R)又はF R領域の特定の位置に対して設定されたコドンセットの一又は複数を含む。コドンセットは所望の変異体アミノ酸をコードするのに用いられる、一組の異なるヌクレオチドトリプレット配列である。コドンセットは、I U Bコードによって下で示すように、特定のヌクレオチドまたはヌクレオチドの等モル混合物を示すために符号を使って表される。

I U Bコード

G グアニン

A アデニン

T チミン

C シトシン

R (AまたはG)

Y (CまたはT)

M (AまたはC)

K (GまたはT)

S (CまたはG)

W (AまたはT)

H (AまたはCまたはT)

B (CまたはGまたはT)

V (AまたはCまたはG)

D (AまたはGまたはT) H

N (AまたはCまたはGまたはT)

【0329】

例えば、コドンセットD V Kでは、DはヌクレオチドAまたはGまたはTであり、VはAまたはGまたはCであり、KはGまたはTである。このコドンセットは18個の異なるコドンを表し、アミノ酸Ala、Trp、Tyr、Lys、Thr、Asn、Lys、Ser、Arg、Asp、Glu、GlyおよびCysをコードすることができる。

オリゴヌクレオチドまたはプライマーのセットは、標準の方法を使って合成できる。一組のオリゴヌクレオチドは、例えば、コドンセットによって提供されるヌクレオチドトリプレットの可能な組合せのすべてを代表し、所望のアミノ酸群をコードする配列を含む固相法によって合成することができる。ある位置での選ばれたヌクレオチド「縮退」を有するオリゴヌクレオチドの合成は、当技術分野で公知である。そのようなある種のコドンセットを有しているヌクレオチドのセットは、市販の核酸シンセサイザー(Applied Biosystems, Foster City, CAなどから入手可能)を使って合成することができ、または市販品を入手することができる(例えば、Life Technologies, Rockville, MDから)。したがって、特定のコドンセットを有する合成オリゴヌクレオチドセットは、一般的に異なる配列の複数のオリゴヌクレオチドを含み、この相違は配列全体の中のコドンセットによるものである。本発明で使用されるように、オリゴヌクレオチドは可変ドメイン核酸鋳型へのハイブリダイゼーションを可能にする配列を有し、また、クローニングに役立つ制限酵素部位を含むこともできる。

【0330】

1つの方法では、変異体アミノ酸をコードする核酸配列は、オリゴヌクレオチドが媒介

10

20

30

40

50

する突然変異誘発によって作製することができる。この手法はZoller等, *Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504頁(1987)が記載しているように、当技術分野で公知である。つまり、変異体アミノ酸をコードしている核酸配列は所望のコドンセットをコードしているオリゴヌクレオチドセットをDNA鋳型とハイブリダイズすることによって作製され、前記鋳型は可変部核酸鋳型配列を含むプラスミドの一本鎖型である。ハイブリダイゼーションの後、DNAポリメラーゼを用いて鋳型の二次相補鎖すべてを合成し、この相補鎖はオリゴヌクレオチドプライマーを取り込み、前記オリゴヌクレオチドセットによって提供されるコドンセットを含むようになる。

通常、長さが少なくとも25ヌクレオチドのオリゴヌクレオチドが使われる。最適オリゴヌクレオチドは、突然変異体をコードするヌクレオチドの両側が鋳型と完全に相補性である12から15個のヌクレオチドを持つ。これにより、オリゴヌクレオチドが正しく一本鎖DNA鋳型分子にハイブリダイズするようになる。オリゴヌクレオチドは、当技術分野で公知の手法、例えばCrea等, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765頁(1978)に記載の手法を使って容易に合成される。

【0331】

DNA鋳型はバクテリオファージM13ベクター(市販のM13mp18およびM13mp19ベクターが適当)に由来するベクター、またはViera等, *Meth. Enzymol.* 153:3頁(1987)に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべきDNAは、一本鎖鋳型を生成するためにこれらのベクターの1つに挿入することができる。一本鎖鋳型の生産は、上掲Sambrook等のセクション4.21~4.41で記載されている。

天然のDNA配列を変えるために、オリゴヌクレオチドが適当なハイブリダイゼーション条件の下で一本鎖鋳型にハイブリダイズされる。DNA重合酵素、通常、T7DNAポリメラーゼまたはDNAポリメラーゼIのクレノー断片を次に加え、合成のためのプライマーとしてオリゴヌクレオチドを使って鋳型の相補鎖を合成する。こうしてDNAの1つの鎖は遺伝子1の突然変異した形態をコードし、他の鎖(元の鋳型)は遺伝子1の未変性、未変更の配列をコードするようにヘテロ二本鎖分子が形成される。このヘテロ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞、通常大腸菌JM101のような原核生物に形質転換される。細胞を増殖させた後にアガロースプレートの上へプレートし、突然変異したDNAを含む細菌コロニーを同定するために32リン酸塩で放射性標識されたオリゴヌクレオチドプライマーを使ってスクリーニングする。

【0332】

上記の方法は、プラスミドの両方の鎖が突然変異を含むホモ二本鎖分子が作製されるように修正することができる。この修正は以下の通りである。一本鎖オリゴヌクレオチドを先に述べたように一本鎖鋳型にアニールする。3つのデオキシリボヌクレオチド、デオキシリボアデノシン(dATP)、デオキシリボグアノシン(dGTP)およびデオキシリボチミジン(dTT)の混合物を、dCTP-(aS)と呼ばれる修飾されたデオキシリボシトシン(Amershamから入手できる)と合わせる。この混合物を鋳型-オリゴヌクレオチド複合体に加える。DNAポリメラーゼをこの混合物へ追加すると、突然変異した塩基以外は鋳型と同一のDNA鎖が生成する。さらに、この新しいDNA鎖はdCTPの代わりにdCTP-(aS)を含み、これはDNA鎖を制限酵素による消化作用から保護するのに役立つ。二本鎖ヘテロ二本鎖の鋳型鎖に適当な制限酵素でニックを入れた後、突然変異を起こさせる部位を含む領域の後方で鋳型鎖はExoIIIヌクレアーゼまたは適当な他のヌクレアーゼで消化することができる。反応を終了すると、部分的にだけ一本鎖の分子が残る。次に、完全な二本鎖DNAホモ二本鎖が、4つのデオキシリボヌクレオチド三燐酸のすべて、ATPおよびDNAリガーゼの存在下でDNAポリメラーゼを使って形成される。このヘテロ二本鎖分子は、次に適当な宿主細胞に形質転換することができる。

前に示したように、オリゴヌクレオチドセットの配列の長さは鋳型核酸にハイブリダイズするために十分な長さであり、また、必須ではないが制限部位を含むこともできる。D

10

20

30

40

50

N A 鑄型はバクテリオファージ M 1 3 ベクターに由来するベクター、または Viera 等 ((1987), Meth. Enzymol. 153:3頁) に記載されている一本鎖ファージ複製起点を含むベクターによって生成される。このように、突然変異させるべき DNA は、一本鎖鑄型を生成するためにこれらのベクターの 1 つに挿入する必要がある。一本鎖鑄型の生産は、上掲 Sambrook 等のセクション 4 . 2 1 ~ 4 . 4 1 で記載されている。

【 0 3 3 3 】

他の方法によると、ライブラリーは上流および下流のオリゴヌクレオチドセットを提供することによって生成することができ、各セットは、オリゴヌクレオチドの配列内で提供されたコドンセットによって確立された異なる配列を有する複数のオリゴヌクレオチドを持つ。上流および下流のオリゴヌクレオチドセットは、可変ドメイン鑄型核酸配列と共に、PCR 産物の「ライブラリー」を作製するために PCR 法で使うことができる。PCR 産物は確立された分子生物学的手法を使って他の関連した、または無関係な核酸配列、例えばウイルスのコートタンパク質構成成分および二量体化ドメインと融合することができるので、「核酸カセット」と呼ぶこともある。

オリゴヌクレオチドセットは、核酸カセットを作製するための鑄型として可変ドメイン核酸鑄型配列を使って PCR 法で使うことができる。可変ドメイン核酸鑄型配列は、対象核酸配列（すなわち、置換の対象となるアミノ酸をコードしている核酸配列）を含む免疫グロブリンの軽鎖または重鎖のいかなる部分でもよい。可変ドメイン核酸鑄型配列は、第 1 の核酸鎖および相補性の第 2 の核酸鎖を有する二本鎖 DNA 分子の一部である。可変ドメイン核酸鑄型配列は、少なくとも可変ドメインの一部を含み、また少なくとも 1 つの CDR を持つ。場合によっては、可変ドメイン核酸鑄型配列は複数の CDR を含む。可変ドメイン核酸鑄型配列の上流部および下流部は、上流域のオリゴヌクレオチドセットおよび下流域のオリゴヌクレオチドセットの構成メンバーによるハイブリダイゼーションの対象とすることができる。

【 0 3 3 4 】

上流のプライマーセットの第 1 のオリゴヌクレオチドは第 1 の核酸鎖にハイブリダイズすることができ、下流のプライマーセットの第 2 のオリゴヌクレオチドは第 2 の核酸鎖にハイブリダイズすることができる。オリゴヌクレオチドプライマーは 1 つまたは複数のコドンセットを含むことができ、可変部核酸鑄型配列の一部にハイブリダイズするように設計することができる。これらのオリゴヌクレオチドの使用により、PCR 後に 2 つ以上のコドンセットを PCR 産物（すなわち核酸カセット）に導入することができる。抗体可変ドメインをコードしている核酸配列の領域にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドプライマーは、アミノ酸置換の対象となる CDR 残基をコードする部分を含む。

上流域および下流域のオリゴヌクレオチドセットは、オリゴヌクレオチド配列内に制限部位を含むように合成することもできる。これらの制限部位は、さらなる抗体配列を有している発現ベクターへの核酸カセット（すなわち PCR 反応生成物）の挿入を容易にする。一実施態様では、制限部位は外来の核酸配列を導入することなく、または元の CDR またはフレームワーク核酸配列を取り除くことなく核酸カセットのクローニングを容易にするようになっている。

【 0 3 3 5 】

核酸カセットは、PCR 反応によって作製した対象アミノ酸置換を含む軽鎖または重鎖の配列の一部またはすべての発現のために、いかなる適当なベクターにもクローニングすることができる。本発明で詳述される方法によると、核酸カセットはウイルスコートタンパク質のすべてまたは一部と融合した軽鎖または重鎖配列の一部またはすべて（すなわち、融合タンパク質を形成）の生産を可能にしているベクターにクローニングされるか、あるいは、粒子または細胞の表面で提示される。数種類のベクターが入手でき、それらは本発明の実施に用いることができるが、ファージミドベクターが本明細書での使用には好ましいベクターであり、その訳はそれらが相対的に容易に構築し、また容易に増幅することができるからである。当業者に公知のように、ファージミドベクターは、通常、プロモーター、シグナル配列、表現型選択遺伝子、複製起点部位および他の必要な構成成分を含む

様々な構成成分を含む。

特定の変異体アミノ酸の組合せが発現される場合、核酸カセットは、重鎖または軽鎖の可変ドメインのすべてまたは一部をコードすることができ、また変異体アミノ酸の組合せをコードすることができる配列を含む。ライブラリーの場合のようにこれらの変異体アミノ酸または変異体アミノ酸の組合せを含んでいる抗体の作製のために、核酸カセットは、さらなる抗体配列、例えば軽鎖および重鎖可変部の可変または定常ドメインのすべてまたは一部を含んでいる発現ベクターに挿入することができる。これらのさらなる抗体配列は他の核酸配列、例えばウイルスコートタンパク質をコードする配列と融合することができ、したがって融合タンパク質の生産を可能にする。

【0336】

10

実施例4：可変領域配列決定

マウス及びヒト化10F4モノクローナル抗体の核酸及びアミノ酸配列は標準的な手順によって決定した。全RNAは、RNeasy(登録商標) Mini Kit (Qiagen, Germany)を用いてマウス抗ヒトCD22 10F4.4.1モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞から抽出した。可変軽鎖(VL)及び可変重鎖(VH)ドメインを変性プライマーによるRT-PCRを用いて増幅した。フォワードプライマーは抗体のVL及びVH領域のN末端アミノ酸配列に特異的とした。それぞれ、軽鎖及び重鎖のリバースプライマーは、種間で高度に保存されている定常軽鎖(CL)及び定常重鎖ドメイン1(CH1)の領域にアニールするように設定した。増幅したVH及びVLをpRK哺乳動物細胞発現ベクターにクローニングした(Shields等, J. Biol. Chem. 276:659-04 (2000))。インサートのポリヌクレオチド配列を常法の配列決定法を用いて決定した。マウスキメラ10F4及びヒト化10F4v1及びヒト化10F4v2軽鎖及び重鎖の可変領域のアミノ酸配列を図2A及び2Bに示す。

20

ヒト化10F4v1のHVR-L1位置28(N28)をさらに改変した(配列番号：9)(図2Bを参照)。この位置のアスパラギン残基をバリン残基に置き換え(N28V)、hu10F4v2及びhu10F4v3変異体用のHVR-L1(配列番号：10)を生成した。これらは改善した結合親和性を示した。これらの変異体は同じ可変ドメイン配列と成熟抗体の定常ドメイン配列を含み、本発明の成熟抗体には見られないシグナル配列のみが異なる。

【0337】

30

hu10F4v1のHVR-L1高頻度可変領域のアミノ酸Asn28(N28)及び/又はAsn30(N30)のいずれか又は両方に、更なるアミノ酸配列改変を行った(図2Bを参照)。N28及びN30は脱アミノ化の候補部位であるので、これらの部位でのアミノ酸変化を試験した。例えば、位置28のアスパラギン(N28)をA、Q、S、D、V又はIに選択的に置換し、位置30のアスパラギン(N30)をA又はQに選択的に置換した。本発明に係るHVR-L1ドメイン内のアミノ酸配列変化は、標準的な手順を用いてファージELISAアッセイ(IC50)の競合分析によって試験した結合親和性ととも、表2に示す。

表2 hu10F4v1抗体の置換変異

HVR-L1の アミノ酸変化 図2B	HVR-L1 配列番号	結合親和性 (nM)
変化なし (N28, N30)	9	8
N28A, N30	19	8
N28Q, N30	20	7.3
N28S, N30	21	12
N28D, N30	22	12
N28V, N30	10	7.3
N28I, N30	23	9.8
N28, N30A	32	7.7
N28, N30Q	33	10

10

【0338】

ヒト化10F4抗体の完全長ヒトIgG1バージョンの生成のために、重鎖及び軽鎖を前記のpRKプラスミドに別々にサブクローニングする(Gorman, C.M.等 (1990), DNA Protein Eng. Tech. 2: 3)。効率の良い手順(Graham等, supra & Gorman, C.M., Science 21: 551)を用いて、適切な重鎖及び軽鎖のプラスミド(所望の配列変化(一又は複数)に応じて)を293(Graham, F.L.等 (1977), J. Gen. Virol. 36: 59)として知られるアデノウイルス形質転換ヒト胚性腎細胞株に同時に形質移入する。培地を無血清に換えて、5日まで毎日回収する。プロテインA-セファロースCL-4B(Pharmacia)を用いて集めた上清から抗体を精製する。溶出した抗体のバッファをG25ゲル濾過によってPBSに交換し、Centriprep-30又はCentricon-100(Millipore)を用いた限外濾過によって濃縮し、4℃に保存する。抗体の濃度は全IgG-結合ELISAを用いて決定する。

20

本発明に係る例示的な重鎖IgG1定常ドメインを図5Aに示す。例示的なヒト軽鎖定常ドメインは、例えばRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSLSSTLTLSKADYEKHDVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(配列番号: 37)を含む。h10F4v2の完全長アミノ酸配列を図5Bに示し、この軽鎖及び重鎖の定常領域を下線で示す。h10F4v1、v2及びv3抗体はIgG1アイソタイプである。

30

【0339】

抗CD22抗体の特徴付け

実施例5: エピトープマッピング

10F4.4.1および5E8.1.8抗体が結合したCD22のエピトープを以下の手順に従って決定した。主要なCD22アイソフォーム(CD22¹)の7つの免疫グロブリン様ドメインを様々に欠損しているCD22配列をクローニングして、安定発現のために細胞に形質移入した。例えば、ドメイン1(1)、ドメイン2(2)又はドメイン3および4(3, 4)を欠いているCD22変異体をクローニングして、CHO細胞に形質移入し、細胞に発現させた。コントロール細胞はCD22¹を発現した。ストラタジーンQuickChange XLTM試薬キットを用いて欠損させた。アミノ酸22-138の欠失によってドメイン1の欠失を行い、アミノ酸139-242の欠失によってドメイン2の欠失を行い、そして、欠失したドメイン3及び4は微量なアイソフォームCD22²として用いた(アミノ酸241-417の欠失)。すべてのアミノ酸番号は、Wilson, G.L.等(Wilson, G.L.等, J. Exp. Med. 173: 137-146 (1991)の図1を参照)による、完全長前駆体CD22¹の番号付けを指す。図14は欠失したドメインの線図である。アイソタイプコントロールを用いたフローサイトメトリによって結合を測定した。10F4.4.1の結合は、ヤギ抗マウスIgG Alexa 488を用いて検出した。5E8.1.8の結合は、

40

50

ビオチン化したヤギ抗マウスIgGプラスストレプトアビジンPEを用いて検出した。特定のECDドメインの非存在下ではマウス10F4.4.1又はマウス5E8.1.8抗体の結合に対して悪影響があることから、抗体がそれらのドメインを結合したことが示唆された。マウスの10F4.4.1および5E8.1.8は、これらの条件下では同じ結合特徴を示した。いずれも、ドメイン1又はドメイン2を欠いているCD22を結合せず、ドメイン1および2を含むが、ドメイン3および4を欠いているCD22を結合した。この方法を用いて、10F4.4.1および5E8.1.8が、配列番号：27のアミノ酸22からアミノ酸240の配列内の、ヒトCD22のドメイン1および2に結合することが決定された(上掲のWilson, G.L.等, (1991)を参照)。

【0340】

実施例6：可溶性抗原に対する結合親和性の特徴付け

可溶性CD22の細胞外ドメイン(ECD)についてのマウス及びヒト化10F4抗体の結合親和性は、BIACORE(登録商標)3000システム(Biacore, Inc., Piscataway, NJ)を用いた表面プラスモン共鳴測定によって測定した。簡単に言うと、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ(CM5, BIAcore Inc.)を、提供者の指示書に従ってN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド塩酸塩(EDC)及びN-ヒドロキシスクシニミド(NHS)で活性化した。抗CD22 IgG1抗体10F4(マウス又はヒト化)を10mM 酢酸ナトリウム(pH4.8)にて5µg/mLの濃度に希釈し、およそ500反応単位(RU)の抗体がカップリングするまで、5µl/分の流速で注入して、前記の活性化したチップをコートした。次に、1M エタノールアミンを注入して反応していない基をブロックした。動力学的な測定のために、ヒトCD22-ECD-Hisタグ化可溶性抗原の2倍の段階希釈物(およそ500nM~およそ7.8nM)を25、30µl/分の流速で0.05% Tween 20を含むPBSに注入した。単純一対一ラングミュア結合モデル(simple one-to-one Langmuir binding model) (BIAcore Evaluationソフトウェアバージョン3.2)を用いて、会合速度(k_{on})と解離速度(k_{off})を算出した。平衡解離定数(Kd)は比率 k_{off}/k_{on} として算出した。コントロールとして抗CD22抗体であるRFB4(Chemicon International, Inc., Temecula, CA, catalog no. CBL147)を用いた。この実験の結果を下記の表2に示す。

表2 可溶性ヒトCD22に対する抗CD22結合親和性
(BIACORE(登録商標)分析)

クローン	$k_{on}/10^5$	$k_{off}/10^{-4}$	Kd (nM)
マウス 10F4	0.19	2.8	15
キメラ 10F4	0.26	4.2	16
ヒト化 10F4v1	0.18	3.5	19
ヒト化 10F4v2	0.32	2.5	7.8
コントロール RFB4	0.33	1.4	4.2

【0341】

実施例7：細胞表面抗原に対する結合親和性の特徴付け

CHO細胞の表面に発現されるヒトおよびカニクイザル(cyno)のCD22に対するマウス10F4.4.1およびヒト化10F4v1及び10F4v2の結合親和性を、競合アッセイを用いて調べた。簡単に言うと、CHO細胞は完全長ヒトCD22(配列番号：27)又はカニクイザル(cyno)CD22(配列番号：31)を安定して発現する。抗CD22抗体(マウス又はヒト化の10F4v1又はv2)を、およそ10µCi/µgの比活性にIodogen(登録商標)[^{125}I]試薬にてヨード化した。段階的に希釈した標識していない抗CD22抗体を用いて細胞に基づく競合的結合アッセイを行った。4で4時間かけて抗体を細胞に結合させた。抗体の結合親和性 K_D は、非線形曲線フィッティングプログラムを利用して実行した標準的なスキッチャード分析により決定した(例と

10

20

30

40

50

してMunson等, Anal Biochem, 107: 220-239, 1980を参照)。この実験の結果を以下の表3に示す。

表3 ヒトおよびCynoのCD22に対する10F4 MA b結合親和性

抗体	ヒト CD22 Kd (nM)	Cyno CD22 Kd (nM)
Mu 10F4.4.1	2.4	2.3
Hu 10F4v1*	1.1, 1.7	1.4, 1.8
Hu 10F4v2	1.6	2.1

10

* 繰り返したアッセイ

結果から、マウス及びヒト化の10F4が、およそ同等の親和性でCHO細胞の表面に発現されるヒトおよびcynoのCD22を結合することが示される。

【0342】

実施例8：抗-CD22抗体薬剤コンジュゲートの産生

抗CD22抗体RFB4、マウス5E8、マウス10F4、ヒト化10F4v1、ヒト化thioMAb 10F4v1(thio-10F4v1)、ヒト化10F4v2、及びヒト化10F4v3を以下の薬剤-リンカー成分にコンジュゲートさせることによって抗CD22 ADCを産生させた。spp-DM1、smcc-DM1、MC-vc-PAB-MM AE; C-vc-PAB-MMAFMC-MMAEおよびMC-MMAF。これら薬剤及びリンカー成分は、本明細書、並びに2004年2月5日に公開の国際公開2004/010957、及び2005年9月9日に公開の国際公開2006/034488に開示されている(これら特許出願はそれぞれ、出典明記によってその全体が本明細書中に援用される)。国際公開2004/010957に記載の方法論に従って標準的な方法を用いて、結合の前に、抗体をTCEPにて部分的に還元した。Doronina等(2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784および米国公開特許2005/0238649A1に記載の方法論に従って標準的な方法を用いて、部分的に還元した抗体を上記の薬剤-リンカー成分にコンジュゲートした。簡単に言うと、部分的に還元した抗体を薬剤リンカー成分と組み合わせて、該成分をシステイン残基にコンジュゲートさせた。コンジュゲート反応を止め、ADCを精製した。各々のADCについての薬剤負荷(抗体当たりの薬剤成分の平均数)をHPLCにて測定した。ADCの調製に有用な他のリンカーには、BMPEO、BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIA B、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIA B、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、及びSVSB(スクシンイミジル-(4-ピニルスルホン)ベンゾアート)、及びビス-マレイミド試薬、例えばDTME、BMB、BMD B、BMH、BMOE、BM(PEO)₃、及びBM(PEO)₄が含まれるが、これらに限定されるものではない。

20

30

【0343】

また、抗CD22 ADCは、抗体のリジン残基にコンジュゲートさせて生成する。本明細書において開示されるように、例えば、トラウトの試薬(Pierce Chemical Co.)を用いて抗体のリジンをスルフヒドリル基に変換する。結果として生じるスルフヒドリル基は、ADCの調製のためのリンカー又はリンカー薬剤分子と反応することができる。あるいは、ADCは、リンカーであるSPP(N-スクシンイミジル4(2'-ピリジルチオ)ペンタノエート)と抗CD22抗体のリジンを反応させることによって生成される。このリンカーは既に薬剤分子に付着されていてもよいし、マレイミドなどの薬剤分子と後に反応させてもよい。例えば、抗体は、SPPと反応させて、その後Wang, L.等, Protein Science 14:2436-2446(2005)に開示されるfasとコンジュゲートさせることによって変更される。この文献は出典明記によってその全体が本明細書中に援用される。また、抗CD22抗体のリジン残基をリンカーであるSMCC(Pierce Chemical Co.)とpH7~9で反応させて、SMCCのアミン反応性N-ヒドロキシスクシンイミド(NHSエステル)が抗体

40

50

との安定アミド結合を形成するようにしてもよい。SMCCのスルフヒドリル反応性のマレイミド基はpH 6.5~7.5でDM1のスルフヒドリル基と反応して(Pierce Chemical Co., piercenet.comを参照)、ADCを形成する。リジン又はシステイン残基はリンカー-薬剤と反応して、平均して抗体当たりおよそ1~8のリンカー-薬剤分子、あるいは抗体当たり1~6、1~4、1~3又は1~2のリンカー-薬剤分子を負荷(積載)するADCを生産する。

ADC 抗CD22(RFB4)-SMCC-DM1および抗GP120-SMCC-DM1はこの方法に従って調製した。ただし、RFB4-smcc-DM1は低薬剤負荷(1.95)、中間の薬剤負荷(3.7)および高薬剤負荷(6.75)で調製した。抗GP120-smcc-DM1は高い(6.1)薬剤負荷で調製した。以降の本明細書中の実施例9および表9に示すように、これらのADCは、インビボにおいて有効であったことが示された。

10

【0344】

実施例9：抗-CD22抗体薬剤コンジュゲートの有効性

有効性決定因子のインビトロ研究。

リンパ腫細胞株において抗CD22 ADC(またはTDC)有効性の決定因子を決定した。B細胞の表面に発現されるCD22はそのリガンド(一又は複数)又は抗体が結合した際に取り込まれることが知られている(Sato, S.等, Immunity 5:551-562 (1996))。CD22のB細胞表面発現のレベルおよび/またはCD22の内部移行が有効性に影響するかが、そしてどのように作用するのかを試験するために、以下のインビトロ研究を行った。

20

【0345】

複数のリンパ腫細胞株上のヒトCD22の表面発現。表面上に様々な量のCD22を発現する19個のリンパ腫細胞株を培養して、対数期増殖中に回収した。100 μg/mlの各々正常なマウスIgGおよび正常なヒトIgGを含有するFACS洗浄バッファ(PBS; 0.5%ウシ血清アルブミン; 0.1%アジ化ナトリウム)に細胞を再懸濁して、氷上に置いた。およそ1 × 10⁶細胞/100 μlを抗huCD22 APC(mIgG1、クローンRFB4、Southern Biotech #9361-11)又はマウスIgG1 APCアイソタイプ(BD Pharmingen #555751)にて氷上で30分間かけて染色した。死細胞は7-AAD (BD Pharmingen #559925)にて染色した。BD FACS CaliburTMフローサイトメーターにてデータを得、FlowJoTMソフトウェアにて分析した。hu10F4v3-SMCC-DM1又は各々の遊離薬剤(DM1、MMAF又はMMAE)についてのIC50測定値は、上記のリンパ腫細胞を培養して、対数期の培養細胞を回収して、96ウェルプレートの1ウェルにつき5000細胞を含む90 μlの培養液を播くことによって測定した。ADCと遊離した薬剤を検出範囲内で段階的に希釈した(ADCは300 μg/mlまたは遊離薬剤は90 nMから始め、基本的にはゼロアッセイターゲットまで希釈する)。10 μlの一定量の希釈したADCまたは遊離薬剤を、細胞を含む複数のウェル(複製)に添加し、37 °Cで3日間インキュベートした。各ウェルに100 μlのCellTiter GloTMを加えて、30分間インキュベートした。化学発光を検出して、PrismTMソフトウェアを用いてデータを分析した。結果を図6Aに示す。ここでは、表面CD22レベルの高さがhu10F4v3-SMCC-DM1のIC50の低さ(有効性が高い)と相関している。図6Cは、遊離薬剤に対する細胞固有の感受性とADCのIC50との間に強い相関があることを示す。

30

40

hu10F4v3-SMCC-DM1の内部移行をFACSアッセイにて測定した。簡単に言うと、hu10F4v3-SMCC-DM1の存在下で、CD22-FITC(RFB4)による標準的なFACS技術によって、リンパ腫細胞を染色し、氷上で20~30分間インキュベートした。最初の染色後の細胞表面上のCD22レベルを決定するために、冷却したRPMI/10%FBS培地にて細胞を洗浄して、200 μlの予め温めたRPMI/10%FBSを加えて、37 °Cで15分間インキュベートした。80 μlの染色バッファと20 μlの熱不活性化正常マウス血清(HI-NMS)を添加した後、氷上で15分

50

間インキュベートした。抗DM1-Alexa-647を加え、氷上で20～30分間インキュベートし、そして、細胞を洗浄して、FACS分析の前に200 μ lのPBS/1%パラホルムアルデヒドにて固定した。最初の染色の後の表面および内部のCD22染色を決定するために、冷却したRPMI/10%FBSにて細胞を洗浄して、予め温めたRPMI/10%FBSを加えて、37 $^{\circ}$ Cで15分間インキュベートした。次いで細胞をFACS洗浄にて洗浄して、固定試薬A(DakoTM #k2311)にて室温で15分かけて固定し、固定試薬B(DakoTM)にて工程を繰り返した。染色バッファとHINMSを加えて、細胞混合物を氷上で15分間インキュベートした。固定試薬Bの後、抗DM1-Alexa-647を加え、室温にて20～30分間インキュベートした。細胞をFACS洗浄にて洗浄し、PBS/1%パラホルムアルデヒドにて固定した。各々の細胞混合物(表面染色、内部移行後の表面染色、及び内部染色)についてBD FACS CaliburTMフローサイトメーターを用いてFACS分析を行い、FlowJoTMソフトウェアにて分析した。結果を図6Bと図6Dに示す。図6Bでは内部移行したDM1の量の高さがIC50の低さ(高い有効性)と相関しており、図6Dでは、内部移行したDM1が蛍光顕微鏡検査法によって視覚化されている。

10

【0346】

インビボ有効性研究

インビボでの腫瘍体積の低減能について、毒素をコンジュゲートしているか、又は毒素をコンジュゲートしていない抗CD22モノクローナル抗体の有効性を試験するために、以下のプロトコルを行った。

20

SCIDマウスの側腹皮下に、 2×10^7 個のヒトB細胞リンパ腫細胞株を注入した。ヒトの細胞株には、ヒトパーキットリンパ腫細胞株であるDauidi、Ramos及びRaji細胞(American Type Culture Collection, Manassas, VA, USAから入手可能)、及び他のB細胞株、例えば、U-698-M細胞及びSu-DHL-4細胞(DSMZ, Braunschweig, Germanyから入手可能; Su-DHL-4細胞にはルシフェラーゼレポーター遺伝子を形質移入した)、DohH2細胞(上掲のKluin-Neilemans, H.C. (1991))、及びGrant-a-519(マントル細胞リンパ腫細胞、Jadayel, D.M.等, Leukemia 11(1): 64-72 (1997))、及びBJAB-1uc細胞(レポーター遺伝子ルシフェラーゼを発現するBJABヒトB細胞リンパ芽球様細胞株)を含めた。腫瘍が100～200mm³の平均腫瘍体積に達したときに、マウスを複数のグループに分け、以下の表4～16に示すように毒素コンジュゲート抗体又はコンジュゲートしていない抗体を0日目に静脈内注射して処置した。

30

【0347】

B細胞腫瘍体積を低減する抗CD22メイタンシン薬剤コンジュゲート

65匹のSCIDマウスの側腹の皮下に、マウス当たり0.2mlの体積の 2×10^7 個のBJAB-1uc細胞を注射した。細胞をHBSSに懸濁した。平均腫瘍サイズが100～200mm³に達したときに、マウスを各々9匹の4つのグループにランダムに分け、以下の表4に示す抗CD22又はコントロール抗体の単回I.V.処置(尾静脈から)を行った。

表4 インビボ腫瘍体積の減少
抗体投与

40

投与された抗体	TI	PR	CR	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 (μ g/m ²)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	9/9	2	0	3.0	200	4.6
hu10F4v2-smcc-DM1	9/9	0	0	3.4	200	4.0
hu10F4v1	9/9	0	0	3.4	---	---

「TI」-各グループの最終時点での腫瘍発症率、分子は腫瘍を持つ動物の数を指し、分母は動物の総数を指す。「PR」は、腫瘍が最初の体積から50～99%退縮している動

50

物の数を指す。「CR」は、完全な寛解に達した動物の数を指す。

各々の処置グループの平均腫瘍体積を、抗体投与後32日間モニターした。カリパスにて腫瘍測定値を得た。毒素-コンジュゲート抗CD22抗体の有効性は、コントロール及びコンジュゲートしていない抗体と比較して決定した。結果を図7Aに示す。マウス及びヒト化の10F4v1-smcc-DM1モノクローナル抗体は、コンジュゲートしていない抗CD22抗体及び非特異的なコントロール抗体と比較して、有意に腫瘍増殖を遅延させた。

【0348】

上記と同じプロトコルを用いてアッセイを行い、以下の表5に示すように、毒素コンジュゲートヒト化10F4v2を毒素コンジュゲートマウス及びネイキッドヒト化抗体と比較した。

表5 インビボ腫瘍体積の減少
抗体投与

投与された抗体	TI	PR	CR	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	9/9	0	0	4.2	200	3.2
mu10F4-smcc-DM1	7/9	1	2	4.7	200	2.9
hu10F4v2-smcc-DM1	8/9	1	1	4.5	200	3.0
hu10F4v2	9/9	0	0	4.5	---	---

「TI」-各グループの最終時点での腫瘍発症率、分子は研究グループの中の腫瘍を持つ動物の数を指し、分母は動物の総数を指す。「PR」は、腫瘍が最初の体積から50~99%退縮している動物の数を指す。「CR」は、完全な寛解に達した動物の数を指す。

各々の処置グループの平均腫瘍体積を、抗体投与後32日間モニターした。カリパスにて腫瘍測定値を得た。毒素-コンジュゲート抗CD22抗体の有効性は、コントロール及びコンジュゲートしていない抗体と比較して決定した。結果を図7Bに示す。マウス10F4-smcc-DM1及びヒト化10F4v2-smcc-DM1モノクローナル抗体は、コンジュゲートしていない抗CD22抗体及び非特異的なコントロール抗体と比較して、有意に腫瘍増殖を遅延させた。

【0349】

本明細書中に開示したコンジュゲート方法に従って、抗CD22抗体を、sppリンカー又はsmccリンカーによりDM1にコンジュゲートさせた。ネイキッド抗CD22抗体をポジティブコントロールとして用い、毒素コンジュゲートである抗HER2-spp-DM1および抗HER2-smcc-DM1をネガティブコントロールとして用いた。80匹のSCIDマウスの側腹皮下に、マウス当たり0.2mlの体積の 2×10^7 個のBJAB-1uc細胞を注射した。細胞をHBSSに懸濁した。平均腫瘍サイズが $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達したときに、マウスを各々10匹の6つのグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を静脈内投与した。投与は、週1回、合計3回繰り返した。表6を参照。

表6 インビボ腫瘍体積の減少
抗体投与

投与された抗体	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)
抗-Her2-spp-DM1 *	4	214
抗-Her2-smcc-DM1 **	6.9	405
抗-CD22-spp-DM1 *	5	214
抗-CD22-spp-DM1	2.5	107
抗-CD22-smcc-DM1 **	10	405
ネイキッド抗-CD22	10	---

10

* 一致した薬剤負荷

** 一致した薬剤負荷

週2回で3週間、その後週1回、全8週間の間、平均腫瘍体積をモニターした。経時的な腫瘍体積の変化(図7C)から、214及び107 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ のDM1で投与した抗CD22-spp-DM1と405 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ で投与した抗CD22-smcc-DM1がBJAB-1uc異種移植片腫瘍において強く同等の抗腫瘍活性を示したことが示された。すべての抗CD22 ADCグループは完全な応答を示した。

【0350】

本明細書中に開示したコンジュゲート方法に従って、抗CD22抗体である、RFB4、5E8及び7A2をsmccリンカーを介してDM1にコンジュゲートした。毒素コンジュゲートである抗HER2-smcc-DM1(本明細書中ではHER-smcc-DM1又はHER2-smcc-DM1とも交換可能に称する)をネガティブコントロールとして用いた。

SCIDマウスの様々な異種移植片においてこれら抗体の腫瘍体積低減能を試験した。マウスの異種移植片を生成するために用いたヒトB細胞リンパ腫細胞株はRamos細胞及びBJAB-1uc細胞とした。それぞれの異種移植片について、SCIDマウスの側腹皮下にマウス当たり0.1mlの体積の 5×10^6 個のヒトB細胞リンパ腫Ramos細胞(又は0.2mlの 2×10^7 個のBJAB-1uc細胞)を注射した。細胞をHBSSに懸濁した。平均腫瘍サイズが100~200 mm^3 に達したときに、マウスを各々8~10匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を単回静脈内投与した。それぞれのグループについてDM1薬剤負荷を200 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ に正規化して、投与したDM1の用量を求めた。平均腫瘍体積を週に2回、4週間モニターした。結果を以下の表7及び8に示し、図8A及び8Bにそれぞれプロットした。

表7 インビボ腫瘍体積の減少、Ramos異種移植片
抗体投与

投与された抗体	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)
抗-HER2-smcc-DM1	4.2	200
抗-CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200
抗-CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200

40

表8 インビボ腫瘍体積の減少、BJAB-1uc異種移植片
抗体投与

投与された抗体	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-HER2-smcc-DM1	4.2	200	3.2
抗-CD22(7A2)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗-CD22(5E8)-smcc-DM1	3.8	200	3.6
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1	3.2	200	4.25

これらの結果は、抗CD22-smcc-DM1抗体薬剤コンジュゲートが、コントロール抗体又はネイキッド抗CD22抗体と比較して、Ramos及びBJAB-1uc異種移植片のB細胞腫瘍体積を有意に低減することを示す。

【0351】

抗CD22-smcc-DM1抗体薬剤コンジュゲートのBJAB-1uc SCIDマウス異種移植片の腫瘍体積を低減する能力に対する、抗体薬剤負荷(抗体集団における1抗体にコンジュゲートした薬剤分子の平均数)の効果調べた。140匹のSCIDマウスの側腹皮下に、マウス当たり0.2mlの体積の 2×10^7 個のBJAB-1uc細胞を注射した。細胞をHBSSに懸濁した。平均腫瘍サイズが $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達したときに、マウスを各々8~10匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を単回静脈内投与した。薬剤負荷が相対的に低い、中間の又は高い(平均薬剤負荷がそれぞれ抗体当たり1.95、3.7又は6.75のコンジュゲートDM1分子である)抗CD22(RFB4)-smcc-DM1集団を試験抗体として投与した。ネイキッドRFB4抗体及び抗GP120-smcc-DM1(高薬剤負荷)をコントロールとした。抗体薬剤コンジュゲート(試験及びコントロール)の用量は $5 \text{ mg}/\text{kg}$ タンパク質レベルの用量に正規化した。抗体へのリンカーのコンジュゲート付着はリジン残基を介していた。表9を参照のこと。

表9 インビボ腫瘍体積の減少、BJAB-1uc異種移植片
抗CD22(RFB4)-smcc-DM1投与

投与された抗体	Ab用量 (mg/kg)	DM1用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-CD22(RFB4) (ネイキッド抗体)	10	--	--
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (低)	5	144	1.95
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (中間)	5	273	3.7
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1 (高)	5	497	6.75
抗-GP120-smcc-DM1 (高)	5	449	6.1

同じタンパク質レベル($5 \text{ mg}/\text{kg}$)で投与する場合、薬剤負荷が高い抗CD22(RFB4)-smcc-DM1(1抗体分子につき6.75DM1分子)は、3.7の中間の負荷である抗体薬剤コンジュゲートよりもわずかに良好に腫瘍体積を低減するのに対し、薬剤負荷が低い抗体薬剤コンジュゲートの効果は、コントロールコンジュゲートないしはネイキッド抗体とは異ならなかった。結果を図9にプロットした。

【0352】

B細胞腫瘍体積を低減する抗CD22アウリスタチン薬剤コンジュゲート

マウス異種移植片の腫瘍体積に対する抗CD22アウリスタチンMMAF薬剤コンジュゲートの効果を調べた。本明細書中に開示した方法に従って、抗CD22(RFB4)とコ

ントロール抗体である抗GP120をMCvcPABリンカー又はMCリンカーを介してMMAFにコンジュゲートした。SCIDマウスの側腹皮下に、マウス当たり0.2mlの体積の 5×10^6 個のRamos細胞を注射した。細胞をHBSSに懸濁した。平均腫瘍サイズが $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達したときに、マウスを各々8～10匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体をマウスに単回静脈内投与した。表10に、マウスに投与した薬剤用量、薬剤負荷(薬剤比率)及び抗体用量を示す。

表10 インビボ腫瘍体積の減少、Ramos異種移植片

抗CD22(RFB4)-MMAFコンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAF	405	6.6	4.2
抗-CD22(RFB4)-MC-MMAF	405	6.9	4.0
抗-GP120-MCvcPAB-MMAF	405	5.8	4.8
抗-GP120-MC-MMAF	405	5.9	4.7

Ramos RA1異種移植片において抗CD22-MC-MMAFは抗CD22-MCvcPAB-MMAFと同等の活性を示した。結果を図10にプロットする。

【0353】

マウス異種移植片の腫瘍体積に対する抗CD22アウリスタチンMMAE及びDM1薬剤コンジュゲートの効果を調べた。本明細書中に開示した方法に従って、抗CD22(RFB4)とコントロール抗体である抗GP120をMCvcPABリンカー又はMCリンカーを介してMMAEに、smccリンカーを介してDM1にコンジュゲートした。SCIDマウスの側腹皮下に、マウス当たり0.1mlの体積の 5×10^6 個のRamos細胞を注射した。細胞をHBSSに懸濁した。PBSをコントロールとして投与した。平均腫瘍サイズが $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達したときに、マウスを各々8～10匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を各マウスに単回静脈内投与した。表11に、マウスに投与した薬剤用量、薬剤負荷(薬剤比率)及び抗体用量を示す。

表11 インビボ腫瘍体積の減少、Ramos異種移植片

抗CD22(RFB4)-MMAE及びDM1コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAE 又は DM1 用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤成分/Ab)
抗-GP120-smcc-DM1	405	6.7	4.1
抗-CD22(RFB4)-smcc-DM1	405	6.5	4.25
抗-GP120-MCvcPAB-MMAE	405	6.0	4.7
抗CD22(RFB4)-MCvcPAB-MMAE	405	6.3	4.5
PBS	--	--	--

Ramos RA1異種移植片において抗CD22-MCvcPAB-MMAEは強力な抗腫瘍活性を示した。抗CD22-MCvcPAB-MMAEは抗CD22-smcc-DM1よりも優れた活性を示した。ADCコントロールである抗GP120-MCvcPAB-MMAEは有意な活性を示さなかった。結果を図11にプロットする。

【0354】

マウス異種移植片の腫瘍体積に対する抗CD22アウリスタチンMMAF及びDM1薬剤コンジュゲートの効果を調べた。抗CD22 hu10F4v2-MC-MMAF、hu10F4v2-smcc-DM1及びthio-10F4v1-MC-MMAFを投与し、腫瘍体積に対する効果について比較した。抗Her2-MC-MMAF及び抗Her2-sm

10

20

30

40

50

cc-DM1をコントロール抗体とした。SCIDマウスの側腹皮下に、マウス当たり0.2mlの体積の 2×10^7 個のBJAB-1uc細胞を注射した。細胞をHBSSに懸濁した。平均腫瘍サイズが $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達したときに、マウスを各々8~10匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を各マウスに単回静脈内投与した。本明細書中に開示したように「Thio」はthioMabを指し、リンカー-薬剤成分が抗体のシステイン改変部位を介して抗体にコンジュゲートしているものである。表12に、マウスに投与した薬剤用量、薬剤負荷(薬剤比率)及び抗体用量を示す。

表12 インビボ腫瘍体積の減少、BJAB-1uc異種移植片
Hu10F4 MMAF及びDM1コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF又はDM1用量($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab用量(mg/kg)	薬剤比(薬剤成分/Ab)
抗-Her2-MC-MMAF	100	1.1	6.3
Hu10F4v2-MC-MMAF	100	2.0	3.4
Hu10F4v2-MC-MMAF	50	1.0	3.4
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	100	4.6	1.5
Thio-hu10F4v1-MC-MMAF	50	2.3	1.5
抗-Her2-smcc-DM1	200	4.2	3.2
Hu10F4v2-smcc-DM1	200	4.5	3.0
Hu10F4v2-smcc-DM1	100	2.3	3.0

BJAB-1uc異種移植片においてHu10F4v2ADCは強力な抗腫瘍活性を示した。結果を図12にプロットする。

【0355】

上記の実験に開示した手順を用いて、異なる異種移植片における異なる用量のhu10F4v3-smcc-DM1及び-MC-MMAFADCの効果を調べた。SuDHL4-1uc、DoHH2及びGrant-519の異種移植片を本明細書に開示したように調製した。平均腫瘍サイズが $100 \sim 200 \text{ mm}^3$ に達したときに、マウスを各々8~10匹のグループにランダムに分け、試験抗体又はコントロール抗体を各マウスに単回静脈内投与した。表13A-13Cに、マウスに投与した薬剤用量、薬剤負荷(薬剤比率)及び抗体用量を示し、結果を図13A-13Cに示す。

表13A SuDHL4-1uc異種移植片におけるインビボ腫瘍体積の減少
Hu10F4v3 MMAF及びDM1コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF又はDM1用量($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab用量(mg/kg)	薬剤比(薬剤/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	13.6	2.9
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	6.8	2.9
抗-Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.3	3.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.0

表13B DoHH2異種移植片におけるインビボ腫瘍体積の減少
Hu10F4v3 MMAF及びDM1コンジュゲート投与

10

20

30

40

50

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	600	11.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	600	11.8	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
抗-Her2-MC-MMAF	600	9.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	600	13.1	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
ネイキッド hu10F4v3	--	13.1	--

10

表 13C Granta-519 異種移植片におけるインビボ腫瘍体積の減少
Hu10F4v3 MMAF 及び DM1 コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤/Ab)
抗-Her2-smcc-DM1	300	5.9	3.3
Hu10F4v3-smcc-DM1	300	5.9	3.35
Hu10F4v3-smcc-DM1	150	2.9	3.35
抗-Her2-MC-MMAF	300	4.9	4.0
Hu10F4v3-MC-MMAF	300	6.6	3.04
Hu10F4v3-MC-MMAF	150	3.3	3.04
ネイキッド hu10F4v3	--	6.6	--

20

試験したすべての異種移植片モデルにおいて抗 CD22 hu10F4v3-smcc-DM1 及び -MC-MMAF ADC は強力な腫瘍低減を示した。

30

【0356】

実施例 10：システイン改変抗 CD22 抗体の調製

本明細書中に開示するようにシステイン改変抗 CD22 抗体の調製を行った。10F4v2 と同じ可変領域及び定常領域の配列 (軽鎖、配列番号：87、及び重鎖、配列番号：88、図 5B) を有する 10F4v3 抗体をコードする DNA に本明細書中に開示した方法によって突然変異を誘発し、軽鎖、重鎖又は重鎖の Fc 領域を改変した。軽鎖をコードする DNA に突然変異を誘発し、図 17A に示すように軽鎖のカバット位置 205 (連続した位置 210) のシステインをパリンに置換した (ヒト化抗体 10F4v3 thiomab の軽鎖配列番号：91)。重鎖をコードする DNA に突然変異を誘発し、図 17B に示すように重鎖の EU 位置 118 (連続した位置 121) のシステインをアラニンに置換した (ヒト化抗体 10F4v3 thiomab の重鎖配列番号：92)。Fc 領域に突然変異を誘発し、図 17C に示すように重鎖 Fc 領域の EU 位置 400 (連続した位置 403) のシステインをセリンに置換した (重鎖配列番号：93)。

40

【0357】

還元及び再酸化によるシステイン改変抗 CD22 抗体の調製

CHO 細胞に発現する完全長のシステイン改変抗 CD22 モノクローナル抗体 (Thiomab) をおよそ pH 8.0 の 500 mM ホウ酸ナトリウム及び 500 mM 塩化ナトリウムに溶解し、およそ 50 ~ 100 倍過剰な 1 mM TCEP (トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィンハイドロクロライド; Getz 等 (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; S

50

oltec Ventures, Beverly, MA)にて37 °Cでおよそ1~2時間かけて還元する。還元したThioMabを希釈し、10mM酢酸ナトリウム、pH5にてHiTrap Sカラムに流し、0.3M塩化ナトリウムを含むPBSにて溶出する。溶出した還元ThioMabをpH7の2mMデヒドロアスコルビン酸(dhAA)にて3時間、又は2mM硫酸銅水溶液(CuSO₄)にて室温で終夜をかけて処理する。外気酸化も有効であるかもしれない。Sephadex G25樹脂に溶出することによってバッファを交換し、1mM DTPAを有するPBSにて溶出する。この溶液の280nmの吸光度から還元した抗体の濃度を決定し、DTNB(Aldrich, Milwaukee, WI)と反応させて412nmの吸光度を決定することによってチオールの濃度を決定することによってチオール/Ab値を確認する。

10

【0358】

実施例11: システイン改変抗CD22抗体と薬剤-リンカー中間生成物とのコンジュゲートによるシステイン改変抗CD22抗体薬剤コンジュゲートの調製

実施例10の還元及び再酸化の手順の後に、システイン改変抗CD22抗体をPBS(リン酸緩衝生理食塩水)バッファに溶解し、氷上で冷却する。マレイミドなどのチオール反応性官能基を有する、アウリスタチン薬剤リンカー中間生成物、例としてMC-MMAE(マレイミドカプロイル-モノメチルアウリスタチンE)、MC-MMAF、MC-val-cit-PAB-MMAE、又はMC-val-cit-PAB-MMAFの抗体当たりの改変システインと比較したときのおよそ1.5モル等価物をDMSOに溶解し、アセトニトリルと水にて希釈し、PBS中の冷却した還元、再酸化抗体に加える。およそ1時間後、過剰のマレイミドを加えて、反応を止め、任意の反応していない抗体チオール基をキャップする。遠心限外濾過によって反応混合物を濃縮し、システイン改変抗CD22抗体薬剤コンジュゲートを精製し、PBSのG25樹脂により溶出して脱塩し、滅菌条件下にて0.2µmフィルターにより濾過し、貯蔵のために凍結する。

20

以下のようにhu10F4v3HC(A118C)thiomab-BMPEO-DM1の調製を行った。抗体の表面上の反応していないマレイミド基を残すビス-マレイミド試薬であるBM(PEO)4(Pierce Chemical)によってhu4D5Fabv8-(V110C)ThioFabを含むリン酸緩衝生理食塩水溶液に加えて、1時間反応させることによって行った。過剰なBM(PEO)4は、150mM NaClバッファを有する30mMクエン酸塩、pH6のゲル濾過(HiTrapカラム、Pharmacia)によって除去した。ジメチルアセトアミド(DMA)に溶解したおよそ10倍モル過剰のDM1を、hu4D5Fabv8-(V110C)ThioFab-BMPEO中間生成物に加えた。また、ジメチルホルムアミド(DMF)が薬剤成分試薬を溶解するために使用されてもよい。反応混合物を終夜反応させて、PBSにてゲル濾過又は透析を行って、反応しなかった薬剤を除去した。PBSのS200カラムのゲル濾過を用いて、高分子量集合体を取り除き、精製されたhu10F4v3HC(A118C)thiomab-BMPEO-DM1に与えた。

30

同じプロトコールによって、コントロールHC(A118C)Mab-MC-MMAF、コントロールHCThioMab-MC-MMAF、コントロールHCThioMab-MCvcPAB-MMAEおよびコントロールHCThioMab-BMPEO-DM1を調製した。

40

上記の手順によって、以下のシステイン改変抗CD22抗体薬剤コンジュゲートを調製して、試験した。

A118Cthiohu10F4v3およびMC-MMAFのコンジュゲートによるthiohu thio-HC-10F4v3-MC-MMAF、

A118Cthiohu10F4v3及びMC-val-cit-PAB-MMAEのコンジュゲートによるthiohu thio-HC-10F4v3-MC-val-cit-PAB-MMAE、

50

A 1 1 8 C t h i o h u H C - 1 0 F 4 v 3 及び b m p e o - D M 1 のコンジュゲートによる t h i o h u H C - 1 0 F 4 v 3 - b m p e o - D M 1、

V 2 0 5 C t h i o h u L C - 1 0 F 4 v 3 及び M C - v a l - c i t - P A B - M M A E のコンジュゲートによる t h i o h u L C - 1 0 F 4 v 3 - M C - v a l - c i t - P A B - M M A E、及び、

S 4 0 0 C t h i o h u F c - 1 0 F 4 v 3 及び M C - v a l - c i t - P A B - M M A E のコンジュゲートによる t h i o h u F c - 1 0 F 4 v 3 - M C - v a l - c i t - P A B - M M A E。

【 0 3 5 9 】

実施例 1 2 : システイン改変 T h i o M A b 薬剤コンジュゲートの細胞表面抗原への結合親和性の特徴付け

B J A B - 1 u c 細胞に発現される C D 2 2 への t h i o h u 1 0 F 4 v 3 薬剤コンジュゲートの結合親和性を F A C S 分析にて測定した。簡単に言うと、およそ 1×10^6 細胞を含む $100 \mu\text{l}$ を、様々な量の以下のいずれか一の抗 C D 2 2 T h i o M A b 薬剤コンジュゲートと接触させた。t h i o h u L C (V 2 0 5 C) 1 0 F 4 v 3 - M C v c P A B - M M A E、t h i o h u F c (S 4 0 0 C) 1 0 F 4 v 3 - M C v c P A B - M M A E、t h i o h u H C (A 1 1 8 C) 1 0 F 4 v 3 - M C v c P A B - M M A E、t h i o h u H C (A 1 1 8 C) 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F、又は t h i o h u H C (A 1 1 8 C) 1 0 F 4 v 3 - B M P E O - D M 1 (それぞれ図 1 8 A - 1 8 E を参照)。ビオチン化されたヤギ抗 h u F c プラスストレプトアビジン - P E を用いて、細胞表面に結合した抗 C D 2 2 抗体を検出した。図 1 8 A - 1 8 E のプロット線は、試験した t h i o m a b 薬剤コンジュゲートのすべてについて抗原結合がおよそ同じであったことを示す。

【 0 3 6 0 】

実施例 1 3 : 抗 - C D 2 2 T h i o M a b 薬剤コンジュゲートによるインビボ腫瘍体積低減についてのアッセイ

異種移植片モデルにおいて B 細胞腫瘍体積を低減するために実施例 1 1 に従って調製した t h i o m a b 薬剤コンジュゲートの能力を、本明細書中の実施例 9 に開示した手順に従って試験した。G r a n t a - 5 1 9 細胞異種移植片腫瘍を有する S C I D マウスに、コントロールおよび抗 C D 2 2 ヒト化 1 0 F 4 v 3 t h i o m a b 薬剤コンジュゲートを、以下の表 1 4 に示す用量で 0 日目に投与した。コントロール H C (A 1 1 8 C) t h i o m a b は抗 H E R 2 4 D 5 抗体とした。

表 1 4 G r a n t a - 5 1 9 異種移植片におけるインビボ腫瘍体積低減、t h i o H u 1 0 F 4 v 3 M M A E および M M A F コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤 / Ab)
Thio Control HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.99	1.65
Thio Control HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.33	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	100	3.41	1.95
Thio 10F4v3-LC(V205C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	100	3.76	1.8
Thio 10F4v3-Fc(S400C)-MCvcPAB-MMAE	100	4.23	1.6

この実験の結果を図 1 9 に示す。表 1 4 に示す用量の t h i o 1 0 F 4 v 3 - L C - (V 2 0 5 C) - M C v c P A B - M M A E および t h i o 1 0 F 4 v 3 - H C (A 1 1 8 C) - M C v c P A B - M M A E t h i o m a b 薬剤コンジュゲートの投与によって、試験の間に、平均腫瘍体積の減少が生じた。

【 0 3 6 1 】

薬剤用量は異なるが同じプロトコルを用いて、CB17 SCIDマウスのGranta-519異種移植片において更なるthiomab薬剤コンジュゲートを試験した。コントロール抗体又はコントロールthiomabは、抗HER2 4D5抗体又はHC(A118C) thiomabとした。結果を以下の表15に示す。

表15 Granta-519異種移植片におけるインビボ腫瘍体積低減、thioHu10F4v3 MMAE、MMAFおよびDM1コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤 / Ab)
10F4v3-MC-MMAF	150	3.2	3.1
Thio Control HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio Control HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	6.5	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	150	5.3	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	75	2.7	1.9
Thio Control HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.2	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	150	5.1	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	75	2.6	1.95

10

20

この実験の結果を図20Aに示す。150および75 $\mu\text{g}/\text{m}^2$ のthio10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thiomab薬剤コンジュゲートの投与により、試験の間に、平均腫瘍体積の減少が生じた。同じ試験において、初めの7日の体重変化の割合を各々の用量グループにおいて決定した。図20Bにプロットした結果は、これらのthiomab薬剤コンジュゲートの投与によってこの間に体重損失が生じなかったことを示す。

【0362】

30

同じ試験において、上記の実施例に開示したのと同じ異種移植片試験プロトコルを用いて、投与されるTDCおよび用量を変化させて、CB17 SCIDマウスの濾胞性リンパ腫DOHH2異種移植片におけるTDCの有効性を調べた。TDCおよび用量を以下の表16に示す。

表16 DOHH2異種移植片におけるインビボ腫瘍体積減少、ThioHu10F4v3 MMAE、MMAFおよびDM1コンジュゲート投与

投与された抗体	MMAF 又は DM1 用量 ($\mu\text{g}/\text{m}^2$)	Ab 用量 (mg/kg)	薬剤比 (薬剤 /Ab)
10F4v3-MC-MMAF	300	6.4	3.1
Thio Control HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	21.9	1.79
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	600	20.8	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-BMPEO-DM1	300	10.4	1.9
Thio Control HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	26.0	1.55
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	600	21.4	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	300	10.7	1.9
Thio Control HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.8	1.9
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	600	20.4	1.95
Thio 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	300	10.2	1.95

10

図 20C は、同じ重鎖 A118C 抗 CD22 TDC であるが表 16 に示すように高い用量で処置した CB17 SCID マウスの濾胞性リンパ腫 DOHH2 異種移植片における経時的な平均腫瘍体積の変化をプロットしているグラフである。抗 CD22 10F4v3-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC は、この試験において最も効果的な試験薬剤であるようであった。しかしながら、この実験において服用レベルを増加すると、抗-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE コントロールにいくらかの有効性が示された。この活性は、おそらく循環中の ADC からの薬剤の放出に起因している。抗-CD22 hu10F4-HC(A118C)-MC-MMAF 及び-BMPEO-DM1 試験薬剤は中間の有効性を示し、これはこれらリンカーの安定性の増加と一致しており、結合しない抗 HER2 コントロールはほとんど活性を示さなかった。図 20D は DOHH2 異種移植片試験のマウスの体重変化の割合をプロットしたものであり、試験の開始 14 日間では体重の有意な変化がなかったことを示す。

20

【0363】

30

実施例 14：ラットおよびカニクイザルにおける抗-CD22 薬剤コンジュゲートの安全性

サル

hu10F4 抗 CD22 抗体は、ヒト CD22 に対するのと同等の親和性を有してカニクイ(cyno)サル CD22 と交差反応する。hu10F4 抗 CD22 抗体はラット CD22 と交差反応しない。したがって、標的非依存的及び標的依存的な安全性と抗 CD22 薬剤コンジュゲートの毒性を、ラットおよび cyno において評価した。

ラットにおける安全性と毒性

ラットにおける安全性と毒性の研究のために、2つの研究を行った。一つは、薬剤が切断可能なリンカー(-vc-又は-spp-)又は切断不可能なリンカー(MC又はSMCC(MCCとも称する))を介して連結されている hu10F4v3-SMCC-DM1、-SPP-DM1、-MC-vc-PAB-MMAE、又は-MC-MMAF コンジュゲートを、1日目にラットに静脈内投与した。ビヒクルをコントロールとして投与した。薬物動態学的分析のために5日目に、そして12日目(解剖時)に血液試料を採取した。週に少なくとも3回、臨床診察と体重記録を行った。血清 AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)を毒性の指標としてモニターした。切断可能なリンカーを含む 20mg/kg の hu10F4v3-vcMMAE および hu10F4v3-SPP-DM1 を投与したラットにおいて、0日目と比較して5日目に血清 AST レベルが増加した(図 21A)。20mg/kg の hu10F4v3-MC-MMAF 又は hu10F4v3-MCC-DM1 (切断不可能なリンカー、図 21B)を投与したラットにおいて、0日目と比較して5日目に好中球レ

40

50

ベルが増加した。h u 1 0 F 4 v 3 - v c - M M A E 又は h u 1 0 F 4 v 3 - S P P - D M 1 を投与したラットにおいて、0日目と比較して5日目に好中球レベルが減少した。切断不可能なリンカーを含むADCを投与したラットにおける血清ASTの増加と好中球の減少は、このADCの毒性の増加を表す。

同じラットの試験において、6匹のグループに、20、40又は60mg/kgのh u 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F 又は h u 1 0 F 4 v 3 - S M C C - D M 1 を1日目に投与し、12日間モニターした。h u 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F を投与したラットでは、以下の所見が観察されなかった。体重の減少、血清肝酵素の増加、血小板の減少、または好中球の減少。h u 1 0 F 4 v 3 - S M C C - D M 1 を投与したラットでは、可逆的な体重の減少と血清肝酵素の可逆的な増加が、40および60mg/kgの服用レベルで観察されたのに対して好中球の可逆的な減少と血小板の一過性の減少が60mg/kgの用量で観察された。

【0364】

カニクイザルにおける安全性と毒性

霊長動物モデルにおいて抗CD22 ADCの安全性と毒性を評価するために、30匹のカニクイザルを以下の処置群に割り当てた。ピヒクルコントロール(6頭)、2、4および6mg/m²薬剤用量のh u 1 0 F 4 v 3 - S M C C - D M 1 (0、10、20および30mg/kgの抗体用量の等価物；各用量グループ当たり4頭)、および2、4および6mg/m²の用量のh u 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F (各用量グループ当たり4頭)。1日目及び22日目に動物に静脈内投与した。体重、摂食量および病理学指標の変化について動物を評価した。毒物的効果、薬力学的効果、及び抗薬剤抗体効果を評価するために血液試料を採取してアッセイした。各グループの半分の動物をそれぞれ25日目及び43日目に安楽死させ、組織試料を採取した。

いずれのADCグループにも注目すべき体重変化はなかった。血清肝酵素AST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)、ALT(アミノトランスフェラーゼ)およびGGT(-グルタミルトランスペプチダーゼ)のレベルを、関連する分野で周知の標準的な分析法に従ってアッセイした。血清肝酵素の可逆的な増加は30mg/kgのいずれのADCを投与した動物においても観察されたが、ALTはDM1グループにおいて上昇したのに対して、ASTおよびGGTはMMAFグループにおいて上昇した。DM1グループの20mg/kgを投与した4頭のうちの2頭、そして30mg/kgを投与した4頭のうちの4頭において、座骨神経退化がわずか～軽度に生じた。MMAFグループの30mg/kgを投与した4頭のうちの1頭において座骨神経退化が極わずかに生じた。様々な臓器の組織を顕微鏡で調べた。30mg/kgのMMAFグループの4頭のうちの2頭は不明の重要な肺病変があったのに対して、DM1グループでは観察されなかった。

【0365】

h u 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F 及び - S M C C - D M 1 ADCによる末梢のB細胞の枯渇は、0日目及び22日目に投与したカニクイザルにおいて43日間にわたって血中のCD20+細胞レベルを測定することによって決定した。試験の間に定期的に取り出した血液は、蛍光性標識抗CD20抗体を用いたFACSによってアッセイした。抗CD22 M M A F および D M 1 ADCは、図22A(MMAFグループ)および図22B(DM1グループ)に示すようにカニクイザル末梢B細胞を減少(枯渇)させる。CD4+細胞が同じ期間で有意に減少されなかったことを示す図23A及び23Bに示すように、他のリンパ球集団についてMMAF又はDM1 ADCの有意な作用は観察されなかった。

図24Aおよび24Bの顕微鏡写真に示されるように、コントロールと比較してカニクイザルの扁桃腺試料においてH u 1 0 F 4 v 3 - S M C C - D M 1 は、胚中心B細胞を減少させた。例示的な胚中心は、図24Aの円で示す。図24Bに示されるように、胚中心B細胞の完全な除去は10mg/kgの服用レベルで観察された。同じ結果は、同じ条件下でのh u 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F ADCの投与の後に得られた。

10mg/kgで投与されるH u 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F は、カニクイザルの脾臓濾胞性胚中心から分化するB細胞を減少させた。図25Aの線図および図25Bおよび2

10

20

30

40

50

5 C の組織顕微写真を参照。h u 1 0 F 4 v 3 - S M C C - D M 1 A D C を同じ条件下で試験した場合に、同じ結果が得られた。胚中心は、K i - 6 7 染色を用いて図 2 5 B の暗領域として観察され、図 2 5 D の検出可能的に標識した抗 I g D 抗体によって染色した場合には暗領域に囲まれた非染色領域として現れる。抗 - 1 0 F 4 v 3 - M C - M M A F による胚中心 B 細胞の枯渇による胚中心の喪失を図 2 5 C 及び 2 5 E に示す。ゆえに、これらの細胞分裂阻害剤は B 細胞群の増殖に影響を及ぼす。

【受託番号】

【 0 3 6 6 】

下記のハイブリドーマは、アメリカ培養細胞系統保存機関(登録商標)、PO Box 1549, Manassas, VA, 20108, USA(A T C C (登録商標))に寄託されている。

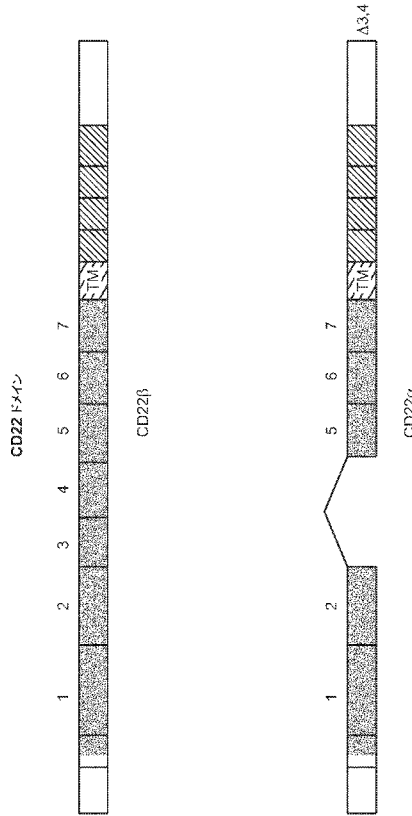
細胞株	A T C C 寄託番号	寄託日
ハイブリドーマ 1 0 F 4 . 4 . 1	P T A - 7 6 2 1	2 0 0 6 年 5 月 2 6 日
ハイブリドーマ 5 E 8 . 1 . 8	P T A - 7 6 2 0	2 0 0 6 年 5 月 2 6 日

これらの寄託は、特許手続き上の微生物の寄託の国際的承認に関するブダペスト条約及びその規則(ブダペスト条約)の規定に従って行われた。これは、寄託の日付から 3 0 年間、寄託の生存可能な培養が維持されることを保証するものである。これらの細胞系統は、ブダペスト条約の条項に従い、またジェネンテック社と A T C C との間の合意に従い、A T C C から入手することができ、これは、どれが最初であろうとも、関連した米国特許の発行時又は任意の米国又は外国特許出願の公開時に、細胞系統を永久かつ非制限的に入手可能とすることを保証し、米国特許法第 1 2 2 条及びそれに従う特許庁長官規則(特に参照番号 8 8 6 O G 6 3 8 の 3 7 C F R 第 1 . 1 4 条を含む)に従って権利を有すると米国特許商標庁長官が決定した者に細胞系統を入手可能とすることを保証するものである。

本出願の譲受人は、寄託した細胞系統が、適切な条件下で培養されていた場合に死亡もしくは損失又は破壊されたならば、通知により細胞系統を同一の他のものと即座に取り替えることに同意する。寄託された細胞系統の入手可能性は、特許法に従いあらゆる政府の権限下で認められた権利に違反して、本発明を実施するライセンスであるとみなされるものではない。

前述の発明は、理解を明確にするための図説及び実施例によってある程度詳細に記載されているが、この説明及び実施例は本発明の権利範囲を限定するものとみなされるものではない。本明細書中において引用したすべての特許文献及び科学文献の開示内容は、出典明記によってその全体が特別に援用される。

【 図 1 A 】



【 図 1 B 】

```

1 mhlqpwll lv'eylafsd sskwfehpe t'yawegacy wlpctyrald gdesfilfh
61 npeynkntak fdqtrlyeat kdkqvpeqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqilr
121 mesktekwe zihrvserp fpphigippe iqescevtll clinfscyyg piqqlwileg
181 vprqqaavts tsitiksveh rse kfepcw shhgkvtvqg lqdadqkfls ndtvganvk
241 pkkvltivig npeplregdt vtlscnyss npsvtyvewk phgaweepsl gykicmivcw
301 hnttiaaear nawsaaspv ainvqyapri vzvkkikpis eihagsvsl qdfessipk
361 gqfffwekg rllqkeaglr fcsispedag yscwvntsi qqtaskawti evlyaprrlr
421 vsmqyqdm eqkkahtlce sdanppvshy twfdwnngsi pyhsqkrlie p'vqghsgay
481 wcaqtaavk qzspstltv vsspetqerr vavqlsela lllalaiclk lqrrwrtqs
541 qqqlqenssg cdfvrnkky rraplaeaph sigcynpme dqiasytlrlr penniprtgd
601 aessengrpp pdcdtdvtys ahhkrvqgm rrsqifqkm rjfatqs (配列番号:27)

```

【 図 1 C 】

```

1 mhlqpwll lv'eylafsd sskwfehpe tiyawegacy wlpctyrald gdesfilfh
61 npeynkntak fdqtrlyeat kdkqvpeqk rvqflgdknk nctlsihpvh lndsgqilr
121 mesktekwe rihrvserp fpphigippe iqescevtll clinfscyyg piqqlwileg
181 vprqqaavts tsitiksveh rscikfepcw shhgkvtvqg lqdadqkfls ndtvganvk
241 pkkvltivig npeplregdt vtlscnyss npsvtyvewk phgaweepsl gykicmivcw
301 hnttiaaear nawsaaspv ainvqyapri vzvkkikpis eihagsvsl qdfessipk
361 gqfffwekg rllqkeaglr fcsispedag yscwvntsi qqtaskawti evlyaprrlr
421 vsmqyqdm eqkkahtlce sdanppvshy twfdwnngsi pyhsqkrlie p'vqghsgay
481 wcaqtaavk qzspstltv vsspetqerr vavqlsela lllalaiclk lqrrwrtqs
541 qqqlqenssg cdfvrnkky rraplaeaph sigcynpme dqiasytlrlr penniprtgd
601 aessengrpp pdcdtdvtys ahhkrvqgm rrsqifqkm rjfatqs (配列番号:29)

```

【 図 1 D 】

```

MHLQPWLLILEYLA FSDS SKWNI EHPGTIYAWEGACI WVFCTYRVLDGA
LETFLPHNFEYQNMSK FEGTRLYESTKDGKVPSPGQRKRVQFLGNKINNNC
TLSIHPhVHNDSSGQLGLRMVSKTKKMYERIHLMVSRPFPRIQLPKLQE
SQEVLTCCLNFSYCYGQIQQLQWLLLEGAPMRQAAVLTLSITKSVTRSKEL
KPSQWSSHGKLVCEELDQVQKVLSEDEVLQNVKHTPKLTI LEVTPNETIV
RKGDSVWMECKVNSNPFYTTVSWLKDDIPEKQNTLMPLHEVTKSQTGT
YOCRVSNQVGPATSEKVFLOVQYAFEPFSRVQISQSFAVEGSEVNFLOISPA
NPLPFTYTWYHNGREVQGRTEKQPCIQKILFW:AGTYSCVAENILGIGERG
PGTELDVQYFPKKVITWV IENPDEIREGDTVTLSCNYSSNPIVNHYEWPR
GAWHKPSLGVKIQNGWNNI AVACAACNWCWSASPVII NVIYAPRGVRV
RKIKPLSEI HSGNLVSLQODESESHPEKVEQFEWKKGSLLCESQLNFDSI
SPEDAGSYSCWVNSIGQTASKARTLEVLYAPRRLPVMSQGNQVMEGKTA
ILTCESDANFPVYSAWE DWNQSLPYSGRMLRLEPRVQVHSGGAYWCQGN
RVGKGSPLITLTYYSPEITGRRVAVGLASCLALILLAYCGPVQVRWKR
TQSQQGLQENSQGSFVRNKVVRTELSEGEHSLGCYNNMXYEDGISYATL
RPFETNTPRTGDAETS ELQRLPDCDDVTVYSVLQKRQVSDYENVIPDFEP
DEGIHYSSELIQGFWRPQAQENVDYIVVKH (配列番号:31)

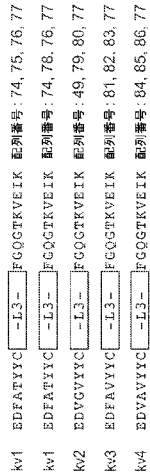
```

【 図 2 A 】

抗CD22 10F4抗体の重鎖可変ドメイン配列アラインメント

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
humH1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	S	G	P	T	F	S	S	V	A	K	S	I	R	V	R	O	A	
キアラ10F4	V	L	L	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	S	G	P	T	F	S	S	V	A	K	S	I	R	V	R	O	A				
h10F4v1	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	S	G	P	T	F	S	S	V	A	K	S	I	R	V	R	O	A	
h10F4v2	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	L	V	Q	P	G	S	L	R	L	S	C	A	S	G	P	T	F	S	S	V	A	K	S	I	R	V	R	O	A	
414243444546474849505152	A	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78												
humH1	P	G	K	G	L	E	W	V	S	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	E	I	S	R	D	N	S	K	R	F	L		
キアラ10F4	P	G	G	L	E	R	R	E	H	I	Y	P	D	D	G	H	I	Y	S	G	K	K	G	K	G	K	P	F	I	S	A	D	S	S	S	F	E		
h10F4v1	P	G	K	G	L	E	W	V	S	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	E	I	S	R	D	N	S	K	R	F	L		
h10F4v2	P	G	K	G	L	E	W	V	S	I	S	G	D	G	G	S	T	Y	A	D	S	V	K	G	R	P	E	I	S	R	D	N	S	K	R	F	L		
79808182	a	b	c	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	A	B	C	101	102	103	104	105	106	107	108							
humH1	Y	L	Q	H	N	S	L	R	A	E	D	F	A	V	Y	C	A	R	E	G	S	S	W	D	H	Y	P	D	V	N	G	G	G	T	L	V	T	V	S
キアラ10F4	Y	L	Q	H	N	S	L	R	A	E	D	F	A	V	Y	C	A	R	E	G	S	S	W	D	H	Y	P	D	V	N	G	G	G	T	L	V	T	V	S
h10F4v1	Y	L	Q	H	N	S	L	R	A	E	D	F	A	V	Y	C	A	R	E	G	S	S	W	D	H	Y	P	D	V	N	G	G	G	T	L	V	T	V	S
h10F4v2	Y	L	Q	H	N	S	L	R	A	E	D	F	A	V	Y	C	A	R	E	G	S	S	W	D	H	Y	P	D	V	N	G	G	G	T	L	V	T	V	S

【 図 4 B 】



【 図 5 A 】

```

230      240      250      260      270
humIgG1  PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
humIgG2  PAP~PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
humIgG3  PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
humIgG4  PAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYV
      ****                      *      *

280      290      300      310      320
humIgG1  DQVEVHNAKTKFREQYNTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALP
humIgG2  DQVEVHNAKTKFREQFNSTFRVVSVLTVHLDWLNHKEYKCKVSNKGLP
humIgG3  DQVEVHNAKTKFREQFNSTFRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKALP
humIgG4  DQVEVHNAKTKFREQFNSTYRVVSVLTVHLQDWLNGKEYKCKVSNKGLP
      *      *                      *      *

330      340      350      360      370
humIgG1  APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG2  APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG3  APIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
humIgG4  SSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
      **      *                      *      *

380      390      400      410      420
humIgG1  EWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH
humIgG2  EWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH
humIgG3  EWESNGQPENNYNTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH
humIgG4  EWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMH
      *      *                      *      *

430      440
humIgG1  EALHNHYTQKSLSLSPGK  配列番号: 38
humIgG2  EALHNHYTQKSLSLSPGK  配列番号: 39
humIgG3  EALHNRYTQKSLSLSPGK  配列番号: 40
humIgG4  EALHNHYTQKSLSLSLGK  配列番号: 41
      **      *

```

κ 軽鎖定常領域コンセンサ配列:

```

RTVAAPSVFIFPPSDDEQLKSGTASVVCCLLNNFYPREAKVQNK
VDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC  配列番号: 37

```

【 図 5 B 】

抗CD22 h10F4v2軽鎖

```

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRSSQSIIVHSGNTFLEWYQKPKGKAPKLLI
YKVSNRFSGVPSRFSGSSTGDFPLTISLQPEDFATYICFQGSQFPYTFGGQ
TKVETIKRTVAAESVFIPTPPSDEQLKSGTASVYVCLLNNFYPREAKVQNKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK
SFNRGEC (配列番号: 87)

```

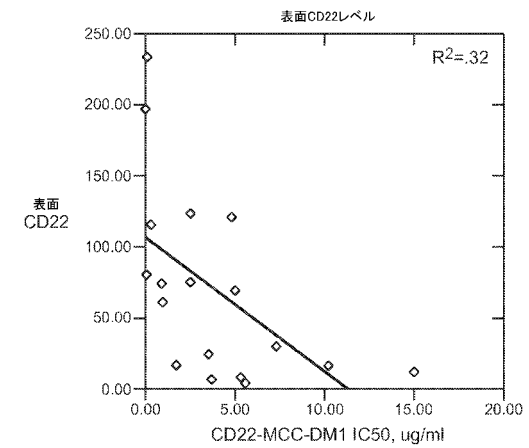
抗CD22 h10F4v2重鎖

```

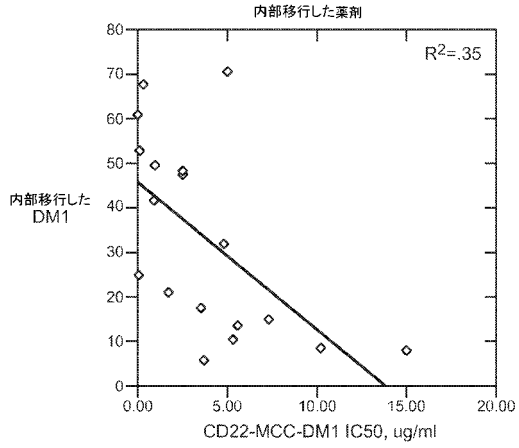
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYEFPSRSMNWVRQAPGKOLEWVGRITP
GDGDTNYSGKFKGRPTISADTSKNTAYLQMNLSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
FDVWGQGLTVTVSSASTKGGSPVPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYPPPEEVTY
SWNSGALTSQVHTFPFVAVLQSSGLYSLSVTVTPSSSLCTQTYICNVNPKPSNT
KVDKKEPKSCDKTHTCPCCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKFREQYNTYRVVSVLTVHLQDWLN
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL
VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPLDSDGSEFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号: 88)

```

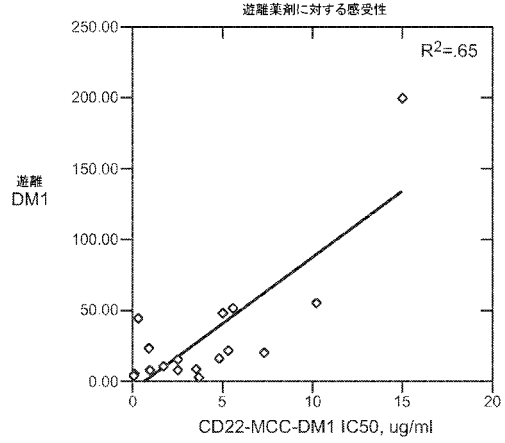
【 図 6 A 】



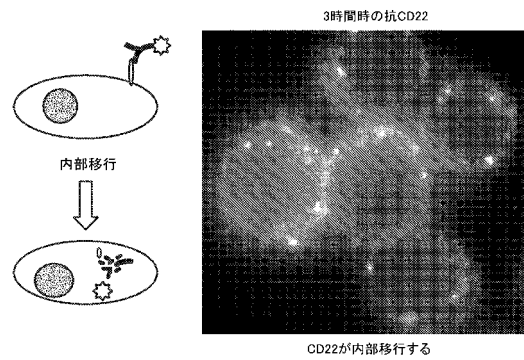
【 図 6 B 】



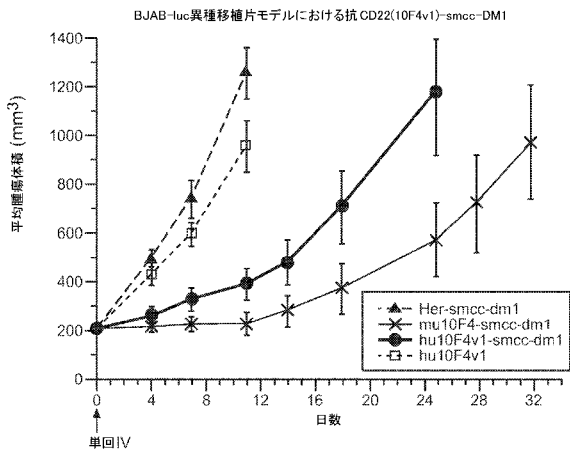
【 図 6 C 】



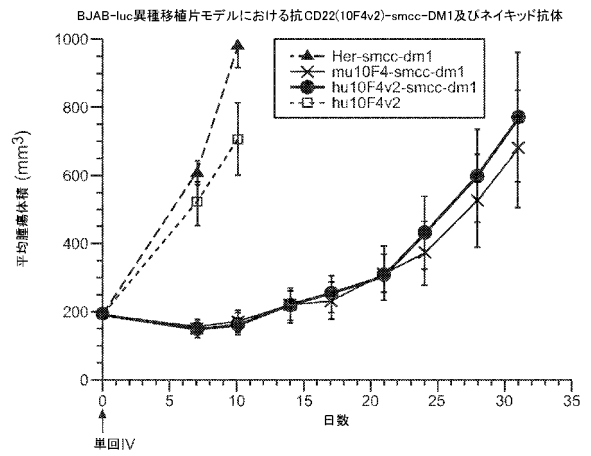
【 図 6 D 】



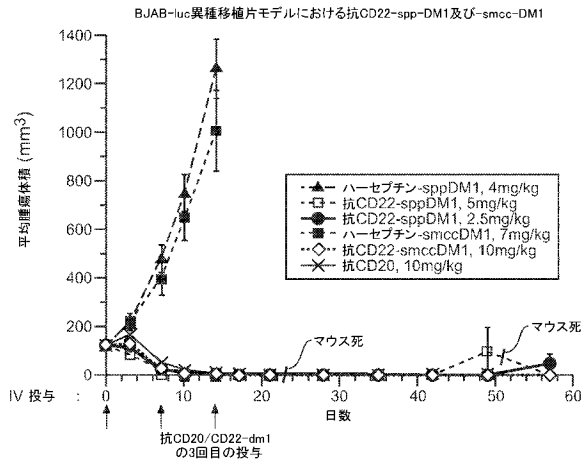
【 図 7 A 】



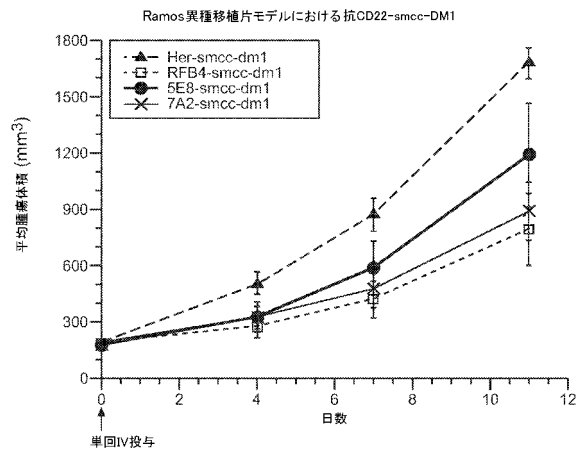
【 図 7 B 】



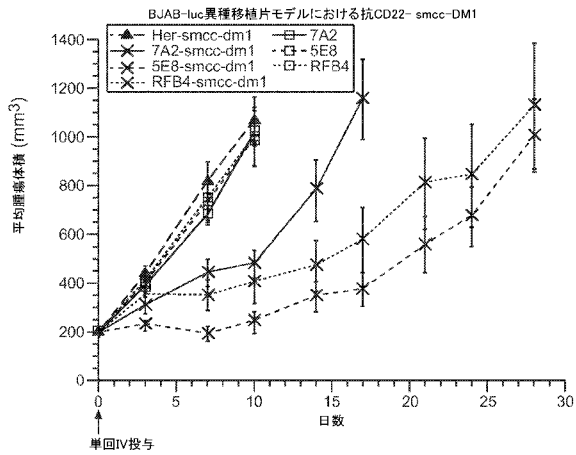
【 図 7 C 】



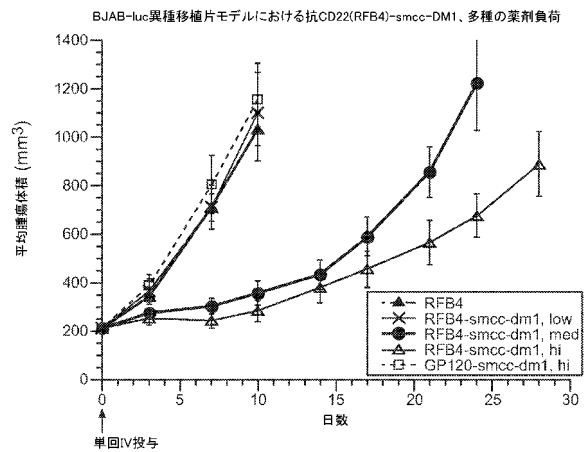
【 図 8 A 】



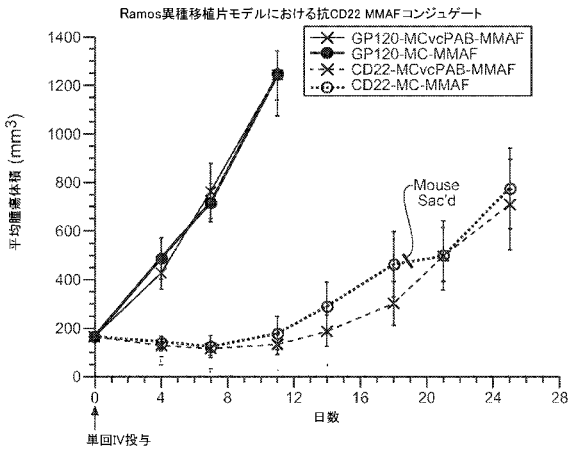
【 図 8 B 】



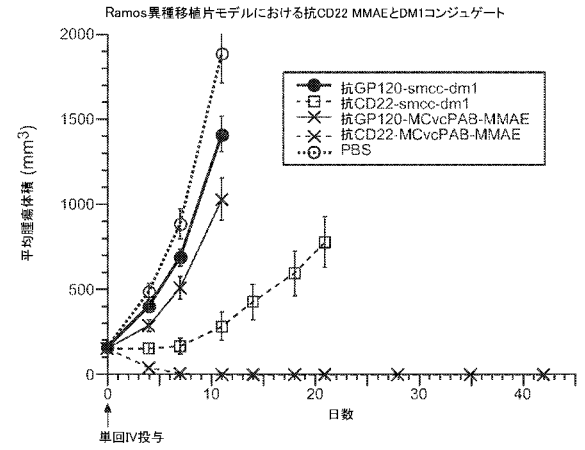
【 図 9 】



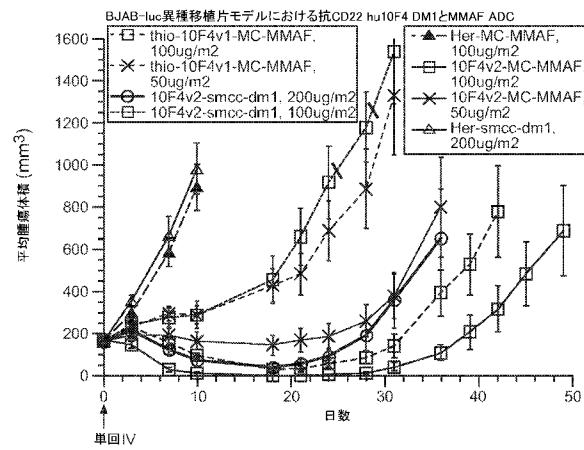
【 図 1 0 】



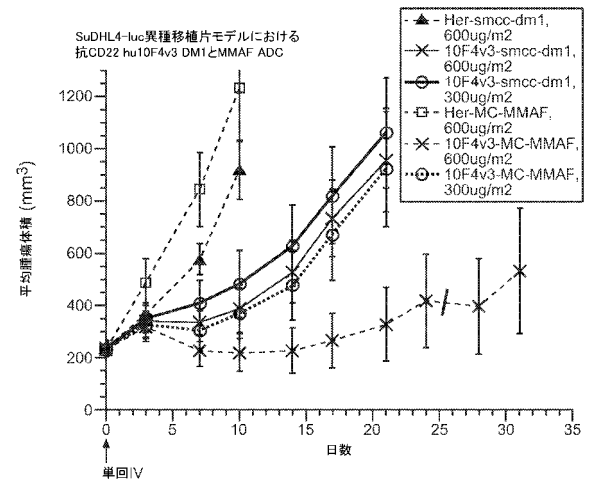
【 図 1 1 】



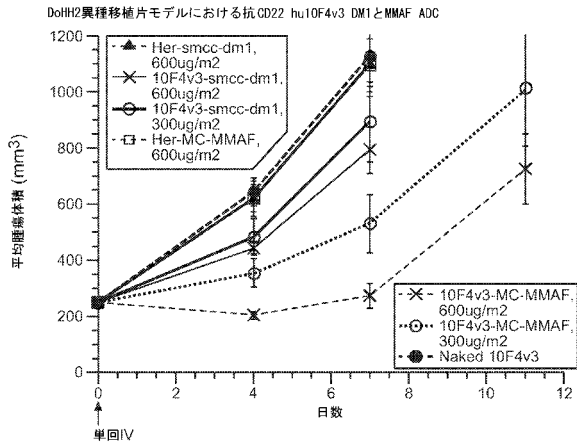
【 図 1 2 】



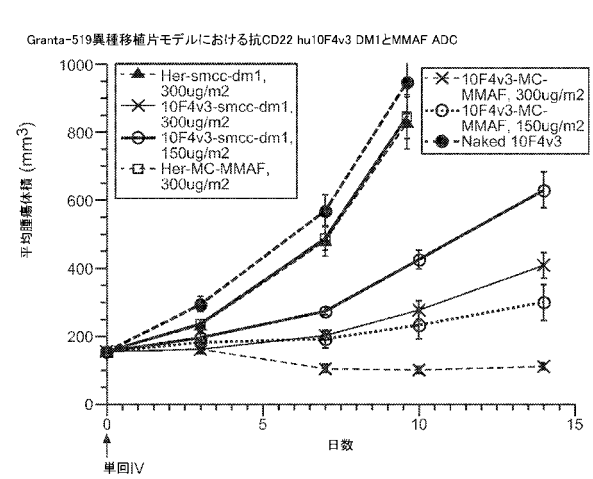
【 図 1 3 A 】



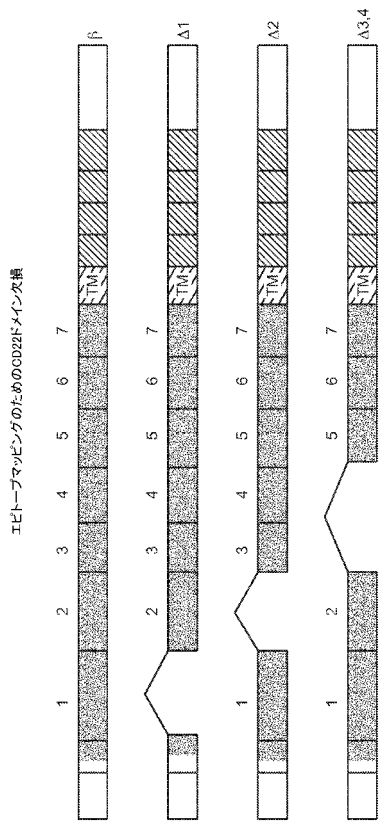
【 図 1 3 B 】



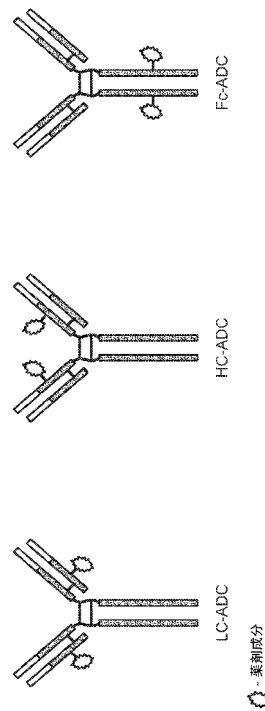
【 図 1 3 C 】



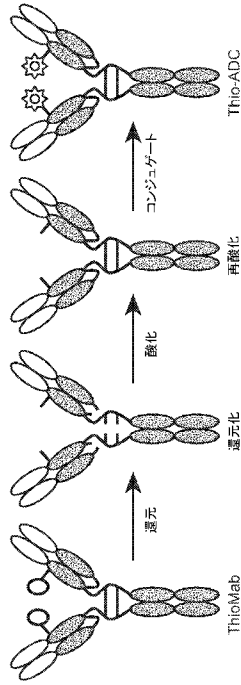
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【図16】



【図17A】

抗CD22 V205C h10F4v3システイン改変軽鎖

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRSSQSIVHSVGNTPLEWYQKFGKAFKLLI
 YKVNRFSGVPSFSGSGSGTDFTLTITSSLPQEDFATYYCFQGSQFPYTFGGG
 TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVIVCLNNFYPREAKVONKVDNAL
 QSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSECTK
 SFNRGEC (配列番号:91)

【図17B】

抗CD22 A118C h10F4v3システイン改変重鎖

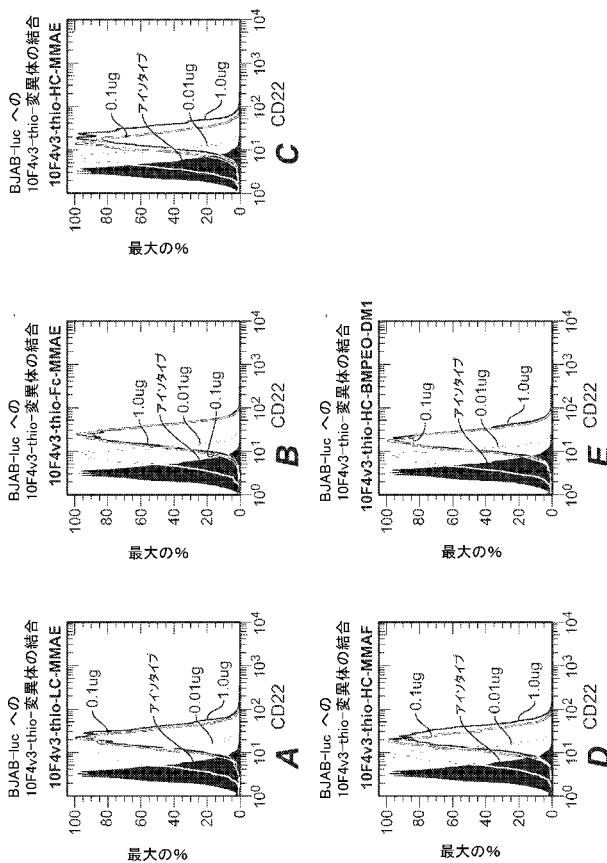
EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGVYFSPSWMMWVRQAPGKLEWVGRRIYP
 GDGDFNYSGKFRFTTISADTSKNTAVLQMNLSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
 FDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPPTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKEPKSCDKTHTCTCPAPELLEGPSVLEFPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLV
 GKVEYKCRVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:92)

【図17C】

抗CD22 S400C h10F4v3システイン改変Fc領域

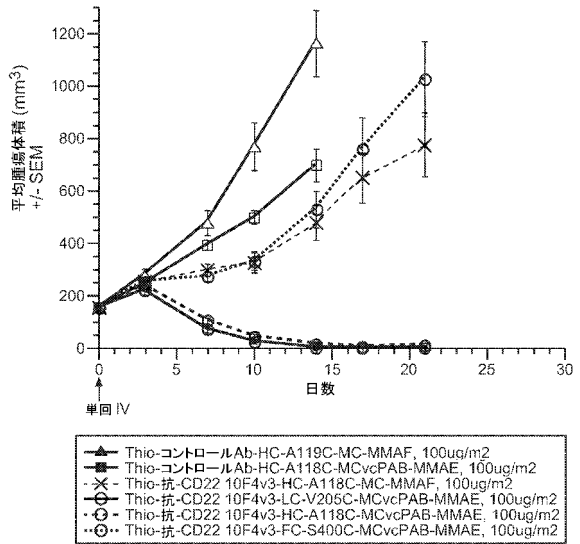
EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGVYFSPSWMMWVRQAPGKLEWVGRRIYP
 GDGDFNYSGKFRFTTISADTSKNTAVLQMNLSLRAEDTAVYYCARDGSSWDWY
 FDVWGQGLVTVSSASTKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPPTV
 SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNT
 KVDKKEPKSCDKTHTCTCPAPELLEGPSVLEFPKPKDTLMISRTPEVTCV
 VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDNLV
 GKVEYKCRVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPRPQVYTLPPSREEMTKNOVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号:93)

【図18】



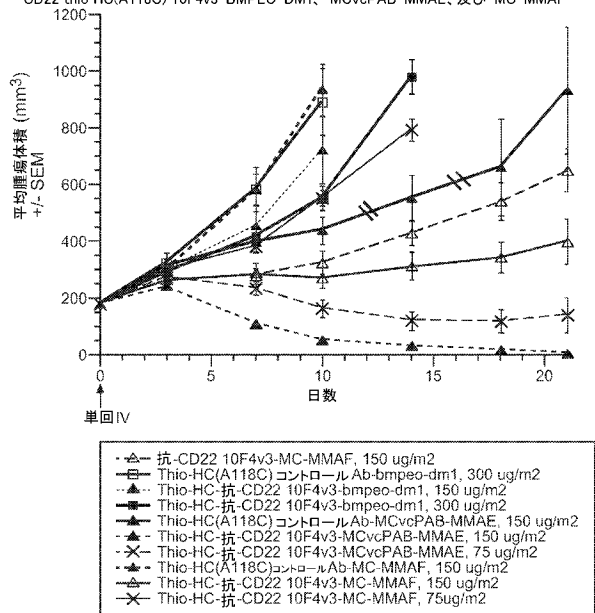
【図19】

SCIDマウスにおけるGranta-519異種移植片へ投与した抗CD22 TDCの効果



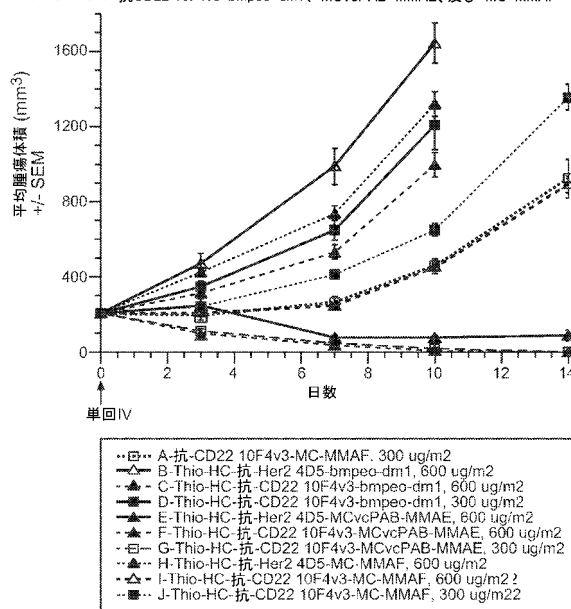
【 図 2 0 A 】

CB17 SCIDマウスにおけるヒト mantle 細胞リンパ腫 Granta-519 異種移植片に対する抗 CD22 Thio HC(A118C) 10F4v3-BMPEO-DM1、-MCvcPAB-MMAE、及び-MC-MMAF



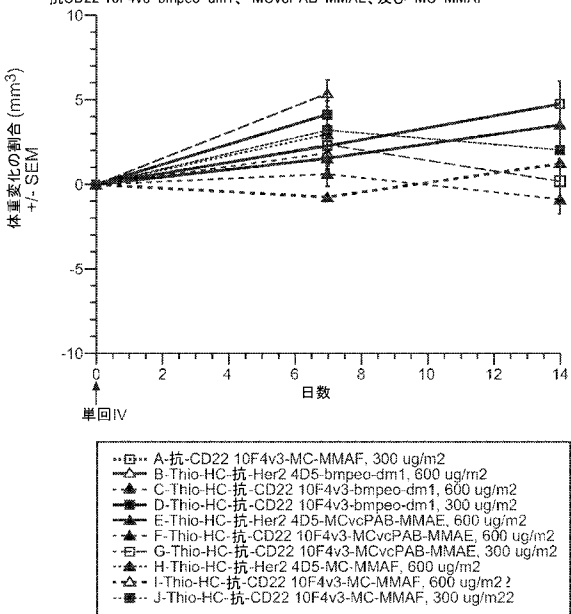
【 図 2 0 B 】

CB17 SCIDマウスにおける濾胞性リンパ腫DOHH2 異種移植片に対する Thio-HC-A121C-抗CD22 10F4v3-bmpeo-dm1、-MCvcPAB-MMAE、及び-MC-MMAF

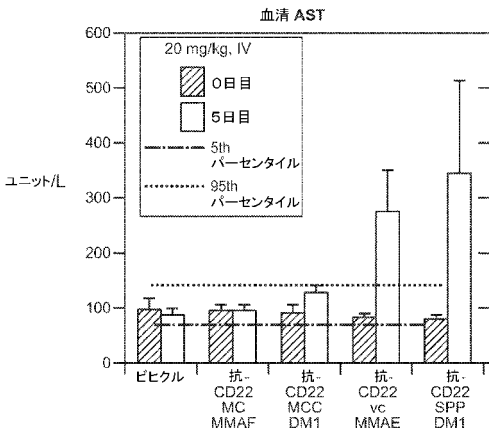


【 図 2 0 C 】

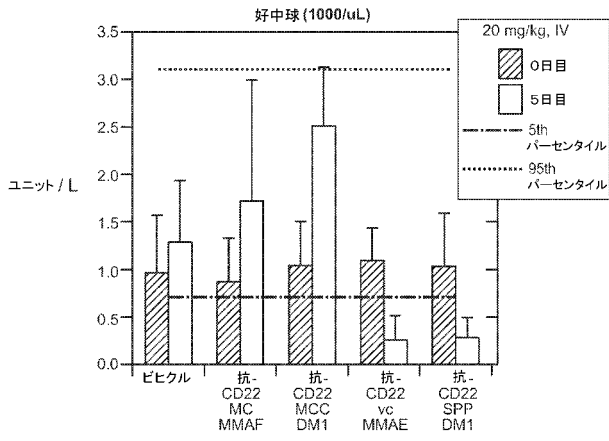
CB17 SCIDマウスにおける濾胞性リンパ腫DOHH2 異種移植片に対するThio-HC-A121C-抗CD22 10F4v3-bmpeo-dm1、-MCvcPAB-MMAE、及び-MC-MMAF



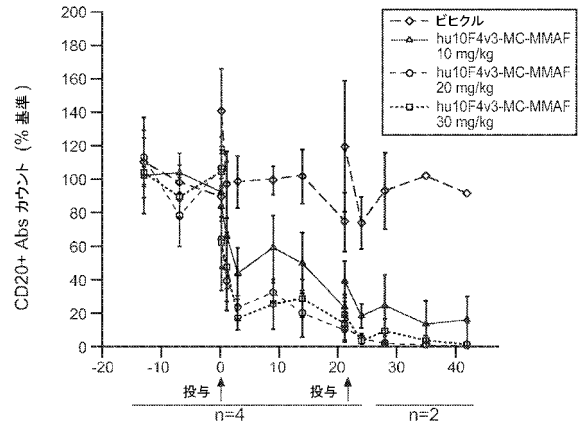
【 図 2 1 A 】



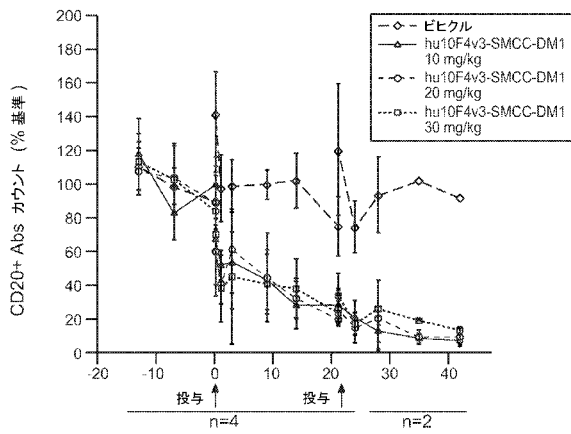
【 図 2 1 B 】



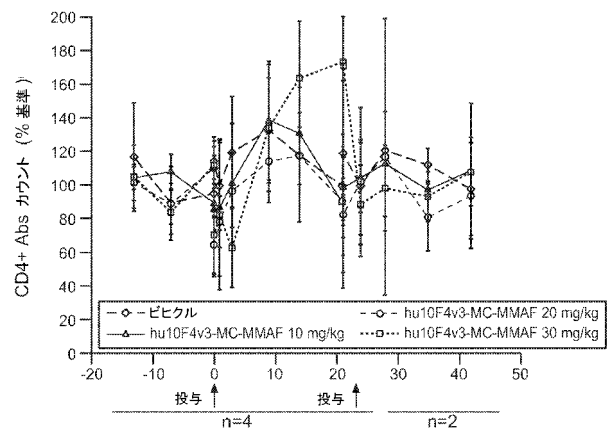
【 図 2 2 A 】



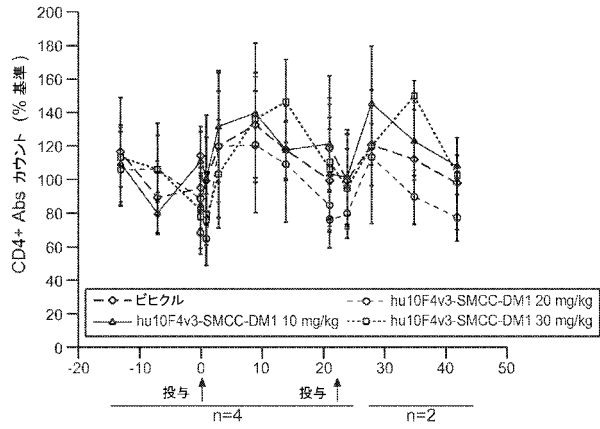
【 図 2 2 B 】



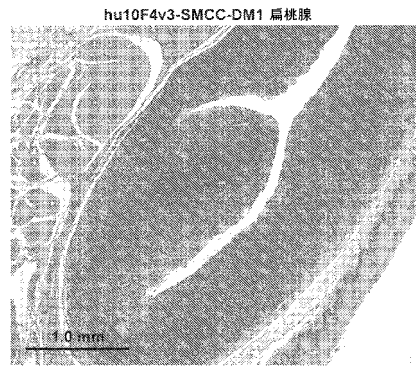
【 図 2 3 A 】



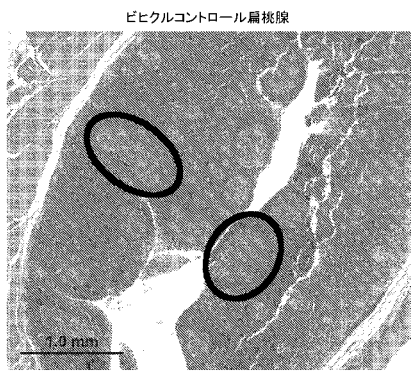
【 図 2 3 B 】



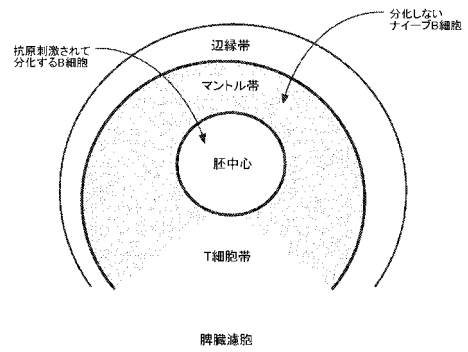
【 図 2 4 B 】



【 図 2 4 A 】



【 図 2 5 A 】



【 図 2 5 B 】

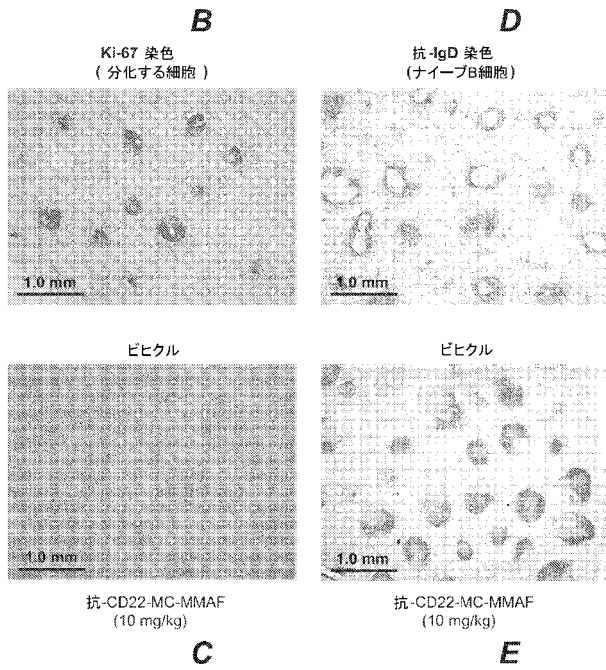


FIG. 25B

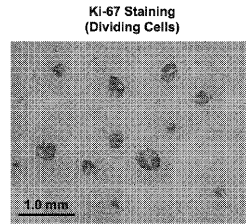
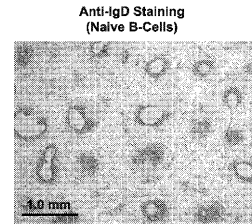
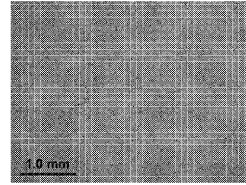


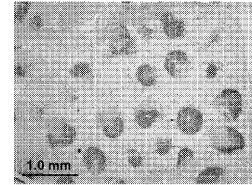
FIG. 25D



Vehicle



Vehicle



Anti-CD22-MC-MMAF (10 mg/kg)

FIG. 25C

Anti-CD22-MC-MMAF (10 mg/kg)

FIG. 25E

【配列表】

2009538629000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成21年2月3日(2009.2.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0012

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0012】

本発明は抗CD22抗体およびその使用方法を提供する。

一態様では、CD22に結合する抗体であって、

- (1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (3) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (4) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (5) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、
- (6) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つのHVRを含んでなる抗体が提供される。

他の態様では、CD22に結合する抗体は、(a) 配列番号：10のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(b)

- (1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (3) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (4) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、
- (5) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのHVRとを含んでなる。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0013】

他の態様では、CD22に結合する抗体は、(a) 配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-L1と、(b)

- (1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (3) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3、
- (4) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、
- (5) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのHVRとを含んでなる。

他の態様では、CD22に結合する抗体は、(a) 配列番号：6のアミノ酸配列を含むHVR-H3と、(b)

- (1) 配列番号：2のアミノ酸配列を含むHVR-H1、
- (2) 配列番号：4のアミノ酸配列を含むHVR-H2、
- (3) 配列番号：9のアミノ酸配列を含むHVR-L1、
- (4) 配列番号：12のアミノ酸配列を含むHVR-L2、及び、
- (5) 配列番号：14のアミノ酸配列を含むHVR-L3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つのHVRとを含んでなる。

他の態様では、C D 2 2 に結合する抗体は、(a) 配列番号：6 のアミノ酸配列を含む H V R - H 3 と、(b)

- (1) 配列番号：2 のアミノ酸配列を含む H V R - H 1、
- (2) 配列番号：4 のアミノ酸配列を含む H V R - H 2、
- (3) 配列番号：10 のアミノ酸配列を含む H V R - L 1、
- (4) 配列番号：12 のアミノ酸配列を含む H V R - L 2、及び、
- (5) 配列番号：14 のアミノ酸配列を含む H V R - L 3

から選択される少なくとも1つ、2つ、3つ、4つ又は5つの H V R とを含んでなる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】請求項59

【補正方法】変更

【補正の内容】

【請求項59】

B細胞増殖性疾患が、リンパ腫、非ホジキンリンパ腫(NHL)、中悪性度NHL、再発性中悪性度NHL、再発性低悪性度NHL、抵抗性NHL、抵抗性低悪性度NHL、慢性リンパ球性白血病(CLL)、小リンパ球性リンパ腫、白血病、線毛細胞白血病(HCL)、急性リンパ球性白血病(ALL)およびマントル細胞リンパ腫から選択される、請求項57に記載の抗体。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		International application No PCT/US2007/069889
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A61K47/48 C07K16/28		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, CHEM ABS Data, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/042240 A (WYETH CORP [US]; IYER ANAND [US]; DUNUSSI-JOANNOPOULOS KYRIAKI [US]) 20 April 2006 (2006-04-20) Seq. 28 is 92.24% identical to Seq. 87 of application	1-238
X	WO 03/072736 A (UNIV DUKE [US]; TEDDER THOMAS F [US]) 4 September 2003 (2003-09-04) Seq. 29 is anti-CD22 light chain and comprises Seq. 12 of application the whole document	1-238
----- -/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 26 November 2007		Date of mailing of the international search report 12/12/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sommerfeld, Teresa

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/069889

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 03/093320 A (CELLTECH R & D LTD. [GB]; POPPLEWELL ANDREW GEORGE [GB]; TICKLE SIMON P) 13 November 2003 (2003-11-13) Seq. 28 is 92.24% identical to Seq. 87 of application the whole document	1-238
A	WO 2005/113003 A (GENENTECH INC [US]; CHAN ANDREW C [US]; GONG QIAN [US]; MARTIN FLAVIUS) 1 December 2005 (2005-12-01) Seq.32 is 95.35% identical to Seq. 88 of application	
A	LEONARD JOHN P ET AL: "Epratuzumab, a humanized anti-CD22 antibody, in aggressive non-Hodgkin's lymphoma: phase I/II clinical trial results." CLINICAL CANCER RESEARCH : AN OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH 15 AUG 2004, vol. 10, no. 16, 15 August 2004 (2004-08-15), pages 5327-5334, XP002459865 ISSN: 1078-0432	
A	DIJOSEPH J F ET AL: "ANTIBODY-TARGETED CHEMOTHERAPY WITH CMC-544: A CD22-TARGETED IMMUNOCONJUGATE OF CALICHEAMICIN FOR THE TREATMENT OF B-LYMPHOID MALIGNANCIES" BLOOD, W.B.SAUNDERS COMPANY, ORLANDO, FL, US, vol. 103, no. 5, March 2004 (2004-03), pages 1807-1814, XP008060153 ISSN: 0006-4971	
A	WO 2005/117986 A (GENENTECH INC [US]; EBENS JR ALLEN J [US]; JACOBSON FREDERIC S [US]; P) 15 December 2005 (2005-12-15)	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/069889**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 142, 143, 145, 146, 148-152, 154, 221, 223-225 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.
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 fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
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/US2007/069889

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006042240 A	20-04-2006	AR 052774 A1	04-04-2007
		AU 2005295041 A1	20-04-2006
		CA 2582919 A1	20-04-2006
		EP 1796735 A2	20-06-2007
WO 03072736 A	04-09-2003	AU 2003215365 A1	09-09-2003
		AU 2003224624 A1	09-09-2003
		CA 2475509 A1	04-09-2003
		CA 2476776 A1	04-09-2003
		CN 1646161 A	27-07-2005
		EP 1476120 A2	17-11-2004
		EP 1485130 A2	15-12-2004
		JP 2005526044 T	02-09-2005
		JP 2005526501 T	08-09-2005
		WO 03072036 A2	04-09-2003
WO 03093320 A	13-11-2003	AU 2003223007 A1	17-11-2003
		CA 2484420 A1	13-11-2003
		CN 1662558 A	31-08-2005
		EP 1504035 A2	09-02-2005
		JP 2006506955 T	02-03-2006
		KR 20050025167 A	11-03-2005
		MX PA04010787 A	07-03-2005
		NZ 536757 A	30-06-2006
		US 2003235869 A1	25-12-2003
		US 2007059307 A1	15-03-2007
ZA 200408851 A	10-11-2005		
WO 2005113003 A	01-12-2005	AU 2005244751 A1	01-12-2005
		BR PI0508762 A	14-08-2007
		CA 2563432 A1	01-12-2005
		EP 1735000 A2	27-12-2006
		KR 20070012408 A	25-01-2007
WO 2005117986 A	15-12-2005	AU 2005249490 A1	15-12-2005
		CA 2567520 A1	15-12-2005
		EP 1753463 A2	21-02-2007
		KR 20070037575 A	05-04-2007

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 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/04 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/04	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	
G 0 1 N 21/78 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
	G 0 1 N 33/53 K	
	G 0 1 N 21/78 C	

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 グレイ, アラン エム.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 0 0 5, プリズベン, ケストレル コート 1 2 2

(72) 発明者 リャン, ウェイ - チン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, シー スプレイ レーン 8 4 0 1 1 2 号室

(72) 発明者 ウー, ヤン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 4 4 0 4, フォスター シティ, ブライス ストリート 1 1 6 0

(72) 発明者 ユ, シャン - ファン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 5 0 3 5, ミルピータス, サンドルウッド レーン 1 1 0 3

F ターム(参考) 2G054 AA07 AA08 AB05 CA22 CA23 CE02 EA03

4B024 AA01 BA43 CA04 CA20 DA02 EA03 GA11

4B064 AG27 CA10 CA19 CC24 DA01

4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25 CA44

4C085 AA13 AA14 BB11 CC05 DD34 DD37 DD51

4H045 AA11 BA10 DA76 EA20 FA74