

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5215180号
(P5215180)

(45) 発行日 平成25年6月19日(2013.6.19)

(24) 登録日 平成25年3月8日(2013.3.8)

(51) Int.Cl.	F 1		
C07K 16/28	(2006.01)	C07K 16/28	Z N A
A61K 39/395	(2006.01)	A61K 39/395	N
A61P 35/00	(2006.01)	A61K 39/395	T
A61P 29/00	(2006.01)	A61P 35/00	
C12N 15/09	(2006.01)	A61P 29/00	1 O 1

請求項の数 34 (全 80 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2008-518360 (P2008-518360)	(73) 特許権者	506199879 メダレックス インコーポレーティッド M E D A R E X, I N C.
(86) (22) 出願日	平成18年6月20日 (2006.6.20)		アメリカ合衆国O 8 5 4 0 ニュージャージ 一州プリンストン、ルート206アンド・ プロビンス・ライン・ロード
(65) 公表番号	特表2008-543339 (P2008-543339A)	(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(43) 公表日	平成20年12月4日 (2008.12.4)	(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(86) 國際出願番号	PCT/US2006/024183	(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(87) 國際公開番号	W02007/002223	(74) 代理人	100127638 弁理士 志賀 美苗
(87) 國際公開日	平成19年1月4日 (2007.1.4)		
審査請求日	平成21年6月3日 (2009.6.3)		
(31) 優先権主張番号	60/692,531		
(32) 優先日	平成17年6月20日 (2005.6.20)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	60/748,956		
(32) 優先日	平成17年12月8日 (2005.12.8)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD19抗体およびその使用法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

(a) SEQ ID NO: 16に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR1； SEQ ID NO: 23に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR2； SEQ ID NO: 30に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR3； SEQ ID NO: 37に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR1； SEQ ID NO: 44に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR2； およびSEQ ID NO: 51に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR3；

(b) SEQ ID NO: 16に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR1； SEQ ID NO: 23に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR2； SEQ ID NO: 30に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR3； SEQ ID NO: 37に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR1； SEQ ID NO: 44に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR2； およびSEQ ID NO: 52に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR3； または

(c) SEQ ID NO: 17に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR1； SEQ ID NO: 24に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR2； SEQ ID NO: 31に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖CDR3； SEQ ID NO: 38に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR1； SEQ ID NO: 45に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR2； およびSEQ ID NO: 53に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖CDR3； を含む；

CD19に特異的に結合する、モノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項2】

10

(a) SEQ ID NO: 1に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域；および
(b) SEQ ID NO: 8に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域、
を含む、

請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項3】

(a) SEQ ID NO: 1に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域；および
(b) SEQ ID NO: 9に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域、
を含む、

請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項4】

(a) SEQ ID NO: 2に示される配列を有するアミノ酸を含む重鎖可変領域；および
(b) SEQ ID NO: 10に示される配列を有するアミノ酸を含む軽鎖可変領域、
を含む、

請求項1に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項5】

Raji B細胞腫瘍細胞およびDaudi B細胞腫瘍細胞に結合する、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項6】

ヒト抗体またはその部分である、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

10

【請求項7】

ヒト化抗体もしくはキメラ抗体またはそれらの部分である、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項8】

CD19がSEQ ID NO: 79に示される配列を有するアミノ酸を含むポリペプチドであるヒトCD19である、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

20

【請求項9】

IgG1アイソタイプまたはIgG4アイソタイプの全長抗体またはその部分である、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

30

【請求項10】

単鎖抗体である、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項11】

非フコシル化された、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項12】

1×10^{-7} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合する、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

40

【請求項13】

5×10^{-8} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合する、請求項1-2に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項14】

5×10^{-9} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合する、請求項1-3に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項15】

65 以上の熱安定温度を有する、請求項1-4のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項16】

請求項1-15のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分および

50

薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 17】

治療剤に連結された請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を含む、免疫複合体。

【請求項 18】

治療剤が細胞毒または放射性同位元素である、請求項 17 に記載の免疫複合体。

【請求項 19】

請求項 17 または 18 に記載の免疫複合体および薬学的に許容される担体を含む、組成物。

【請求項 20】

請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分をコードする、単離された核酸。

【請求項 21】

請求項 20 に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 22】

請求項 21 に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の宿主細胞において抗体またはその抗原結合部分を発現させる段階および宿主細胞から該抗体またはその抗原結合部分を単離する段階を含む、抗CD19モノクローナル抗体またはその抗原結合部分の調製方法。

【請求項 24】

腫瘍細胞の増殖を阻害するのに有効な量の請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分と細胞を接触させる段階を含む、CD19を発現する腫瘍細胞の増殖のインピトロでの阻害方法。

【請求項 25】

被験体においてCD19を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害するための医薬の製造のための、請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分の使用。

【請求項 26】

腫瘍細胞がB細胞悪性腫瘍細胞である、請求項 25 に記載の使用。

【請求項 27】

B細胞悪性腫瘍が非ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、バーキットリンパ腫、未分化型大細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、リンパ球性リンパ腫、濾胞性リンパ腫癌、びまん性大細胞B細胞リンパ腫、カストルマン病またはワルデンストレーム大グロブリン血症である、請求項 26 に記載の使用。

【請求項 28】

B細胞悪性腫瘍がマントル細胞リンパ腫である、請求項 26 に記載の使用。

【請求項 29】

CD19を発現する腫瘍細胞の増殖を阻害するための、請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 30】

被験体においてB細胞を枯渇させるための医薬の製造のための、請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分の使用。

【請求項 31】

被験体においてB細胞を枯渇させるための、請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 32】

被験体において自己免疫疾患を処置するための医薬の製造のための、請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分の使用。

【請求項 33】

自己免疫疾患が関節リウマチである、請求項 32 に記載の使用。

10

20

30

40

50

【請求項 3 4】

被験体において自己免疫疾患を処置するための、請求項 1 - 15 のいずれかに記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0001】****関連出願の相互参照**

本願は、2005年6月20日に出願された米国仮特許出願第60/692,531号；2005年12月8日に出願された米国仮特許出願第60/748,956号；および2006年6月6日に出願された米国仮特許出願第60/804,083号の恩典を主張し；これらは全て、その全体が参照により本明細書に組み入れられる。

10

【0002】**背景**

CD19は、B細胞分化の初期に発現され、B細胞がその最終分化を誘導されるまで発現し続ける95kDaの膜受容体である (Pezzutto et al., (1987) *J Immunol.* 138: 2793; Tedder et al. (1994) *Immunol. Today* 15: 437)。CD19の細胞外ドメインは二つのC2型免疫グロブリン (IG) 様ドメインを含み、これらは小型の潜在的ジスルフィド連結ドメインによって隔てられる。CD19の細胞質ドメインは特有の構造を有するが、ヒト、マウス、およびモルモット間で高度に保存されている (Fujimoto et al., (1998) *Semin Immunol.* 10: 267)。CD19は、Bリンパ球の細胞表面に見られるタンパク質複合体の一部である。このタンパク質複合体は、CD19、CD21 (補体受容体、2型)、CD81 (TAPA-1)、およびCD225 (Leu-13) を含む (Fujimoto、前出)。

20

【0003】

CD19はB細胞における膜通過シグナルの重要な調節因子である。CD19の細胞表面密度の増加または減少は、B細胞の発達および機能に影響を及ぼし、自己免疫疾患または低ガンマグロブリン血症等の疾患を引き起こす (Fujimoto、前出)。CD19複合体は、B細胞膜上に見られる二つの別個のシグナル伝達複合体の架橋を通じて、インビポでの抗原に対するB細胞の反応を強化する。膜上のIgMおよびCD19と関連する二つのシグナル伝達複合体は、異なる機構によってホスホリパーゼC (PLC) を活性化する。CD19とB細胞受容体の架橋は、PLCを活性化するのに必要なIgM分子の数を減らす (Fujimoto、前出；Ghetie、前出)。さらに、CD19は、Arcファミリーキナーゼの増幅に特化したアダプタータンパク質として機能する (Hasegawa et al., (2001) *J Immunol.* 167:3190)。

30

【0004】

CD19の結合は、生じた架橋の量に依存して、B細胞の活性化および増殖を増強も阻害もすることが示された (Tedder、前出)。CD19は90%超のB細胞リンパ腫において発現され、インビトロおよびインビポでのリンパ腫の増殖に影響すると考えられた (Ghetie、前出)。CD19に対して作製された抗体はマウス抗体であった。ヒト被験体の処置にマウス抗体を使用する欠点は、患者に投与した際のヒト抗マウス (HAMA) 反応である。従ってCD19により媒介される疾患を処置および／または予防するのにより効果的なCD19に対する改善された治療用抗体が必要とされる。

40

【発明の開示】**【0005】****概要**

本発明は、CD19に結合し、多くの望ましい特性を示す単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体を提供する。これらの特性には、ヒトCD19に対する高親和性の結合が含まれる。本発明の抗体および組成物を用いて様々なCD19媒介性の疾患を処置する方法もまた提供される。

【0006】

一つの局面において、本発明は、

(a) $1 \times 10^{-7} M$ またはそれ以下の K_D でヒトCD19に結合し；かつ

50

(b) Raji B細胞腫瘍細胞およびDaudi B細胞腫瘍細胞に結合する、
単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分もしくは断片に関する。

【0007】

好ましくは、抗体はヒト抗体であるが、代替の態様においては、抗体はマウス抗体、キメラ抗体またはヒト化抗体であり得る。

【0008】

一つの態様において、抗体は、 5×10^{-8} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合するか、 2×10^{-8} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合するか、 1×10^{-8} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合するか、 5×10^{-9} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合するか、 4×10^{-9} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合するか、 3×10^{-9} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合するか、または 2×10^{-9} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合する。

10

【0009】

別の態様において、本発明は、CD19に対する結合について基準抗体と交差競合し、(a) 1×10^{-7} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合し；かつ(b) Raji B細胞腫瘍細胞およびDaudi B細胞腫瘍細胞に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。様々な態様において、基準抗体は、(a) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか；

または基準抗体は(a) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか；

20

または基準抗体は(a) SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか；

または基準抗体は(a) SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか；

または基準抗体は(a) SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか；

または基準抗体は(a) SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか；

または基準抗体は(a) SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むか；

30

または基準抗体は(a) SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0010】

もう一つの局面において、本発明は、CD19に特異的に結合する、ヒトV_H 5-51遺伝子の産物であるまたはそれに由来する重鎖可変領域を含む、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分もしくは断片に関する。本発明はまた、CD19に特異的に結合する、ヒトV_H 1-69遺伝子の産物であるまたはそれに由来する重鎖可変領域を含む、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分もしくは断片を提供する。本発明はなおさらに、CD19に特異的に結合する、ヒトV_K L18遺伝子の産物であるまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含む、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分もしくは断片を提供する。本発明はなおさらに、CD19に特異的に結合する、ヒトV_K A27遺伝子の産物であるまたはそれに由来する軽鎖可変領域を含む、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。本発明はなおさらに、ヒトV_K L15遺伝子の産物であるかまたはこれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD19に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分もしくは断片を提供する。

40

【0011】

好ましい態様において、本発明は、(a) ヒトV_H 5-51または1-69遺伝子の重鎖可変領域；および(b) ヒトV_K L18、A27またはV_K L15の軽鎖可変領域を含み；CD19に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分もしくは断片を提供する。

【0012】

50

別の局面において、本発明は、CDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域；ならびにCDR1配列、CDR2配列、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含み、(a)重鎖可変領域CDR3配列がSEQ ID NO: 30、31、32、33、34、35および36のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的改変を含み；(b)軽鎖可変領域CDR3配列がSEQ ID NO: 51、52、53、54、55、56、57および58のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的改変を含み；(c) 1×10^{-7} Mまたはそれ以下のK_DでヒトCD19に結合し；かつ(d) Raji B細胞腫瘍細胞およびDaudi B細胞腫瘍細胞に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0013】

好ましくは、重鎖可変領域CDR2配列はSEQ ID NO: 23、24、25、26、27、28および29のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的改変を含み；かつ軽鎖可変領域CDR2配列はSEQ ID NO: 44、45、46、47、48、49および50のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的改変を含む。好ましくは、重鎖可変領域CDR1配列はSEQ ID NO: 16、17、18、19、20、21および22のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的改変を含み；かつ軽鎖可変領域CDR1配列はSEQ ID NO: 37、38、39、40、41、42および43のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的改変を含む。

【0014】

好ましい組み合わせは：

- (a) SEQ ID NO: 16を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) SEQ ID NO: 23を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) SEQ ID NO: 30を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) SEQ ID NO: 37を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) SEQ ID NO: 44を含む軽鎖可変領域CDR2；および
- (f) SEQ ID NO: 51を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

【0015】

別の好ましい組み合わせは：

- (a) SEQ ID NO: 16を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) SEQ ID NO: 23を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) SEQ ID NO: 30を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) SEQ ID NO: 37を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) SEQ ID NO: 44を含む軽鎖可変領域CDR2；および
- (f) SEQ ID NO: 52を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

【0016】

別の好ましい組み合わせは：

- (a) SEQ ID NO: 17を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) SEQ ID NO: 24を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) SEQ ID NO: 31を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) SEQ ID NO: 38を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) SEQ ID NO: 45を含む軽鎖可変領域CDR2；および
- (f) SEQ ID NO: 53を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

【0017】

別の好ましい組み合わせは：

- (a) SEQ ID NO: 18を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) SEQ ID NO: 25を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) SEQ ID NO: 32を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) SEQ ID NO: 39を含む軽鎖可変領域CDR1；

(e) SEQ ID NO: 46を含む軽鎖可変領域CDR2；および
 (f) SEQ ID NO: 54を含む軽鎖可変領域CDR3；
 を含む。

【0018】

別の好ましい組み合わせは：

(a) SEQ ID NO: 19を含む重鎖可変領域CDR1；
 (b) SEQ ID NO: 26を含む重鎖可変領域CDR2；
 (c) SEQ ID NO: 33を含む重鎖可変領域CDR3；
 (d) SEQ ID NO: 40を含む軽鎖可変領域CDR1；
 (e) SEQ ID NO: 47を含む軽鎖可変領域CDR2；および
 (f) SEQ ID NO: 55を含む軽鎖可変領域CDR3；
 を含む。

10

【0019】

別の好ましい組み合わせは：

(a) SEQ ID NO: 20を含む重鎖可変領域CDR1；
 (b) SEQ ID NO: 27を含む重鎖可変領域CDR2；
 (c) SEQ ID NO: 34を含む重鎖可変領域CDR3；
 (d) SEQ ID NO: 41を含む軽鎖可変領域CDR1；
 (e) SEQ ID NO: 48を含む軽鎖可変領域CDR2；および
 (f) SEQ ID NO: 56を含む軽鎖可変領域CDR3；
 を含む。

20

【0020】

別の好ましい組み合わせは：

(a) SEQ ID NO: 21を含む重鎖可変領域CDR1；
 (b) SEQ ID NO: 28を含む重鎖可変領域CDR2；
 (c) SEQ ID NO: 35を含む重鎖可変領域CDR3；
 (d) SEQ ID NO: 42を含む軽鎖可変領域CDR1；
 (e) SEQ ID NO: 49を含む軽鎖可変領域CDR2；および
 (f) SEQ ID NO: 57を含む軽鎖可変領域CDR3；
 を含む。

30

【0021】

別の好ましい組み合わせは：

(a) SEQ ID NO: 22を含む重鎖可変領域CDR1；
 (b) SEQ ID NO: 29を含む重鎖可変領域CDR2；
 (c) SEQ ID NO: 36を含む重鎖可変領域CDR3；
 (d) SEQ ID NO: 43を含む軽鎖可変領域CDR1；
 (e) SEQ ID NO: 50を含む軽鎖可変領域CDR2；および
 (f) SEQ ID NO: 58を含む軽鎖可変領域CDR3；
 を含む。

40

【0022】

本発明のその他の好ましい抗体またはその抗原結合部分は：

(a) SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6および7からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および
 (b) SEQ ID NO: 8、9、10、11、12、13、14および15からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
 を含み；該抗体はCD19に特異的に結合する。

【0023】

好ましい組み合わせは：(a) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0024】

50

別の好ましい組み合わせは：(a) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0025】

別の好ましい組み合わせは：(a) SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0026】

別の好ましい組み合わせは：(a) SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0027】

別の好ましい組み合わせは：(a) SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0028】

別の好ましい組み合わせは：(a) SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0029】

別の好ましい組み合わせは：(a) SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0030】

もう一つの好ましい組み合わせは以下を含む：(a) SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

【0031】

本発明のもう一つの局面において、上記の抗体のいずれかとCD19に対する結合を競合する抗体またはその抗体結合部分もしくはその断片が提供される。

【0032】

本発明の抗体は、例えば完全長の抗体、例えばIgG1またはIgG4アイソタイプとなりうる。または、抗体は、Fab、Fab'もしくはFab'2抗体のような抗体断片、または一本鎖抗体となりうる。

【0033】

本発明はまた、サイトトキシンまたは放射性同位元素のような治療物質に結合した本発明の抗体またはその抗原結合部分もしくはその断片を含む免疫複合体を提供する。本発明はまた、抗体またはその抗原結合部分もしくはその断片とは異なる結合特異性を有する第二の機能的部分に結合した本発明の抗体または抗原結合部分を含む二重特異的分子を提供する。

【0034】

本発明の抗体、抗原結合部分もしくはその断片、免疫複合体、または二重特異的分子および薬学的に許容される担体を含む組成物も同様に提供される。

【0035】

本発明の抗体またはその抗原結合部分もしくはその断片をコードする核酸分子も同様に、そのような核酸を含む発現ベクターおよびそのような発現ベクターを含む宿主細胞と共に本発明に含まれる。

【0036】

本発明の他の特徴および長所は、制限的に解釈してはならない以下の詳細な説明および実施例から明らかであると思われる。本出願を通して引用した全ての参考文献、Genbank登録、特許および公表された特許出願の内容物は、特に参照により本明細書に組み入れられる。

【0037】

詳細な説明

本開示は、高い親和性でCD19に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体に関する。特定の態様において、本発明の抗体は、特定の重鎖および軽鎖生殖系列配列に由来する、および/または特定のアミノ酸配列を含むCDR領域の

10

20

30

40

50

ような特定の構造特徴を含む。本発明は、単離された抗体、そのような抗体を作製する方法、免疫複合体、およびそのような抗体を含む二重特異的分子、ならびに本発明の抗体、免疫複合体、または二重特異的分子を含む薬学的組成物を提供する。本発明はまた、CD19を検出すると共に、CD19を発現するB細胞悪性疾患のようなCD19の発現に関連した疾患を処置するためのような、抗体を用いる方法に関する。したがって、本発明は、B細胞悪性疾患を処置するために、例えば非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞性B細胞リンパ腫、および多発性骨髄腫の処置において、本発明の抗CD19抗体を用いる方法を提供する。

【0038】

本発明がより容易に理解されるように、特定の用語を最初に定義する。さらなる定義は
10 詳細な記述を通して示される。

【0039】

「CD19」という用語は、例えばヒトCD19の変種、イソ型、および種相同体を指す。したがって、本開示のヒト抗体は、特定の場合において、ヒト以外の種からのCD19と交叉反応してもよい。特定の態様において、抗体は、1つまたは複数のヒトCD19タンパク質に対して完全に特異的であってもよく、種または他のタイプの非ヒト交叉反応性を示さなくてもよい。例示的なヒトCD19の完全なアミノ酸配列は、Genbankアクセスション番号NM_001770 (SEQ ID NO: 79) を有する。

【0040】

「免疫応答」という用語は、例えば、リンパ球、抗原提示細胞、貪食細胞、顆粒球、および上記の細胞または肝臓によって產生された可溶性高分子（抗体、サイトカイン、および補体を含む）の作用を指し、それによって侵入した病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、癌様細胞、または自己免疫もしくは病的な炎症の場合、正常なヒト細胞もしくは組織の選択的な損傷、破壊、またはヒト体内からの消失が起こる作用を指す。
20

【0041】

「シグナル伝達経路」とは、細胞の一つの部分から細胞のもう一つの部分へのシグナルの伝達において役割を果たす様々なシグナル伝達分子間の生化学的関連を指す。本明細書において用いられるように、「細胞表面受容体」という句には、例えばシグナルを受けることができる、および細胞の細胞質膜を超えてそのようなシグナルを伝達することができる分子および分子の複合体が含まれる。本発明の「細胞表面受容体」の例は、CD19受容体である。
30

【0042】

本明細書において参照される「抗体」という用語には、抗体全体および任意の抗原結合断片（すなわち、「抗原結合部分」）、またはその一本鎖が含まれる。「抗体」は、ジスルフィド結合によって互いに結合した少なくとも二つの重鎖（H）および二つの軽鎖（L）を含む糖タンパク質、またはその抗原結合部分を指す。それぞれの重鎖は、重鎖可変領域（本明細書において V_H と省略される）および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は三つのドメイン C_H1 、 C_H2 、および C_H3 を含む。それぞれの軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書において V_L と省略される）および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は一つのドメイン C_L を含む。 V_H および V_L 領域はさらに、より保存されたフレームワーク領域（FR）と呼ばれる領域が散在する相補性決定領域（CDR）と呼ばれる高度可変領域に関してさらに細分化される。それぞれの V_H および V_L は、三つのCDRおよび四つのFRを含み。これらはアミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順に整列する。FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、多様な免疫系の細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体系の第一の成分（C1q）を含む、宿主組織または因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介する可能性がある。
40

【0043】

本明細書において用いられるように、抗体の「抗原結合部分」（または単純に「抗体部分」）は、抗原（例えば、CD19）に対する特異的結合能を保持している抗体の一つまたは
50

複数の断片を指す。抗体の抗原結合機能は、完全長の抗体の断片によって行われることができることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合断片の例には、(i) Fab断片、 V_L 、 V_H 、 C_L 、および C_{H1} ドメインからなる一価の断片；(ii) $F(ab')$ ₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって結合した二つのFab断片を含む二価の断片；(iii) ヒンジ領域の一部を有する本質的にFabであるFab'断片(FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY, Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993参照のこと)；(iv) V_H および C_{H1} ドメインからなるFd断片；(v) 抗体の一つのアームの V_L および V_H ドメインからなるFv断片、(vi) V_H ドメインからなるdAb断片(Wardら(1989)Nature 341:544～546)；(vii) 単離された相補性決定領域(CDR)；および(viii) ナノボディ、つまり单一の可変ドメインおよび2つの定常領域を含む重鎖可変領域が含まれる。さらに、Fv断片の二つのドメイン、 V_L および V_H は、異なる遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え法を用いて、 V_L および V_H 領域が対を形成して一価の分子を形成する一つのタンパク質の鎖としてそれらを作製することができるようとする合成リンカーによって結合させることができる(一本鎖Fv(scFv)として知られる；例えばBirdら(1988)Science 242:423～426；およびHustonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879～5883を参照されたい)。そのような一本鎖抗体はまた、抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれると意図される。これらの抗体断片は、当業者に公知の通常の技術を用いて得られ、断片は無傷の抗体と同じように有用性に関してスクリーニングされる。10

【0044】

本明細書において用いられるように「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すと意図される(例えば、CD19に特異的に結合する単離抗体は、CD19以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかし、CD19に特異的に結合する単離抗体は、他の種からのCD19分子のような他の抗原に対して交叉反応性を有する。その上、単離抗体は、他の細胞材料および/または化学物質を実質的に含まない可能性がある。20

【0045】

本明細書において用いられるように「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、单一の分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対して单一の結合特異性および親和性を示す。30

【0046】

本明細書において用いられるように「ヒト抗体」という用語には、フレームワーク領域およびCDR領域の双方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体が含まれると意図される。さらに、抗体が定常領域を含む場合、定常領域も同様に、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。本発明のヒト抗体には、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基(例えば、インビトロでランダムもしくは部位特異的変異誘発によって、またはインビボで体細胞変異導入された変異)が含まれてもよい。しかし、本明細書において記述される「ヒト抗体」という用語には、マウスのようなもう一つの哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植されている抗体は含まれないと意図される。40

【0047】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、フレームワークとCDR領域の双方がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する单一の結合特異性を示す抗体を指す。一つの態様において、ヒトモノクローナル抗体は、トランスジェニック非ヒト動物、例えばヒト重鎖トランスジーンと軽鎖トランスジーンとを含むゲノムを有するトランスジェニックマウスから得たB細胞を、不死化細胞に融合させて含むハイブリドーマによって產生される。50

【0048】

本明細書において用いられるように、「組換え型ヒト抗体」という用語には、(a)ヒト免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニックであるまたは導入染色体性(transchromosomal)である動物(例えば、マウス)、もしくはそれらから調製されたハイブリド

ーマ（下記においてさらに記述する）から単離された抗体、(b)ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えばトランスフェクトーマ(transfectoroma)から単離された抗体、(c)組換え型複合ヒト抗体ライブラリから単離された抗体、および(d)ヒト免疫グロブリン遺伝子配列を他のDNA配列にスプライシングすることを含む任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体のような、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離される全てのヒト抗体が含まれる。そのような組換え型ヒト抗体は、フレームワークおよびCDR領域がヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する。しかし、特定の態様において、そのような組換え型ヒト抗体に、インビトロ変異誘発（または、ヒトIg配列に関してトランスジェニックである動物を用いる場合には、インビボ細胞変異誘発）を供することができ、このように、組換え型抗体のV_HおよびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_HおよびV_L配列に由来して関連するが、インビボでヒト抗体生殖系列範囲内には天然で存在しない可能性がある配列となる。

【0049】

本明細書において用いられるように、「アイソタイプ」は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgMまたはIgG1）を指す。

【0050】

「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」という句は、本明細書において、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に用いられる。

【0051】

「ヒト抗体誘導体」という用語は、ヒト抗体の任意の改変型、例えば抗体ともう一つの物質または抗体との結合体を指す。

【0052】

「ヒト化抗体」という用語は、マウスのようなもう一つの哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を指すと意図される。ヒトフレームワーク配列内で、さらなるフレームワーク領域の改変を行ってもよい。

【0053】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体のような、可変領域配列が一つの種に由来し、定常領域配列がもう一つの種に由来する抗体を指すと意図される。

【0054】

本明細書において用いられるように、「ヒトCD19に特異的に結合する」抗体は、ヒトCD19に対してK_D 1 × 10⁻⁷ Mまたはそれ以下、より好ましくはK_D 5 × 10⁻⁸ Mまたはそれ以下、より好ましくはK_D 3 × 10⁻⁸ Mまたはそれ以下、より好ましくはK_D 1 × 10⁻⁸ Mまたはそれ未満、さらにより好ましくはK_D 5 × 10⁻⁹ Mまたはそれ以下で結合する抗体を指すと意図される。

【0055】

本明細書において用いられるように、「K_{assoc}」または「K_a」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度を指し、本明細書において用いられる「K_{dis}」または「K_d」は特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を指すと意図される。本明細書において用いられるように、「K_D」という用語は、K_aに対するK_dの比（すなわちK_d/K_a）から得られた解離定数を指すと意図され、モル濃度（M）として表記される。抗体のK_D値は、当技術分野で十分に確立された方法を用いて決定することができる。抗体のK_Dを決定するための好ましい方法は、好ましくはBiacore（登録商標）システムのようなバイオセンサーシステムを用いて表面プラズモン共鳴を用いることによる。

【0056】

本明細書において用いられるように、IgG抗体の「高親和性」という用語は、標的抗原に対してK_D 1 × 10⁻⁷ Mまたはそれ以下、より好ましくは5 × 10⁻⁸ Mまたはそれ以下、さらにより好ましくは1 × 10⁻⁹ Mまたはそれ以下、さらにより好ましくは10⁻⁹ Mまたはそれ以下を有する抗体を指す。しかし、「高親和性」結合は、他の抗体アイソタイプに関して変化しうる。例えば、IgMアイソタイプに関する「高親和性」結合は、K_Dが10⁻⁶ Mまたはそれ

10

20

30

40

50

以下、より好ましくは 10^{-7} Mまたはそれ以下、さらにより好ましくは 10^{-8} Mまたはそれ以下を有する抗体を指す。

【0057】

本明細書において用いられるように、「被験者」という用語には、任意のヒトまたは非ヒト動物が含まれる。「非ヒト動物」という用語には、全ての脊椎動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、は虫類等のような哺乳類および非哺乳類が含まれる。

【0058】

抗CD19抗体

本発明の抗体は、抗体の特定の機能的特色または特性を特徴とする。例えば、抗体は、ヒトCD19に特異的に結合する。好ましくは、本発明の抗体は、CD19に高い親和性で、例えば $K_D 1 \times 10^{-7}$ Mまたはそれ以下で結合する。本発明の抗CD19抗体は好ましくは以下の特徴の一つまたは複数を示す。

(a) $K_D 1 \times 10^{-7}$ Mまたはそれ以下でヒトCD19に結合し；

(b) Raji B細胞腫瘍細胞およびDaudi B細胞腫瘍細胞に結合する。

【0059】

好ましくは、抗体は、ヒトCD19に対して $K_D 5 \times 10^{-8}$ Mもしくはそれ以下で結合する、ヒトCD19に対して $K_D 1 \times 10^{-8}$ Mもしくはそれ以下で結合する、ヒトCD19に対して $K_D 5 \times 10^{-9}$ Mもしくはそれ以下で結合する、ヒトCD19に対して $K_D 4 \times 10^{-9}$ Mもしくはそれ以下で結合する、ヒトCD19に対して $K_D 3 \times 10^{-9}$ Mもしくはそれ以下で結合する、またはヒトCD19に対して $K_D 2 \times 10^{-9}$ Mもしくはそれ以下で結合する、またはヒトCD19に対して $K_D 1 \times 10^{-9}$ Mもしくはそれ以下で結合する。

【0060】

CD19に対する抗体の結合能を評価するための標準的なアッセイ法は、例えば、ELISA、ウェスタンプロット、RIAおよびフローサイトメトリー分析を含み、当技術分野において公知である。適したアッセイ法が実施例において詳細に記述される。抗体の結合速度論（例えば、結合親和性）はまた、スキャッチャードまたはBiacore（登録商標）システム分析のような、当技術分野において公知の標準的なアッセイ法によって評価することができる。Raji B細胞腫瘍細胞またはDaudi B細胞腫瘍細胞の結合を評価するために、Raji (ATC C寄託番号CCL-86) 細胞またはDaudi (ATCC寄託番号CCL-213) 細胞は、公的に利用可能な提供機関、例えばアメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができ、標準的なアッセイ法、例えばフローサイトメトリー分析において使用することができる。

【0061】

モノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8

本発明の好ましい抗体は、実施例16、17、18、19、20、21および22に記載されるように単離および構造の特徴付けを行ったヒトモノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8である。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8の V_H アミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO: 1、1、2、3、4、5、6および7に示す。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8の V_L アミノ酸配列を、それぞれ、SEQ ID NO: 8、9、10、11、12、13、14および15に示す。

【0062】

これらの抗体のそれぞれが、CD19に結合すると仮定して、本発明の他の抗CD19結合分子を作製するために、 V_H および V_L 配列を「混合してマッチさせる」ことができる。そのような「混合してマッチさせた」抗体のCD19結合は、先に記述したおよび実施例において記述した結合アッセイ法（例えば、ELISA）を用いて試験することができる。好ましくは、 V_H および V_L 鎖を混合してマッチした場合、特定の V_H/V_L 対の V_H 配列を構造的に類似の V_H 配列と交換する。同様に、好ましくは特定の V_H/V_L 対形成からの V_L 配列を構造的に類似の V_L 配列と交換する。

【0063】

10

20

30

40

50

したがって、一つの局面において、本発明は、CD19、好ましくはヒトCD19に特異的に結合する、以下を含む、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する：

(a) SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6および7からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；

(b) SEQ ID NO: 8、9、10、11、12、13、14および15からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

好ましい重鎖および軽鎖の組み合わせには：

(a) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

(a) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

(a) SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 10のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

(a) SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 11のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

(a) SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 12のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

(a) SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

(a) SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

(a) SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および(b) SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

が含まれる。

【0064】

別の局面において、本発明は、21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8の重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2およびCDR3を含む抗体またはそれらの組み合わせを提供する。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8のV_H CDR1のアミノ酸配列を、SEQ ID NO: 16、17、18、19、20、21および22に示す。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8のV_H CDR2のアミノ酸配列を、SEQ ID NO: 23、24、25、26、27、28および29に示す。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8のV_H CDR3のアミノ酸配列を、SEQ ID NO: 30、31、32、33、34、35および36に示す。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8のV_K CDR1のアミノ酸配列を、SEQ ID NO: 37、38、39、40、41、42および43に示す。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8のV_K CDR2のアミノ酸配列を、SEQ ID NO: 44、45、46、47、48、49および50に示す。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8のV_K CDR3のアミノ酸配列を、SEQ ID NO: 51、52、53、54、55、56、57および58に示す。CDR領域はKabatシステム (Kabat, E.A. et al. (1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U. S. Department of Health and Human Services NIH Publication No. 91-3242) を用いて図示される。

【0065】

これらの抗体のそれぞれがCD19に結合して、抗原結合特異性が主にCDR1、CDR2、およびCDR3領域によって提供されると仮定すると、本発明の他の抗CD19結合分子を作製するためには、V_H CDR1、CDR2、およびCDR3配列ならびにV_K CDR1、CDR2、およびCDR3配列を「混合してマッチさせる」ことができる（すなわち、異なる抗体からのCDRを混合してマッチさせることができるが、それぞれの抗体はV_H CDR1、CDR2、およびCDR3配列ならびにV_K CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含まなければならない）。そのような「混合してマッチさせた」抗体のCD19結合は、先に記述したおよび実施例において記述される結合アッセイ法（例えば、ELISA、Biacore（登録商標）分析）を用いて試験することができる。好ましくはV_H CDR配列を混合してマッチさせる場合、特定のV_H配列からのCDR1、CDR2、および/またはCD

20

30

40

50

R3配列を、構造的に類似のCDR配列に置換する。同様に、 V_k CDR配列を混合してマッチさせる場合、特定の V_k 配列からのCDR1、CDR2、および／またはCDR3を、好ましくは構造的に類似のCDR配列に置換する。一つまたは複数の V_H および／または V_L CDR領域の配列を、モノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8に関して本明細書において開示されたCDR配列からの構造的に類似の配列に置換することによって、新規 V_H および V_L 配列を作製することができることは当業者に容易に明らかであると思われる。

【0066】

したがって、もう一つの局面において、本発明は、CD19、好ましくはヒトCD19に特異的に結合する、以下を含む、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する：

(a) SEQ ID NO: 16、17、18、19、20、21および22からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR1；

(b) SEQ ID NO: 23、24、25、26、27、28および29からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR2；

(c) SEQ ID NO: 30、31、32、33、34、35および36からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域CDR3；

(d) SEQ ID NO: 37、38、39、40、41、42および43からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR1；

(e) SEQ ID NO: 44、45、46、47、48、49および50からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR2；ならびに

(f) SEQ ID NO: 51、52、53、54、55、56、57および58からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域CDR3。

好ましい態様において、抗体は：

(a) SEQ ID NO: 16を含む重鎖可変領域CDR1；

(b) SEQ ID NO: 23を含む重鎖可変領域CDR2；

(c) SEQ ID NO: 30を含む重鎖可変領域CDR3；

(d) SEQ ID NO: 37を含む軽鎖可変領域CDR1；

(e) SEQ ID NO: 44を含む軽鎖可変領域CDR2；および

(f) SEQ ID NO: 51を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

別の好ましい態様において、抗体は：

(a) SEQ ID NO: 16を含む重鎖可変領域CDR1；

(b) SEQ ID NO: 23を含む重鎖可変領域CDR2；

(c) SEQ ID NO: 30を含む重鎖可変領域CDR3；

(d) SEQ ID NO: 37を含む軽鎖可変領域CDR1；

(e) SEQ ID NO: 44を含む軽鎖可変領域CDR2；および

(f) SEQ ID NO: 52を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

別の好ましい態様において、抗体は：

(a) SEQ ID NO: 17を含む重鎖可変領域CDR1；

(b) SEQ ID NO: 24を含む重鎖可変領域CDR2；

(c) SEQ ID NO: 31を含む重鎖可変領域CDR3；

(d) SEQ ID NO: 38を含む軽鎖可変領域CDR1；

(e) SEQ ID NO: 45を含む軽鎖可変領域CDR2；および

(f) SEQ ID NO: 53を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

別の好ましい態様において、抗体は：

(a) SEQ ID NO: 18を含む重鎖可変領域CDR1；

(b) SEQ ID NO: 25を含む重鎖可変領域CDR2；

(c) SEQ ID NO: 32を含む重鎖可変領域CDR3；

(d) SEQ ID NO: 39を含む軽鎖可変領域CDR1；

10

20

30

40

50

(e) SEQ ID NO: 46を含む軽鎖可変領域CDR2；および
(f) SEQ ID NO: 54を含む軽鎖可変領域CDR3；
を含む。

別の好ましい態様において、抗体は：

- (a) SEQ ID NO: 19を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) SEQ ID NO: 26を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) SEQ ID NO: 33を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) SEQ ID NO: 40を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) SEQ ID NO: 47を含む軽鎖可変領域CDR2；および
(f) SEQ ID NO: 55を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

別の好ましい態様において、抗体は：

- (a) SEQ ID NO: 20を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) SEQ ID NO: 27を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) SEQ ID NO: 34を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) SEQ ID NO: 41を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) SEQ ID NO: 48を含む軽鎖可変領域CDR2；および
(f) SEQ ID NO: 56を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

別の好ましい態様において、抗体は：

- (a) SEQ ID NO: 21を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) SEQ ID NO: 28を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) SEQ ID NO: 35を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) SEQ ID NO: 42を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) SEQ ID NO: 49を含む軽鎖可変領域CDR2；および
(f) SEQ ID NO: 57を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

別の好ましい態様において、抗体は：

- (a) SEQ ID NO: 22を含む重鎖可変領域CDR1；
- (b) SEQ ID NO: 29を含む重鎖可変領域CDR2；
- (c) SEQ ID NO: 36を含む重鎖可変領域CDR3；
- (d) SEQ ID NO: 43を含む軽鎖可変領域CDR1；
- (e) SEQ ID NO: 50を含む軽鎖可変領域CDR2；および
(f) SEQ ID NO: 58を含む軽鎖可変領域CDR3；

を含む。

【 0 0 6 7 】

当技術分野において、CDR3ドメインは、CDR1ドメインおよび／またはCDR2ドメインから独立して、単独で、同族抗原に対する抗体の結合特異性を決定することができること、および予想通り、共通のCDR3配列に基づき同じ結合特異性を有する複数の抗体が生成され得ることが周知である。例えば、Klimka et al., British J. of Cancer 83(2): 252-260 (2000) (マウス抗CD30抗体Ki-4の重鎖可変ドメインCDR3のみを用いるヒト化抗CD30抗体の作製について記述する)；Beiboer et al., J. Mol. Biol. 296: 833-849 (2000) (その親のマウスMOC-31抗上皮糖タンパク質-2(EGP-2)抗体の重鎖CDR3配列のみを用いる組み換えEGP-2抗体を記述する)；Rader et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95: 8910-8915 (1998) (各メンバー抗体がCDR3ドメイン以外は異なる配列を含み、かつその親のマウス抗体と同等またはそれよりも高い親和性でその親マウス抗体と同じエピトープに結合できる、マウス抗インテグリン α_3 抗体LM609の重鎖および軽鎖の可変CDR3ドメインを用いるヒト化抗インテグリン α_3 抗体のパネルを記述する)；Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116: 2161-2162 (1994) (CDR3ドメインがその抗原結合に最も大きな寄与をすることを開示する)；Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92: 2529-2533 (50

10

20

30

40

50

1995) (ヒト胎盤DNAに対する三つのFab (SI-1、SI-40、およびSI-32) の重鎖CDR3配列を抗破傷風トキソイドFabの重鎖に移植することによって、既存の重鎖CDR3を置き換えることを記述し、CDR3ドメインが単独で結合特異性を付与することを実証する) ; ならびにDitzel et al., J. Immunol. 157: 739-749 (1996) (親の多特異性Fab LNA3の重鎖CDR3のみを単特異性IgG破傷風トキソイド結合Fab p313抗体の重鎖に移入することで、その親Fabの結合特異性を十分に維持できたというグラフティング研究を記述する) を参照されたい。これらの参考文献は各々、その全体が参考により本明細書に組み入れられる。

【0068】

従って、本発明は、ヒトまたは非ヒト動物由来の抗体由来の一つまたは複数の重鎖および／または軽鎖のCDR3ドメインを含み、CD19に特異的に結合できるモノクローナル抗体を提供する。特定の局面において、本発明は、非ヒト抗体、例えばマウス抗体またはラット抗体由来の一つまたは複数の重鎖および／または軽鎖のCDR3ドメインを含み、CD19に特異的に結合できるモノクローナル抗体を提供する。いくつかの態様において、非ヒト抗体由来の一つまたは複数の重鎖および／または軽鎖のCDR3ドメインを含むこのようない本発明の抗体は、対応する親の非ヒト抗体と(a)結合に関して競合することができ；(b)機能的特徴を保持し；(c)同じエピトープに結合し；および／または(d)類似の結合親和性を有する。

【0069】

他の局面において、本発明は、CD19に特異的に結合できるヒト抗体、例えば非ヒト動物から得られたヒト抗体由来の一つまたは複数の重鎖および／または軽鎖のCDR3ドメインを含むモノクローナル抗体を提供する。他の局面において、本発明は、CD19に特異的に結合できる第一のヒト抗体、例えば非ヒト動物から得られたヒト抗体由来の一つまたは複数の重鎖および／または軽鎖のCDR3ドメインを含み、CD19に対して特異的に結合できる第一のヒト抗体を生ずるようその第一のヒト抗体由来のCDR3ドメインがCD19に対する結合特異性を欠くヒト抗体のCDR3ドメインと置き換えられた、モノクローナル抗体を提供する。いくつかの態様において、第一のヒト抗体由来の一つまたは複数の重鎖および／または軽鎖のCDR3ドメインを含むこのようない本発明の抗体は、対応する親の第一ヒト抗体と(a)結合に関して競合することができ；(b)機能的特徴を保持し；(c)同じエピトープに結合し；および／または(d)類似の結合親和性を有する。

【0070】

特定の生殖細胞系配列を有する抗体

特定の態様において、本発明の抗体は、特定の生殖細胞系重鎖免疫グロブリン遺伝子由来の重鎖可変領域および／または特定の生殖細胞系軽鎖免疫グロブリン遺伝子由来の軽鎖可変領域を含む。

【0071】

例えば、好ましい態様において、本発明は、ヒトV_H5-51遺伝子の産物であるかまたはこれに由来する重鎖可変領域を含み、CD19に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい態様において、本発明は、ヒトV_H1-69遺伝子の産物であるかまたはこれに由来する重鎖可変領域を含み、CD19に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。さらに別の好ましい態様において、本発明は、ヒトV_KL18遺伝子の産物であるかまたはこれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD19に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。さらに別の好ましい態様において、本発明は、ヒトV_KA27遺伝子の産物であるかまたはこれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD19に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。さらに別の好ましい態様において、本発明は、ヒトV_KL15遺伝子の産物であるかまたはこれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD19に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。さらに別の好ましい態様において、本発明は、ヒトV_KL15遺伝子の産物であるかまたはこれに由来する軽鎖可変領域を含み、CD19に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。さらに別の好ましい態様において、本発明は：

(a) ヒトV_H5-51もしくは1-69遺伝子(これらの遺伝子は、それぞれ、SEQ ID NO: 74および75に示すアミノ酸配列をコードする)の産物であるかまたはこれに由来する重鎖可変領

10

20

30

40

50

域を含み；

(b) ヒトV_KL18、V_KA27もしくはV_KL15遺伝子（これらの遺伝子は、それぞれ、SEQ ID NO: 76、77および78に示すアミノ酸配列をコードする）の産物であるかまたはこれに由来する軽鎖可変領域を含み；かつ

(c) CD19、好ましくはヒトCD19に特異的に結合する、

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0072】

V_H5-51およびV_KL18のそれぞれV_HおよびV_Kを有する抗体の例は、21D4、21D4a、27F3、5G7、13F1および46E8である。V_H1-69およびV_KA27のそれぞれV_HおよびV_Kを有する抗体の例は、47G4である。V_H1-69およびV_KL15のそれぞれV_HおよびV_Kを有する抗体の例は、3C10である。

10

【0073】

本明細書において用いられるように、ヒト抗体は、抗体の可変領域がヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子を用いる系から得られる場合、特定の生殖系列配列「の産物である」または「に由来する」重鎖または軽鎖可変領域を含む。そのような系には、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを対象抗原によって免疫する段階、またはファージにおいて示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライプラリを対象抗原によってスクリーニングする段階が含まれる。ヒト生殖系列免疫グロブリン配列「の産物である」または「に由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列をヒト生殖系列免疫グロブリンのアミノ酸配列と比較する段階、およびヒト抗体の配列に対して配列において最も近い（すなわち最大の%同一性）ヒト生殖系列免疫グロブリン配列を選択する段階によって、同定することができる。特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列「の産物である」または「に由来する」ヒト抗体は、例えば天然に存在する体細胞変異または部位特異的変異の意図的な導入のために、生殖系列配列と比較してアミノ酸の差を含んでもよい。しかし、選択されたヒト抗体は典型的に、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも90%同一であり、他の種（例えば、マウス生殖系列配列）の生殖系列免疫グロブリンアミノ酸配列と比較して、ヒト抗体をヒトであると同定するアミノ酸残基を含む。特定の場合において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列に対してアミノ酸配列が少なくとも95%、またはさらに少なくとも96%、97%、98%、もしくは99%同一であってもよい。典型的に、特定のヒト生殖系列配列に由来するヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列からアミノ酸わずか10個の差を示すに過ぎないと考えられる。特定の場合において、ヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列とアミノ酸わずか5個、またはさらに4、3、2、または1個の差を示すに過ぎない可能性がある。

20

【0074】

相同的抗体

さらにもう一つの態様において、本発明の抗体は、本明細書に記述の好ましい抗体のアミノ酸配列と相同であるアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖領域を含み、本発明の抗CD19抗体の所望の機能的特性を保持している。

30

【0075】

例えば、本発明は、以下である、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを含む、単離モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

(a) 重鎖可変領域が、SEQ ID NO: 1、2、3、4、5、6および7からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%相同であるアミノ酸配列を含み；

(b) 軽鎖可変領域が、SEQ ID NO: 8、9、10、11、12、13、14および15からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%相同であるアミノ酸配列を含み；

(c) 抗体がヒトCD19に対して $K_D 1 \times 10^{-7} M$ またはそれ以下で結合し；

(d) Raji B細胞腫瘍細胞およびDaudi B細胞腫瘍細胞抗体に結合する。

様々な態様において、抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である

40

50

場合がある。

【0076】

他の態様において、 V_H および/または V_L アミノ酸配列は、先に記述した配列に対して85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%相同であってもよい。上記の配列の V_H および V_L 領域と高い(すなわち80%またはそれより高い)相同性を有する V_H および V_L 領域を有する抗体は、SEQ ID NO:59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72および73をコードする核酸分子の変異誘発(例えば、部位特異的またはPCRによる変異誘発)の後に、本明細書に記述の機能的アッセイ法を用いて、コードされた変化した抗体の保持された機能(すなわち上記の(c)~(d)に記載の機能)に関して試験を行うことによって得ることができる。

10

【0077】

本明細書において用いられるように、二つのアミノ酸配列間の%相同性は、二つの配列間の%同一性と同等である。二つの配列間の%同一性は、二つの配列を最適に配置するために導入する必要があるギャップの数、各ギャップの長さを考慮に入れた、配列が共有する同一の位置の数の関数(すなわち、%相同性 = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100)である。二つの配列間の配列の比較および%同一性の決定は、以下の非制限的な実施例に記述されるように数学的アルゴリズムを用いて行うことができる。

【0078】

二つのアミノ酸配列間の%同一性は、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み入れられているE. Meyers and W. Miller(Comput. Appl. Biosci. 4:11~17(1988))のアルゴリズムを用いて、PAM120加重残基表、ギャップ長ペナルティ12およびギャップペナルティ4を用いて決定することができる。さらに、二つのアミノ酸配列間の%同一性は、GCGソフトウェアパッケージ(www.gcg.comで入手可能)におけるGAPプログラムに組み入れられているNeedleman and Wunsch(J. Mol. Biol. 48:444~453(1970))のアルゴリズムを用いて、Blossum 62行列またはPAM250行列のいずれかを用いて、ギャップ加重16、14、12、10、8、6、または4および長さの加重1、2、3、4、5、または6を用いて決定することができる。

20

【0079】

追加的に、または代替的に、本発明のタンパク質配列はさらに、例えば関連する配列を同定するために公共のデータベースを検索するための「問い合わせ配列」として用いることができる。そのような検索は、Altschulら(1990)J. Mol. Biol. 215:403~10のXBLASTプログラム(バージョン2.0)を用いて行うことができる。BLASTタンパク質検索は、本発明の抗体分子と相同であるアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3によって行うことができる。比較目的のためにギャップを加えたアラインメントを得るために、Altschulら(1997)Nucleic Acids Res. 25(17):3389~3402に記述されるようなGapped BLASTを使用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを使用する場合、それぞれのプログラム(例えば、XBLASTおよびNBLAST)のデフォルトパラメータを用いることができる。www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい。

30

【0080】

保存的改变を有する抗体

40

特定の態様において、本発明の抗体は、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域ならびにCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含み、これらのCDR配列の一つまたは複数は、本明細書に記述の好ましい抗体(例えば、21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8)またはその保存的改变に基づく特定のアミノ酸配列を含み、抗体は、本発明の抗CD19抗体の所望の機能的特性を保持している。したがって、本発明は、以下である、CDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域ならびにCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離モノクローナル抗体、またはその抗原結合部分を提供する。

(a) 重鎖可変領域CDR3配列が、SEQ ID NO:30、31、32、33、34、35および36のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的改变を含み；

50

- (b) 軽鎖可変領域CDR3配列が、SEQ ID NO: 51、52、53、54、55、56、57および58のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列およびその保存的改変を含み；
 (c) 抗体がCD19に対して $K_D 1 \times 10^{-7}$ Mまたはそれ以下で結合し；
 (d) Raji B細胞腫瘍細胞およびDaudi B細胞腫瘍細胞に結合する。

【0081】

好みの態様において、重鎖可変領域CDR2配列は、SEQ ID NO: 23、24、25、26、27、28および29のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列、およびその保存的改変を含み；ならびに軽鎖可変領域CDR2配列は、SEQ ID NO: 44、45、46、47、48、49および50のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列、およびその保存的改変を含む。もう一つの好みの態様において、重鎖可変領域CDR1配列は、SEQ ID NO: 16、17、18、19、20、21および22のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列、およびその保存的改変を含み；ならびに軽鎖可変領域CDR1配列は、SEQ ID NO: 37、38、39、40、41、42および43のアミノ酸配列からなる群より選択されるアミノ酸配列、およびその保存的改変を含む。10

【0082】

様々な態様において、抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体となりうる。

【0083】

本明細書において用いられるように、「保存的配列改変」は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特徴に有意な影響を及ぼさないまたは変化させないアミノ酸改変を指すと意図される。そのような保存的改変には、アミノ酸置換、付加および欠失が含まれる。改変は、部位特異的変異誘発およびPCR媒介変異誘発のような、当技術分野において公知の標準的な技術によって本発明の抗体に導入することができる。保存的アミノ酸置換は、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換されている置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。これらのファミリーには、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、-分岐側鎖（例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン）、および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を有するアミノ酸が含まれる。このように、本発明の抗体のCDR領域内の一つか複数のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーの他のアミノ酸に置換することができ、変化した抗体を、本明細書に記述の機能的アッセイ法を用いて、保持された機能（すなわち、上記の(c)～(f)に記載の機能）に関して試験することができる。20

【0084】

本発明の抗CD19抗体と同じエピトープに結合する抗体

もう一つの態様において、本発明は、ヒトCD19において、本発明の任意のCD19モノクローナル抗体（すなわち、CD19に対する結合に関して本発明の任意のモノクローナル抗体との交叉競合能を有する抗体）と同じエピトープに結合する抗体を提供する。好みの態様において、交差競合研究の基準抗体は、モノクローナル抗体21D4 (SEQ ID NO: 1および8に示す、それぞれ、 V_H 配列および V_L 配列を有する)、またはモノクローナル抗体21D4a (SEQ ID NO: 1および9に示す、それぞれ、 V_H 配列および V_L 配列を有する)、またはモノクローナル抗体47G4 (SEQ ID NO: 2および10に示す、それぞれ、 V_H 配列および V_L 配列を有する)、またはモノクローナル抗体27F3 (SEQ ID NO: 3および11に示す、それぞれ、 V_H 配列および V_L 配列を有する)またはモノクローナル抗体3C10 (SEQ ID NO: 4および12に示す、それぞれ、 V_H 配列および V_L 配列を有する)またはモノクローナル抗体5G7 (SEQ ID NO: 5および13に示す、それぞれ、 V_H 配列および V_L 配列を有する)またはモノクローナル抗体13F1 (SEQ ID NO: 6および14に示す、それぞれ、 V_H 配列および V_L 配列を有する)またはモノクローナル抗体46E8 (SEQ ID NO: 7および15に示す、それぞれ、 V_H 配列および V_L 配列を有す40

50

る)であり得る。そのような交叉競合抗体は、標準的なCD19結合アッセイ法において21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8とのその交叉競合能に基づいて同定することができる。例えば、BIAcore(登録商標)分析、ELISA法、またはフローサイトメトリーを用いて、本発明の抗体との交叉競合能を証明してもよい。例えば、ヒトCD19に対する21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8の結合を試験抗体が阻害できることは、試験抗体が、ヒトCD19との結合に関して21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8と競合することができ、このようにヒトCD19において21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8と同じエピトープに結合することを証明している。好ましい態様において、ヒトCD19において21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8と同じエピトープに結合する抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。そのようなヒトモノクローナル抗体は、実施例において記述されるように調製および単離することができる。10

【0085】

操作および改変された抗体

改変抗体を操作するための開始材料として本明細書に開示のV_Hおよび/またはV_L配列の一つまたは複数を有する抗体を用いることができ、この改変抗体は開始抗体と比較した場合改変された特性を有してもよい。抗体は、一つまたは双方の可変領域(すなわち、V_Hおよび/またはV_L)内、例えば、一つまたは複数のCDR領域内、および/または一つまたは複数のフレームワーク領域内の一つまたは複数のアミノ酸を改変することによって操作することができる。追加的にまたは代替的に、抗体は、例えば、抗体のエフェクター機能を変化させるために、定常領域内の残基を改変することによって操作することができる。20

【0086】

特定の態様において、CDRの移植を用いて抗体の可変領域を操作することができる。抗体は主に、重鎖および軽鎖相補性決定領域(CDR)6個に存在するアミノ酸残基を通して、標的抗原と相互作用する。この理由から、CDR内のアミノ酸配列は、CDR外の配列より個々の抗体間で多様である。CDR配列はほとんどの抗体-抗原相互作用に関与していることから、異なる特性を有する異なる抗体からフレームワーク配列に移植された特異的な天然に存在する抗体からのCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特異的な天然に存在する抗体の特性を模倣する組換え型抗体を発現させることが可能である(例えば、Riechmann, L.ら(1998)Nature 332:323~327; Jones, P.ら(1986)Nature 321:522~525; Queen, C.ら(1989)Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029~10033; Winterに対する米国特許第5,225,539号、ならびにQueenらに対する米国特許第5,530,101号; 同第5,585,089号; 同第5,693,762号; および同第6,180,370号を参照されたい)。30

【0087】

したがって、もう一つの態様は、SEQ ID NO:16、17、18、19、20、21および22、SEQ ID NO:23、24、25、26、27、28および29、およびSEQ ID NO:30、31、32、33、34、35および36からなる群より選択されるアミノ酸配列を含むCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む重鎖可変領域、ならびにSEQ ID NO:37、38、39、40、41、42、および43およびSEQ ID NO:44、45、46、47、48、49および50、およびSEQ ID NO:51、52、53、54、55、56、57および58および12からなる群よりそれぞれ選択されるアミノ酸配列を含むCDR1、CDR2、およびCDR3配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離モノクローナル抗体、またはその抗原結合部分に関する。このように、そのような抗体は、モノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8のV_HおよびV_LCDR配列を含むが、それでもこれらの抗体の異なるフレームワーク領域を含んでもよい。40

【0088】

そのようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公共のDNAデータベースまたは公表された参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子に関する生殖系列DNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース(インターネットでwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseで入手可能)と共に、それぞれの内容物が特に参照として本明細書に組み入れられる、Kabat, E.A.ら(1991)「Sequences of Proteins

50

of Immunological Interest」、第5版、米国保健社会福祉省、NIH Publication No. 91-3242 ; Tomlinson, I.M. ら(1992)「The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fifty Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops」, J. Mol. Biol. 227:776~798 ; およびCox, J.P.L. ら(1994)「A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage.」Eur. J. Immunol. 24:827~836において認められる。別の例として、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子に対する生殖系列のDNA配列をGenbankデータベース中に見出すことができる。例えば、HCo7 HuMAbマウスで見出された以下の重鎖生殖系列配列は、ここに示すGenbankアクセスション番号で入手できる：1-69(NG_0010109、NT_024637、およびBC070333)、3-33(NG_0010109およびNT_024637)、ならびに3-7(NG_0010109およびNT_024637)。別の例として、HCo12 HuMAbマウスで見出された以下の重鎖生殖系列配列は、ここに示すGenbankアクセスション番号で入手できる：1-69(NG_0010109、NT_024637、およびBC070333)、5-51(NG_0010109およびNT_024637)、4-34(NG_0010109およびNT_024637)、3-30.3(CAJ556644)、ならびに3-23(AJ406678)。

【0089】

抗体のタンパク質配列は、当業者に周知のGapped BLAST (Altschul et al. (1997) Nucleic Acids Research 25: 3389-3402) と呼ばれる配列類似性検索法の一つを使用してコンパイルされたタンパク質配列データベースと比較される。BLASTは、抗体配列とデータベース配列の間の統計的に有意なアラインメントが整列させた文字の高スコアセグメント対 (high-scoring segment pairs) (HSP) を含み得るという点で発見的アルゴリズムである。伸長または短縮によってそのスコアを改善できないセグメント対は、ヒット (hit) と呼ばれる。簡単に言うと、VBASE由来 (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbase1/list2.php>) のヌクレオチド配列は翻訳され、FR1~FR3のフレームワーク領域およびその間の領域を含む領域が保持される。データベース配列の平均長は98残基である。そのタンパク質の全長と正確に一致する重複配列は取り除かれる。低複雑配列フィルター (low complexity filter) をオフにすることとBLOSUM62の置換行列 (substitution matrix) を除いてデフォルトの標準パラメータでblastpプログラムを使用するタンパク質のBLAST検索は、配列一致を生ずる上位5ヒットをフィルターする。ヌクレオチド配列は6つのフレーム全てにおいて翻訳され、一致したデータベース配列のセグメントの中の停止コドンのないフレームは潜在的ヒットとみなされる。これはその後、6つのフレーム全ての抗体配列を翻訳し、その翻訳を6つのフレーム全てにおいて動的に翻訳されたVBASEヌクレオチド配列と比較するBLASTプログラムtblastxを用いて確認される。

【0090】

同一 (identity) とは、抗体配列とタンパク質データベースの間の、その配列全長にまたがる正確なアミノ酸の一致である。正 (positive) (同一+置換一致) は、同一ではないが、BLOSUM62置換行列により導かれたアミノ酸置換である。抗体配列が同じ同一性でデータベース配列の中の2つと一致する場合、最も正值が高いヒットが一致配列のヒットであると決定され得る。

【0091】

本発明の抗体において用いるための好ましいフレームワーク配列は、本発明の選択された抗体によって用いられるフレームワーク配列と構造的に類似の、例えば本発明の好ましいモノクローナル抗体によって用いられる V_H 5-51フレームワーク配列(SEQ ID NO: 74)および/または V_H 1-69フレームワーク配列(SEQ ID NO: 75)および/または V_K L18フレームワーク配列(SEQ ID NO: 76)および/または V_K A27フレームワーク配列(SEQ ID NO: 77)および/または V_K L15フレームワーク配列(SEQ ID NO: 78)と類似の配列である。 V_H CDR1、CDR2、およびCDR3配列、ならびに V_K CDR1、CDR2、およびCDR3配列は、そこからフレームワーク配列が由来する生殖系列免疫グロブリン遺伝子において認められる配列と同一の配列を有するフレームワーク領域に移植することができる、またはCDR配列を生殖系列配列と比較して一つもしくは複数の変異を含むフレームワーク領域に移植することができる。例えば、特定の場合抗体の抗原結合能を維持または増強するために、フレームワーク領域内の

10

20

30

40

50

残基を変異させることが有用である（例えば、Queenらに対する米国特許第5,530,101号；同第5,585,089号；同第5,693,762号；および同第6,180,370号を参照されたい）。

【0092】

もう一つのタイプの可変領域変異は、 V_H および/または V_K CDR1、CDR2、および/またはCDR3領域内のアミノ酸配列を変異させて、それによって対象抗体の一つまたは複数の結合特性（例えば、親和性）を改善することである。変異を導入するために部位特異的変異誘発またはPCR媒介変異誘発を行うことができ、抗体結合に及ぼす、または対象となる他の機能的特性に及ぼすその効果を、本明細書に記述のおよび実施例において提供されるインビトロまたはインビボアッセイ法において評価することができる。好ましくは、保存的改变（上記のように）を導入する。変異は、アミノ酸置換、付加、または欠失であってもよいが、好ましくは置換である。その上、典型的にCDR領域内で変化させる残基は、わずか1、2、3、4、または5個に過ぎない。

10

【0093】

したがって、もう一つの態様において、本開示は、(a) SEQ ID NO: 16、17、18、19、20、21および22からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 16、17、18、19、20、21および22と比較した場合にアミノ酸置換、欠失、もしくは付加1、2、3、4もしくは5個を有するアミノ酸配列を含む V_H CDR1領域；(b) SEQ ID NO: 23、24、25、26、27、28および29からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 23、24、25、26、27、28および29と比較した場合にアミノ酸置換、欠失、もしくは付加1、2、3、4もしくは5個を有するアミノ酸配列を含む V_H CDR2領域；(c) SEQ ID NO: 30、31、32、33、34、35および36からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 30、31、32、33、34、35および36と比較した場合にアミノ酸置換、欠失、もしくは付加1、2、3、4もしくは5個を有するアミノ酸配列を含む V_H CDR3領域；(d) SEQ ID NO: 37、38、39、40、41、42および43からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 37、38、39、40、41、42および43と比較した場合にアミノ酸置換、欠失、もしくは付加1、2、3、4もしくは5個を有するアミノ酸配列を含む V_K CDR1領域；(e) SEQ ID NO: 44、45、46、47、48、49および50からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 44、45、46、47、48、49および50と比較した場合にアミノ酸置換、欠失、もしくは付加1、2、3、4もしくは5個を有するアミノ酸配列を含む V_K CDR2領域；(f) SEQ ID NO: 51、52、53、54、55、56、57および58からなる群より選択されるアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 51、52、53、54、55、56、57および58と比較した場合にアミノ酸置換、欠失、もしくは付加1、2、3、4もしくは5個を有するアミノ酸配列を含む V_K CDR3領域、を含む、重鎖可変領域を含む、単離された抗CD19モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

20

【0094】

本発明の操作された抗体には、例えば抗体の特性を改善するために、 V_H および/または V_K 内のフレームワーク残基に対して改変を行った抗体が含まれる。典型的に、そのようなフレームワーク改変は、抗体の免疫原性を減少させるように行われる。例えば、一つのアプローチは、対応する生殖系列配列に対して一つまたは複数のフレームワーク残基を「復帰突然変異」させることである。より詳しく述べると、体細胞変異を受けた抗体は、そこから抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含んでもよい。そのような残基は、抗体のフレームワーク配列を、抗体が由来する生殖系列配列と比較することによって同定することができる。

30

【0095】

例えば、以下の表1は、その重鎖の親の生殖細胞系配列と異なる抗PD-1抗体17D8、2D3、4H1、5C4、4A11、7D3および5F4のフレームワーク領域における多くのアミノ酸変化を示す。フレームワーク領域配列中のアミノ酸残基の一つまたは複数をそれらの生殖細胞系の構成に戻すために、体細胞変異体は、例えば、部位特異的変異誘発またはPCR媒介変異誘発によりその生殖細胞系配列に「復帰変異」され得る。

40

【0096】

（表1）重鎖生殖細胞系の構成から抗体17D8、2D3、4H1、5C4、4A11、7D3および5F4へ

50

の改变

抗体	アミノ酸の位置	抗体のアミノ酸	生殖細胞系構成の本来のアミノ酸
21D4	30	S	T
	77	R	S
21D4a	30	S	T
	77	R	S
47G4	24	D	A
3C10	77	N	S
	88	A	S
5G7	19	N	K
	77	N	S
13F1	19	Q	K
	28	T	S
	85	G	S
46E8	19	Q	K
	28	T	S
	85	G	S

【 0 0 9 7 】

もう一つのタイプのフレームワーク改变は、T細胞エピトープを除去して、それによって抗体の起こりうる免疫原性をそれによって減少させるために、フレームワーク領域内または一つまたは複数のCDR領域内の中または複数の残基を変異させることを含む。このアプローチはまた、Carrらによる米国特許公開第20030153043号にさらに詳細に記述されている。

【 0 0 9 8 】

フレームワークまたはCDR領域内で行う改变の他にまたはその代わりに、本発明の抗体は、典型的に、血清中半減期、補体固定、Fc受容体結合、および/または抗原依存的細胞障害性のような抗体の一つまたは複数の機能的特性を変化させるために、Fc領域内での改变を含むように操作してもよい。さらに、本発明の抗体は化学修飾してもよく（例えば、一つまたは複数の化学部分を抗体に結合させることができる）またはそのグリコシル化を変化させるように、再度抗体の一つまたは複数の機能的特性を変化させるように改変してもよい。これらの態様のそれぞれを下記にさらに詳細に記述する。Fc領域における残基の番号付けは、KabatのEUインデックスの通りである。

【 0 0 9 9 】

一つの態様において、CH1のヒンジ領域は、ヒンジ領域におけるシステイン残基の数が変化するように、例えば増加または減少するように改変される。このアプローチはBodmerらの米国特許第5,677,425号においてさらに記述される。CH1のヒンジ領域におけるシステイン残基の数は、例えば軽鎖および重鎖の集合を容易にするように、または抗体の安定性を増加もしくは減少させるように改変される。

【 0 1 0 0 】

もう一つの態様において、抗体のFcヒンジ領域は、抗体の生物学的半減期を減少させるように改変される。より詳しく述べると、抗体が天然のFc-ヒンジドメインSpA結合と比較してブドウ球菌プロテインA (SpA) 結合の障害を有するように、一つまたは複数のアミノ酸変異をFc-ヒンジ断片のCH2-CH3ドメイン界面領域に導入する。このアプローチは、Wardらによる米国特許第6,165,745号においてさらに詳細に記述される。

【 0 1 0 1 】

もう一つの態様において、抗体は、その生物学的半減期を増加させるように改変される。様々なアプローチが可能である。例えば、Wardらに対する米国特許第6,277,375号に記述されるように、一つまたは複数の以下の変異を導入することができる。T252L、T254S、T256F。または、生物学的半減期を増加させるために、Prestaらによって米国特許第5,869,046号および同第6,121,022号に記述されるように、IgGのFc領域のCH2ドメインの二つの

10

20

30

40

50

ループから得たサルベージ受容体結合エピトープを含むように、抗体をCH1またはCL領域内で変化させることができる。

【0102】

さらに他の態様において、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を変化させるために少なくとも一つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基に置換することによって変化させる。例えば、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320、および322から選択される一つまたは複数のアミノ酸を、抗体がエフェクターリガンドに対して変化した親和性を有するが、親抗体の抗原結合能を保持するように、異なるアミノ酸残基に置換することができる。それに対する親和性が変化するエフェクターリガンドは、例えばFc受容体または補体のC1成分となりうる。このアプローチは、いざれもWinterらによる米国特許第5,624,821号および同第5,648,260号にさらに詳しく記述されている。 10

【0103】

もう一つの例において、抗体が、C1q結合の変化、および/または補体依存的細胞障害性(CDC)の減少または消失を示すように、アミノ酸残基329、331、および322から選択される一つまたは複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基に置換することができる。このアプローチは、Idusogieらによる米国特許第6,194,551号にさらに詳しく記述されている。

【0104】

もう一つの例において、アミノ酸2316、17、18、19、20、21および2239位内での一つまたは複数のアミノ酸残基を変化させて、それによって抗体の補体固定能を変化させる。このアプローチは、BodmerらによるPCT公報国際公開公報第94/29351号に詳しく記述されている。 20

【0105】

さらにもう一つの例において、Fc領域は、以下の位置：238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438、または439での一つまたは複数のアミノ酸を改変することによって、抗体の抗体依存的細胞障害性(ADCC)を媒介する能力を増加させるように、および/またはFc受容体に対する抗体の親和性を増加させないように、改変される。このアプローチは、PrestaによるPCT公報国際公開公報第0/42072号に詳しく記述されている。その上、Fc RI、Fc RII、Fc R IIIおよびFcRnに関するヒトIgG1上の結合部位がマッピングされており、結合の改善を示す変種が記述されている(Shields, R.L. ら(2001), J. Biol. Chem. 276:6591~6604を参照されたい)。256、290、298、333、334、および339位での特異的変異は、Fc R IIIに対する結合を改善することが示された。さらに、以下の複合変異体は、Fc R III結合を改善することが示された：T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224AおよびS298A/E333A/K334A。 30

【0106】

なおもう一つの態様において、抗体のグリコシル化が改変される。例えば、無グリコシル化抗体を作製することができる(すなわち、抗体はグリコシル化を欠損する)。グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させるように変化させることができる。そのような糖質の改変は、例えば抗体配列内の一つまたは複数のグリコシル化部位を変化させることによって行うことができる。例えば、一つまたは複数の可変領域フレームワークグリコシル化部位を消失させて、それによってその部位でのグリコシル化を消失させる一つまたは複数のアミノ酸置換を行うことができる。そのような無グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を増加させる可能性がある。そのようなアプローチは、Coらの米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号にさらに詳細に記述されている。 40

【0107】

追加的にまたは代替的に、フコシル残基の減少量を有する低フコシル化抗体または二等分GlcNac構造の増加を有する抗体のような、変化したタイプのグリコシル化を有する抗体を作製することができる。そのような変化したグリコシル化パターンは、抗体のADCC能を 50

増加させることができている。そのような糖質改変は、例えば変化したグリコシル化機構を有する宿主細胞において抗体を発現させることによって行うことができる。変化したグリコシル化機構を有する細胞は当技術分野で記述されており、本発明の組換え型抗体を発現させて、それによって変化したグリコシル化を有する抗体を产生するための宿主細胞として用いることができる。例えば、細胞株Ms704、Ms705、およびMs709は、Ms704、Ms705、およびMs709細胞株で発現される抗体がそれらの炭化水素においてフコースを欠如するように、フコシルトランスフェラーゼ遺伝子であるFUT8 ((1,6)フコシルトランスフェラーゼ)を欠如している。Ms704、Ms705、およびMs709のFUT8^{-/-}細胞株は、2つの置換ペクターを用いてCHO/DG44細胞のFUT8遺伝子を標的破壊することによって作製された (Yamaneらによる米国特許公報第20040110704号およびYamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol Bioeng 87:614-22を参照されたい)。別の例として、Hanaiらによる欧州特許第1,176,195号には、そのような細胞株において発現された抗体が、1,6結合関連酵素を減少させるかまたは除去することによって低フコシル化を示すように、機能的に破壊された、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子を有する細胞株が記述されている。Hanaiらはまた、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを付加するための低い酵素活性を有するか、または酵素活性を有しない細胞株、例えばラットの骨髄腫細胞株YB2/0 (ATCC CRL 1662)について記述している。PrestaによるPCT公報国際公開公報第03/035835号は、Asn(297)結合炭化水素にフコースを結合させる能力が低下した変種CHO細胞株であるLec 13細胞について記述しており、同様にその宿主細胞において発現された抗体の低フコシル化が得られたことを記述している (同様に、Shields, R.Lら (2002), J. Biol. Chem. 277:26733 ~ 26740を参照されたい)。UmanaによるPCT公報国際公開公報第9/54342号は、操作された細胞株において発現された抗体が、二等分GlcNac構造の増加を示し、それによって抗体のADCC活性の増加が起こる (同様に、Umanaら (1999) Nat. Biotechnol. 17: 176 ~ 180を参照されたい) ように、糖タンパク質改変グリコシルトランスフェラーゼ (例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnT III)) を発現させるように操作された細胞株を記述している。または、抗体のフコース残基はフコシダーゼ酵素を用いて切断してもよい。例えば、フコシダーゼである-L-フコシダーゼは、抗体からフコシル残基を取り除く (Tarentino, A.L. et al. (1975) Biochem. 14:5 516-23)。

【0108】

本発明によって企図される本明細書に記述の抗体のもう一つの改変は、PEG化である。抗体は例えば、抗体の生物学的 (例えば、血清) 半減期を増加させるためにPEG化することができる。抗体をPEG化するために、抗体またはその断片を典型的に、一つまたは複数のPEG基が抗体または抗体断片に結合するようになる条件で、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体のようなポリエチレンギリコール (PEG) と反応させる。好ましくは、PEG化は、反応性PEG分子 (または類似の反応性水溶性ポリマー) とのアシル化反応またはアルキル化反応によって行われる。本明細書において用いられるように、「ポリエチレンギリコール」という用語は、モノ(C1-C10)アルコキシまたはアリールオキシ-ポリエチレンギリコールまたはポリエチレンギリコール-マレイミドのような、他のタンパク質を誘導体化するために用いられているPEGの任意の型を含むと意図される。特定の態様において、PEG化される抗体は、無グリコシル化抗体である。タンパク質をPEG化する方法は当技術分野で公知であり、本発明の抗体に適用することができる。例えば、Nishimuraらによる欧州特許第0 154 316号およびIshikawaらによる欧州特許第0 401 384号を参照されたい。

【0109】

抗体の物理的特性

本発明の抗体はさらに、抗CD19抗体の様々な物理的特性により特徴付けられ得る。これらの物理的特性に基づき異なる抗体クラスを検出および/または識別するのに様々なアッセイ法が使用され得る。

【0110】

10

20

30

40

50

いくつかの態様において、本発明の抗体は、軽鎖可変領域または重鎖可変領域のいずれかに一つまたは複数のグリコシル化部位を含み得る。可変領域に一つまたは複数のグリコシル化部位が存在することで、抗体の免疫原性が増加し、抗原の結合の変化により抗体のpKが変化する (Marshall et al (1972) *Annu Rev Biochem* 41: 673-702; Gala FA and Morrison SL (2004) *J Immunol* 172: 5489-94; Wallick et al (1988) *J Exp Med* 168: 109-109; Spiro RG (2002) *Glycobiology* 12: 43R-56R; Parekh et al (1985) *Nature* 316: 452-7; Mimura et al. (2000) *Mol Immunol* 37: 697-706)。グリコシル化は、N-X-S/T配列を含むモチーフで起こることが公知である。可変領域のグリコシル化は、抗体を切断してFabを生成し、次いで過ヨウ素酸酸化およびシップ塩基形成を測定するアッセイ法を用いてグリコシル化を試験するグリコプロット (Glycoblott) アッセイ法を用いて試験され得る。あるいは、可変領域のグリコシル化は、Fabから糖類を切断して单糖にし、個々の糖類の内容を分析するダイオネクスライトクロマトグラフィ (Dionex light chromatography) (Dionex-LC) を用いて試験され得る。いくつかの例において、抗CD19抗体が可変領域のグリコシル化を含まないことが好ましい。これは、可変領域にグリコシル化モチーフを含まない抗体を選別することによってか、当業者に周知の標準的技術を用いてグリコシル化モチーフ内の残基を変異させることによってのいずれかによって達成され得る。

【0111】

好ましい態様において、本発明の抗体は、アスパラギン異性部位を含まない。脱アミド作用またはイソアスパラギン酸作用は、それぞれ、N-G配列またはD-G配列上で生じ得る。脱アミド作用またはイソアスパラギン酸作用は、主鎖よりも側鎖のカルボキシ末端からねじれ構造を形成することにより抗体の安定性を減少させるイソアスパラギン酸を形成する。イソアスパラギン酸の生成は、逆相HPLCを用いてイソアスパラギン酸を試験するイソ-クアント (iso-quant) アッセイ法を用いて測定され得る。

【0112】

各抗体は、固有の等電点 (pI) を有し得るが、一般的に抗体は6~9.5のpH範囲に含まれる。IgG1抗体のpIは、典型的には7~9.5のpH範囲に含まれ、IgG4抗体のpIは、典型的には6~8のpH範囲に含まれる。抗体は、この範囲外のpIを有し得る。その効果は一般的には知られていないが、正常範囲外のpIを有する抗体は、インビボ条件下である程度アンフォールディングし、不安定である場合があるという説がある。等電点は、pH勾配を形成し精度向上のためにレーザー集光を利用し得るキャピラリー等電点電気泳動アッセイ法を用いて試験され得る (Janini et al (2002) *Electrophoresis* 23: 1605-11; Ma et al. (2001) *Chromatographia* 53: S75-89; Hunt et al (1998) *J Chromatogr A* 800: 355-67)。いくつかの例において、抗CD19抗体が正常範囲に含まれるpI値を含むことが好ましい。これは、正常範囲内のpIを有する抗体を選別することによってか、または当技術分野で周知の標準的技術を用いて荷電表面残基を変異することによってのいずれかによって達成され得る。

【0113】

各抗体は、熱安定性の指標となる融解温度を有し得る (Krishnamurthy R and Manning MC (2002) *Curr Pharm Biotechnol* 3: 361-71)。熱安定性の高さは、インビボでの抗体全体の安定性の高さを示す。抗体の融点は、示差走査熱量測定 (Chen et al (2003) *Pharm Res* 20: 1952-60; Ghirlando et al (1999) *Immunol Lett* 68: 47-52) 等の技術を用いて測定され得る。T_{M1}は、抗体の最初のアンフォールディングの温度を示す。T_{M2}は、抗体の完全なアンフォールディングの温度を示す。一般的に、本発明の抗体のT_{M1}は60超であり、好ましくは65超であり、さらにより好ましくは70超であることが望ましい。あるいは、抗体の熱安定性は、円偏光二色性を用いて測定され得る (Murray et al. (2002) *J. Chromatogr Sci* 40: 343-9)。

【0114】

好ましい態様において、抗体は急速に分解しないものが選択される。抗CD19抗体の断片化は、キャピラリー電気泳動 (CE) およびMALDI-MSを用いて測定され得、これらは当技術分野で十分に理解されている (Alexander AJ and Hughes DE (1995) *Anal Chem* 67: 3626

10

20

30

40

50

-32)。

【0115】

別の好ましい態様において、抗体は最小の凝集性を有するものが選択される。凝集は、望ましくない免疫反応の要因および/または変化したもしくは好ましくない薬理学的特性をもたらし得る。一般的に、25%またはそれ以下、好ましくは20%またはそれ以下、さらにより好ましくは15%またはそれ以下、さらにより好ましくは10%またはそれ以下、さらにより好ましくは5%またはそれ以下の凝集性を有する抗体が許容できる。凝集は、一量体、二量体、三量体、または多量体を同定するサイズ排除カラム(SEC)高速液体クロマトグラフィ(HPLC)および光散乱を含む当技術分野で周知のいくつかの技術によって測定され得る。

10

【0116】

抗体を操作する方法

先に記述したように、本明細書に開示のV_HおよびV_K配列を有する抗CD19抗体を用いて、V_Hおよび/またはV_K配列、またはそれに結合した定常領域を変更することによって、新規抗CD19抗体を作製することができる。このように、本発明のもう一つの局面において、本発明の抗CD19抗体、例えば21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8の構造的特徴を用いて、ヒトCD19に結合するような、本発明の抗体の少なくとも一つの機能的特性を保持する構造的に関連する抗CD19抗体を作製する。例えば、21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8またはその変異の一つもしくは複数のCDR領域を、組換えによって公知のフレームワーク領域および/または他のCDRと組み合わせて、先に記述するように、さらなる組換えによって産生された本発明の抗CD19抗体を作製することができる。他のタイプの変更には、先の章で記述された変更が含まれる。操作された方法の開始材料は、本明細書において提供したV_Hおよび/またはV_K配列の一つまたは複数または一つまたは複数のそのCDR領域である。操作された抗体を作製するために、本明細書において提供されたV_Hおよび/またはV_K配列の一つもしくは複数、または一つもしくは複数のそのCDR領域を有する抗体を実際に調製する必要はない。むしろ、配列に含まれる情報を開始材料として用いて、当初の配列に由来する「第二世代」の配列を作製した後、「第二世代」の配列を調製してタンパク質として発現させる。

20

【0117】

したがって、もう一つの態様において、本発明は、以下を含む、抗CD19抗体を調製する方法を提供する：

30

(a) (i) SEQ ID NO:16、17、18、19、20、21および22からなる群より選択されるCDR1配列、SEQ ID NO:23、24、25、26、27、28および29からなる群より選択されるCDR2配列、および/またはSEQ ID NO:30、31、32、33、34、35および36からなる群より選択されるCDR3配列を含む、重鎖可変領域抗体配列；ならびに/または(ii) SEQ ID NO:37、38、39、40、41、42および43からなる群より選択されるCDR1配列、SEQ ID NO:44、45、46、47、48、49および50からなる群より選択されるCDR2配列、および/またはSEQ ID NO:51、52、53、54、55、56、57および58からなる群より選択されるCDR3配列、を含む軽鎖可変領域抗体配列、を提供する段階；

(b) 重鎖可変領域抗体配列および/または軽鎖可変領域抗体配列内の少なくとも一つのアミノ酸残基を変化させて、少なくとも一つの変化した抗体配列を作製する段階；および

40

(c) 変化した抗体配列をタンパク質として発現させる段階。

【0118】

標準的な分子生物学技術を用いて変化した抗体配列を調製および発現させることができる。

【0119】

好ましくは、変化した抗体配列によってコードされる抗体は、機能的特性が以下を含むがこれらに限定されない、本明細書に記述の抗CD19抗体の機能的特性の一つ、一部、または全てを保持する抗体である。

50

- (i) ヒトCD19に対して K_D 1×10^{-7} Mまたはそれ以下で結合し；
- (ii) Raji B細胞腫瘍細胞およびDaudi B細胞腫瘍細胞に結合する。

【0120】

改変抗体の機能的特性は、実施例に記述されるような、当技術分野で使用可能なおよび／または本明細書に記述の標準的なアッセイ法（例えば、フローサイトメトリー、結合アッセイ法）を用いて評価することができる。

【0121】

本発明の抗体を操作する方法の特定の態様において、抗CD19抗体コード配列の全てまたは一部に沿って変異を無作為または選択的に導入することができ、得られた改変された抗CD19抗体を、本明細書に記述の結合活性および／または他の機能的特性に関してスクリーニングすることができる。変異法は当技術分野において記述されている。例えば、ShortによるPCT公報国際公開公報第02/092780号は、飽和変異誘発、合成ライゲーションアセンブリ、またはその組み合わせを用いて抗体の変異を作製してスクリーニングする方法を記述している。または、LazarらによるPCT公報国際公開公報第03/074679号は、抗体の物理化学特性を最適にするために、コンピュータスクリーニング法を用いる方法を記述している。

10

【0122】

抗体をコードする核酸分子

本発明のもう一つの局面は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は全細胞、細胞溶解物、または部分精製もしくは実質的に精製型で存在してもよい。核酸は、アルカリ／SDS処置、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当技術分野で周知の他の技術を含む標準的な技術によって、他の細胞成分または他の混入物から精製されている場合に「単離されている」または「実質的に純粋にされている」。例えば、F. Ausubelら編(1987)「Current Protocols in Molecular Biology.」, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照されたい。本発明の核酸は、例えば、DNAまたはRNAとなりえて、インtron配列を含んでも含まなくてもよい。好ましい態様において、核酸はcDNA分子である。

20

【0123】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学技術を用いて得ることができる。ハイブリドーマ（例えば、下記にさらに記述するように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスから調製したハイブリドーマ）によって発現される抗体に関して、ハイブリドーマによって作製される抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、標準的なPCR増幅またはcDNAクローニング技術によって得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリ（例えば、ファージディスプレイ技術を用いて）から得られた抗体の場合、抗体をコードする1つまたは複数の核酸をライブラリから回収することができる。

30

【0124】

本発明の好ましい核酸分子は、21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1または46E8モノクローナル抗体のVHおよびVL配列をコードする分子である。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8のVH配列をコードするDNA配列はそれぞれ、SEQ ID NO: 59、60、61、62、63、64および65に示される。21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8のVL配列をコードするDNA配列はそれぞれ、SEQ ID NO: 66、67、68、69、70、71、72および73に示される。

40

【0125】

V_H および V_L セグメントをコードするDNA断片が得られた後、例えば、可変領域遺伝子を完全長の抗体鎖遺伝子、Fab断片遺伝子、またはscFv遺伝子に変換するために、これらのDNA断片を標準的な組換えDNA技術によってさらに操作することができる。これらの操作において、 V_L または V_H コードDNA断片を、抗体の定常領域または柔軟なリンカーのようなもう一つのタンパク質をコードするもう一つのDNA断片に機能的に結合させる。この状況において用いられるように、「機能的に結合した」という用語は、二つのDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がなおもインフレームに留まるように二つのDNA断片を結合さ

50

することを意味すると意図される。

【0126】

VH領域をコードする単離DNAは、V_HコードDNAを、重鎖定常領域（CH1、CH2、およびCH3）をコードするもう一つのDNA分子に機能的に連結させることによって、完全長の重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で公知であり（例えば、Kabat, E.A.ら(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、米国保健社会福祉省、NIH Publication No. 91～3242）、これらの領域を含むDNA断片は、標準的なPCR増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、またはIgD定常領域となりうるが、最も好ましくはIgG1またはIgG4定常領域である。Fab断片重鎖遺伝子に関して、VH-コードDNAを重鎖CH1定常領域のみをコードするもう一つのDNA分子に機能的に結合させることができる。10

【0127】

V_L領域をコードする単離されたDNAは、VLコードDNAを、軽鎖定常領域CLをコードするもう一つのDNA分子に機能的に結合させることによって、完全長の軽鎖遺伝子に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は当技術分野で公知であり（例えば、Kabat, E.A.ら(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、米国保健社会福祉省、NIH Publication No. 91～3242を参照されたい）、これらの領域を含むDNA断片は標準的なPCR増幅によって得ることができる。好ましい態様において、軽鎖定常領域は または 定常領域となりうる。20

【0128】

scFv遺伝子を作製するために、V_HおよびV_L配列が、V_LおよびV_H領域が柔軟なリンカーによって結合した連続した一本鎖タンパク質として発現されうるよう、V_HおよびV_LコードDNA断片を、柔軟なリンカー、例えばアミノ酸配列(Gly₄-Ser)₃をコードするもう一つの断片に機能的に結合させる（例えば、Birdら(1988)Science 242:423～426；Hustonら(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879～5883；McCaffertyら(1990)Nature 348:552～554を参照されたい）。

【0129】

モノクローナル抗体の产生

本発明のモノクローナル抗体(mAb)は、通常のモノクローナル抗体の方法論、例えばKohler and Milstein(1975)Nature 256:495の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術を含む、多様な技術によって产生することができる。体細胞ハイブリダイゼーション技法は原則として好ましいが、モノクローナル抗体を产生するための他の技術、例えばBリンパ球のウイルスまたは腫瘍遺伝子形質転換を用いることができる。30

【0130】

ハイブリドーマを調製するための好ましい動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ产生は非常によく確立された技法である。免疫プロトコールおよび融合のために免疫した脾臓を単離する技術は、当技術分野で公知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）および融合技法も同様に公知である。

【0131】

本発明のキメラまたはヒト化抗体は、上記のように調製した非ヒトモノクローナル抗体の配列に基づいて調製することができる。重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAは、対象マウスハイブリドーマから得ることができ、標準的な分子生物学技術を用いて、非マウス（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含むように操作することができる。例えば、キメラ抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法を用いてマウス可変領域をヒト定常領域に結合させることができる（例えば、Cabillyらに対する米国特許第4,816,567号を参照されたい）。ヒト化抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法を用いてマウスCDR領域をヒトフレームワークに挿入することができる（例えば、Winterらの米国特許第5,225,539号、およびQueenらの米国特許第5,530,101号、同第5,585,089号、同第5,693,762号、および同第6,180,370号を参照されたい）。

【0132】

50

20

30

40

50

好ましい態様において、本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体である。CD19に対するそのようなヒトモノクローナル抗体は、マウス系よりむしろヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックまたは導入染色体性マウスを用いて作製することができる。これらのトランスジェニックおよび導入染色体性マウスには、本明細書においてHuMabマウス（登録商標）およびKMマウス（登録商標）とそれぞれ呼ばれるマウスが含まれ、これらを本明細書において集合的に「ヒトIgマウス」と呼ぶ。

【0133】

HuMabマウス（登録商標）（Medarex（登録商標），Inc.）は、内因性のμおよび鎖座を不活性化する標的化変異と共に非再配列ヒト重鎖（μおよび）および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子ミニ座を含む（例えば、Lonbergら（1994）Nature 368(6474):856～859）。したがって、マウスは、マウスIgMまたはの発現の減少を示し、免疫に反応して、導入されたヒト重鎖および軽鎖トランスジーンがクラススイッチおよび体細胞変異を受けて、高親和性ヒトIgGモノクローナル抗体を産生する（Lonberg, N. ら（1994）、上記；Lonberg, N.（1994）Handbook of Experimental Pharmacology 13:49～101における論評；Lonberg, N. and Huszar, D.（1995）Intern. Rev. Immunol. 13:65～93、およびHarding, F. and Lonberg, N.（1995）Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536～546）。HuMabマウス（登録商標）の調製および使用、ならびにそのようなマウスが有するゲノム改変は、その全ての内容物が全体として特に参照として本明細書に組み入れられる、Taylor, L. ら（1992）Nucleic Acids Research 20:6287～6295；Chen, J. ら（1993）International Immunology 5:647～656；Tuaiillon ら（1993）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720～3724；Choi ら（1993）Nature Genetics 4:117～123；Chen, J. ら（1993）EMBO J. 12:821～830；Tuaiillon ら（1994）J. Immunol. 152:2912～2920；Taylor, L. ら（1994）International Immunology 6:579～591；およびFishwild, D. ら（1996）Nature Biotechnology 14:845～851に詳しく記述されている。さらに、全てLonbergおよびKayに対する米国特許第5,545,806号；同第5,569,825号；同第5,625,126号；同第5,633,425号；同第5,789,650号；同第5,877,397号；同第5,661,016号；同第5,814,318号；同第5,874,299号；および同第5,770,429号；Surani らに対する米国特許第5,545,807号；全てLonbergおよびKayに対するPCT公報国際公開公報第92/03918号；国際公開公報第93/12227号、国際公開公報第94/25585号、国際公開公報第97/13852号、国際公開公報第98/24884号および国際公開公報第99/45962号；ならびにKorman らに対するPCT公報国際公開公報第01/14424号を参照されたい。

【0134】

もう一つの態様において、本発明のヒト抗体は、ヒト重鎖トランスジーンとヒト軽鎖導入染色体とを有するマウスのような、トランスジーンおよび導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウスを用いて作製することができる。本明細書において「KMマウス（商標）」と呼ばれるそのようなマウスは、Ishida らに対するPCT公報国際公開公報第02/43478号において詳細に記述されている。

【0135】

なおさらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現するもう一つのトランスジェニック動物系は、当技術分野で入手可能であり、本発明の抗CD19抗体を作製するために用いることができる。例えば、Xenomouse（Abgenix, Inc.）と呼ばれるもう一つのトランスジェニックシステムを用いることができ；そのようなマウスは例えば、Kucherlapati らに対する米国特許第5,939,598号；同第6,075,181号；同第6,114,598号；同第6,150,584号；および同第6,162,963号に記述されている。

【0136】

その上、代わりの導入染色体性動物システムが、当技術分野で入手可能であり、本発明の抗CD19抗体を作製するために用いることができる。例えば、「TCマウス」と呼ばれるヒト重鎖導入染色体およびヒト軽鎖導入染色体の双方を有するマウスを用いることができ；そのようなマウスはTomizuka ら（2000）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722～727に記述されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体を有するウシが当技術分野において記述されており（Kuroiwa ら（2002）Nature Biotechnology 20:889～894）、本発明の抗CD19

抗体を作製するために用いることができる。

【0137】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライプラリをスクリーニングするために、ファージディスプレイ法を用いて調製することができる。ヒト抗体を単離するためのそのようなファージディスプレイ法は、当技術分野において確立されている。例えば、Ladnerらの米国特許第5,223,409号、同第5,403,484号、および同第5,571,698号；Dowerらの米国特許第5,427,908号、および同第5,580,717号；MaCaffertyらの米国特許第5,969,108号および同第6,172,197号、ならびにGriffithsらの米国特許第5,885,793号、同第6,521,404号、同第6,544,731号、同第6,555,313号、同第6,582,9130, 31, 32, 33, 34, 35号、および同第36,593,081号を参照されたい。

10

【0138】

本発明のヒトモノクローナル抗体はまた、免疫時にヒト抗体反応が産生されうるよう、SCIDマウスを用いて調製することができる。そのようなマウスは、例えばWilsonらの米国特許第5,476,996号および同第5,698,767号に記述されている。

【0139】

ヒトIgマウスの免疫

ヒトIgマウスを用いて本発明のヒト抗体を産生する場合、Lonberg, N.ら(1994)Nature 368(6474):856～859；Fishwild, D.ら(1996)Nature Biotechnology 14:845～851；およびPCT公報国際公開公報第98/24884号および国際公開公報第01/14424号に記述されるように、CD19抗原および／または組換え型CD19、またはCD19を発現する細胞、またはCD19融合タンパク質の精製または濃縮調製物によって、そのようなマウスを免疫することができる。好ましくは、マウスは初回注射時6～16週齢であると思われる。例えば、CD19抗原の精製または組換え型調製物(5～50 μg)を用いてヒトIgマウスを腹腔内注射によって免疫することができる。

20

【0140】

CD19に対する完全なヒトモノクローナル抗体を作製するための詳細な技法を、下記の実施例1に記述する。様々な抗原による経験の蓄積から、抗原をフロイントの完全アジュvantと共に最初に腹腔内注射によって免疫した後、2週間毎に抗原をフロイントの不完全アジュvantと共に注射した場合に(全体で6回まで)トランスジェニックマウスが反応することが示されている。しかし、フロイント以外のアジュvantも同様に有効であることが判明している。さらに、アジュvantの非存在下では細胞全体が非常に免疫原性であることが判明している。免疫応答は、眼窩後方採血によって得られた血漿試料によって免疫プロトコールの経過のあいだモニターすることができる。血漿をELISA(下記)によってスクリーニングすることができ、抗CD19ヒト免疫グロブリンの十分な力値を有するマウスを融合のために用いることができる。屠殺および脾臓摘出の3日前に、マウスに抗原を静脈内に追加免疫することができる。各免疫に関して融合2～3回を行う必要があると予想される。典型的に、マウス6～24匹を各抗原によって免疫する。通常、HCo7およびHCo12系統の双方を用いる。さらに、HCo7およびHCo12トランスジーンの双方を、二つの異なる重鎖トランスジーン(HCo7/HCo12)を有するマウス1匹に交配させることができる。代替的にまたは追加的に、KMマウス(登録商標)株を実施例1に記載のように使用することができる。

30

【0141】

ヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するため、免疫したマウスから脾細胞および／またはリンパ節細胞を単離して、マウス骨髄腫細胞株のような適当な不死化細胞株に融合させることができる。得られたハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生に関してスクリーニングすることができる。例えば、免疫したマウスの脾細胞リンパ球の単一細胞浮遊液を、50%PEGによって、1/6の数のP3X63-Ag8.653非分泌マウス骨髄腫細胞(ATCC、CRL 1580)に融合することができる。または、免疫したマウス由来の脾細胞リンパ球の単一細胞懸濁液を、サイトパルス大型チャンバー細胞融合エレクトロボ

40

50

レーター (CytoPulse large chamber cell fusion electroporator) (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, Maryland) 平底マイクロタイプレートにおいて細胞を約2 × 10⁵個で播種した後、20% 胎児クローン血清、18% 「653」条件培地、5% origin (IGEN) 、4 mM L-グルタミン、1 mM ピルビン酸ナトリウム、5 mM HEPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50単位/mlペニシリン、50 mg/mlストレプトマイシン、50 mg/mlゲンタマイシン、1×HAT (Sigma; HATを融合後24時間で加える) を含む選択培地において2週間インキュベートした。約2週間後、HATをHTに置換した培地において細胞を培養することができる。次に、個々のウェルをヒトモノクローナル抗体 IgM および IgG 抗体に関して ELISA によってスクリーニングすることができる。ハイブリドーマの十分な増殖が起こった後、培地を通常10～14日後に観察することができる。抗体を分泌するハイブリドーマを再度播種して、再度スクリーニングし、ヒト IgG に関してなおも陽性であれば、モノクローナル抗体を限界希釈によって少なくとも2回サブクローニングすることができる。次に、安定なサブクローンをインピトロで培養して、特徴付けのために組織培養培地において抗体の少量を産生させることができる。
10

【0142】

ヒトモノクローナル抗体を精製するために、選択したハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製のために、2 Lスピナーフラスコにおいて増殖させることができる。上清を濾過して濃縮してから、プロテインA-セファロース (Pharmacia, Piscataway, N.J.) によるアフィニティクロマトグラフィーを行うことができる。溶出した IgG をゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによってチェックして、純度を確認することができる。緩衝液をPBSに交換して、濃度を吸光係数1.43を用いてOD280によって決定することができる。モノクローナル抗体は少量に分けて、-80 で保存することができる。
20

【0143】

モノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの作製

本発明の抗体はまた、例えば、当技術分野において周知である（例えば、Morrison, S. (1985) *Science* 229:1202）組換えDNA技術および遺伝子トランスフェクション法の組み合わせを用いて、宿主細胞トランスフェクトーマにおいて産生することができる。

【0144】

例えば、抗体またはその抗体断片を発現させるために、部分的または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAを、標準的な分子生物学技術（例えば、対象抗体を発現するハイブリドーマを用いるPCR增幅またはcDNAクローニング）によって得ることができ、遺伝子が転写および翻訳制御配列に機能的に結合するように発現ベクターにDNAを挿入することができる。この状況において、「機能的に結合した」という用語は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというその意図される機能を示すように、抗体遺伝子がベクターにライゲーションされていることを意味すると意図される。発現ベクターおよび発現制御配列は、用いる発現宿主細胞と適合性であるように選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を、異なるベクターに挿入することができ、またはより典型的に双方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子は、標準的な方法によって発現ベクターに挿入する（例えば、抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合には平滑末端ライゲーション）。本明細書に記述の抗体の軽鎖および重鎖可変領域を用いて、V_Hセグメントがベクター内でC_Hセグメントに機能的に結合し、V_Kセグメントがベクター内でC_Lセグメントに機能的に結合するように、所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクターにそれらを挿入することによって、任意の抗体アイソタイプの完全長の抗体遺伝子を作製することができる。追加的にまたは代替的に、組換え型発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードすることができる。シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで結合するよう、抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質からのシグナルペプチド）となりうる。
30
40
50

【0145】

抗体鎖遺伝子の他に、本発明の組換え型発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。「調節配列」という用語には、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）が含まれると意図される。そのような調節配列は、例えばGoeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA(1990)) に記述される。調節配列の選択を含む発現ベクターの設計は、形質転換される宿主細胞の選択、望ましいタンパク質の発現レベル等のような要因に依存する可能性があることは、当業者によって認識されると思われる。哺乳類宿主細胞発現にとって好ましい調節配列には、サイトメガロウイルス (CMV)、シミアンウイルス40 (SV40)、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター (AdMLP) およびポリオーマ）に由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーのような、哺乳類細胞において高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメントが含まれる。または、ユビキチンプロモーターまたは -グロビンプロモーターのような、非ウイルス調節配列を用いてもよい。なおさらに、SV40初期プロモーターからの配列および1型ヒトT細胞白血病ウイルスの長末端反復を含む、SR プロモーター系のような異なる起源からの配列からなる調節エレメント (Takebe, Y.ら (1988)Mol. Cell Biol. 8:466 ~ 472)。

【0146】

抗体鎖遺伝子および調節配列の他に、本発明の組換え型発現ベクターは、宿主細胞においてベクターの複製を調節する配列（例えば、複製開始点）および選択マーカー遺伝子のようなさらなる配列を有してもよい。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入される宿主細胞の選択を容易にする（例えば、全てAxelらによる米国特許第4,399,216号、同第4,634,665号、および同第5,179,017号を参照されたい）。例えば、典型的に選択マーカー遺伝子は、G418、ヒグロマイシン、またはメソトレキセートのような薬物に対する抵抗性を、ベクターが導入されている宿主細胞に付与する。好ましい選択マーカー遺伝子には、ジヒドロ葉酸レダクターゼ (DHFR) 遺伝子（メソトレキセート選択 / 増幅によってdhfr-宿主細胞において用いるため）およびneo遺伝子 (G418選択のため) が含まれる。

【0147】

軽鎖および重鎖を発現させるために、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを標準的な技術によって宿主細胞にトランスフェクトする。様々な型の「トランスフェクション」は、外因性のDNAを原核または真核宿主細胞に導入するために一般的に用いられる広範な技術、例えば、電気穿孔、磷酸カルシウム沈殿、およびDEAEデキストラントトランスフェクション等を含むと意図される。原核または真核宿主細胞のいずれかにおいて本発明の抗体を発現させることは理論的に可能であるが、真核細胞および最も好ましくは哺乳類宿主細胞における抗体の発現は、そのような真核細胞および特に哺乳類細胞が、適切に構築された免疫学的に活性な抗体を集合および分泌させる可能性が原核細胞より高いことから、最も好ましい。抗体遺伝子の原核細胞発現は、高い収率で活性な抗体を産生するためには無効であることが報告されている (Boss, M.A. and Wood, C.R. (1985) Immunology Today 6:12 ~ 13)。

【0148】

本発明の組換え型抗体を発現させるための好ましい哺乳類宿主細胞には、チャイニーズハムスター卵巣 (CHO細胞)（例えばR.J, Kaufman and P.A. Sharp(1982)Mol. Biol. 159: 601 ~ 621において記述されるDHFR選択マーカーと共に用いられる、Urlaub and Chasin(1980)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 ~ 4220に記述されるdhfr-CHO細胞を含む）、NS0骨髄腫細胞、COS細胞、およびSP2細胞が含まれる。特に、NS0骨髄腫細胞に関して用いるために、もう一つの好ましい発現系は国際公開公報第87/04462号 (Wilsonに付与)、国際公開公報第89/01036号 (Bebbingtonに付与)、および欧州特許第338,841号 (Bebbingtonに付与) に開示のGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え型発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入する場合、宿主細胞において抗体を発現させるために、またはより好ましくは宿主細胞が増殖した培地に抗体を分泌させるために十分な期間、宿主細胞を

10

20

30

40

50

培養することによって抗体が産生される。抗体は、標準的なタンパク質精製法を用いて培地から回収することができる。

【0149】

抗原に対する抗体結合の特徴付け

本発明の抗体は、例えば標準的なELISAによってCD19に対する結合に関して試験することができる。簡単に説明すると、マイクロタイタープレートを0.25 μg/ml精製CD19のPBS溶液によってコーティングした後、5%ウシ血清アルブミンのPBS溶液によってブロッキングした。抗体の希釈液（例えば、CD19免疫マウスからの血漿の希釈液）を各ウェルに加えて、37℃で1~2時間インキュベートした。プレートをPBS/Tweenによって洗浄した後、アルカリホスファターゼに結合させた二次試薬（例えば、ヒト抗体に関して、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬）と共に37℃で1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをpNPP基質（1 mg/ml）によって展開させて、OD 450-650で分析した。好ましくは、最高の力価を示すマウスを融合のために用いる。

【0150】

上記のELISA法はまた、CD19免疫原との反応陽性を示すハイブリドーマに関してスクリーニングするために用いることができる。CD19に対して高い結合力で結合するハイブリドーマをサブクローニングしてさらに特徴を調べる。親細胞の反応性を保持する（ELISAによる）各ハイブリドーマからのクローン1個を-140℃で保存されるバイアル5~10個の細胞バンクを作製するため、および抗体を精製するために選択することができる。

【0151】

抗CD19抗体を精製するために、選択したハイブリドーマをモノクローナル抗体精製のために2 Lスピナーフラスコにおいて増殖させることができる。上清を濾過して濃縮してから、プロテインA-セファロースによるアフィニティクロマトグラフィー（Pharmacia, Piscataway, NJ）を行うことができる。溶出したIgGは、純度を確保するために、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーによってチェックすることができる。緩衝液をPBSに交換して、濃度を吸光係数1.43を用いてOD₂₈₀によって決定することができる。モノクローナル抗体を少量に分けて、-80℃で保存することができる。

【0152】

選択された抗CD19モノクローナル抗体が独自のエピトープに結合する能力を決定するために、各抗体を市販の試薬を用いてビオチン結合することができる（Pierce, Rockford, IL）。上記のように、CD19コーティングELISAプレートを用いて、非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を用いる競合試験を行うことができる。ビオチン化mAb結合は、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプローブによって検出することができる。

【0153】

精製抗体のアイソタイプを決定するために、特定のアイソタイプの抗体に対して特異的な試薬を用いて、アイソタイプELISAを行うことができる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを決定するために、マイクロタイタープレートのウェルを1 μg/ml抗ヒト免疫グロブリンによって4℃で一晩コーティングした。1% BSAによってブロッキングした後、プレートを1 μg/mlまたはそれ以下の試験モノクローナル抗体または精製アイソタイプ対照に室温で1~2時間反応させた。次に、ウェルをヒトIgGまたはヒトIgM特異的アルカリホスファターゼ結合プローブに反応させることができる。プレートを上記のように展開して分析する。

【0154】

抗CD19ヒトIgGは、ウェスタンブロッティングによってCD19抗原に対する反応性についてさらに試験することができる。簡単に説明すると、CD19を調製して、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に供することができる。電気泳動後、分離した抗原をニトロセルロースメンブレンに転写して、10%仔ウシ胎児血清によってブロッキングし、試験すべきモノクローナル抗体によってプローピングした。ヒトIgG結合は、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを用いて検出し、BCIP/NBT基質タブレット（Sigma Chem., St.

10

20

30

40

50

Louis, Mo) によって展開することができる。

【0155】

免疫複合体

もう一つの局面において、本発明は、細胞毒素、薬物（例えば、免疫抑制剤）または放射性毒素のような治療部分に結合した抗CD19抗体またはその断片を特徴とする。そのような結合体は、本明細書において「免疫複合体」と呼ばれる。一つまたは複数の細胞毒素を含む免疫複合体は「免疫毒素」と呼ばれる。細胞毒素または細胞障害物質には、細胞にとって有害である（例えば殺す）任意の物質が含まれる。例にはタキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムプロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンプラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミスラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、ならびにピューロマイシンおよびその類似体または相同体が含まれる。治療物質にはまた、例えば抗代謝剤（例えば、メソトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）、およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびシス-ジクロロジアミンプラチナ（II）（DDP）（シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（これまでのダウノマイシン）およびドキソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（これまでのアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミスラマイシン、およびアンスラマイシン（AMC））、および抗分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンプラスチン）が含まれる。10

【0156】

本発明の抗体に結合することができる他の好ましい治療的細胞毒素の例には、デュオカルマイシン、カリケアミシン、メイタンシン、およびアウリスタチンならびにその誘導体が含まれる。カリケアミシン抗体結合体の例は市販されている（Mylotarg（商標）；American Home Products）。

【0157】

細胞毒素は、当技術分野で使用できるリンカー技術を用いて本発明の抗体に結合することができる。細胞毒素を抗体に結合するために用いられているリンカーのタイプの例には、ヒドラゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、およびペプチド含有リンカーが含まれるがこれらに限定されない。ライソゾーム画分内で低いpHによる切断に対して感受性がある、またはカテプシン（例えば、カテプシンB、C、D）のような腫瘍組織において選択的に発現されるプロテアーゼのようなプロテアーゼによる切断に対して感受性があるリンカーを選択することができる。30

【0158】

細胞毒素のタイプに関するさらなる考察に関して、治療物質を交代に結合させる方法は、同様にSaito, G.ら(2003)Adv. Drug. Deliv. Rev 55:199～215；Trail, P.A.ら(2003)Cancer Immunol. Immunother. 52:328～337；Payne, G.(2003)Cancer Cell 3:207～212；A llen, T.M.(2002)Nat. Rev. Cancer 2:750～763；Pastan, I. and Kreitman, R.J.(2002)Curr. Opin. Investig. Drugs. 3:1089～1091；Senter, P.D. and Springer, C.J.(2001)Adv. Drug. Deliv. Rev. 53:247～264を参照されたい。40

【0159】

本発明の抗体はまた、細胞障害性放射性薬剤を作製するために放射性同位元素に結合させることができ、同様に放射性免疫複合体と呼ばれる。診断または治療的に用いるために抗体に結合させることができる放射性同位元素の例には、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰およびルテニウム¹⁷⁷が含まれるがこれらに限定されない。放射性免疫複合体を調製する方法は当技術分野で確立されている。放射性免疫複合体の例は、Zevalin（登録商標）（IDE Pharmaceuticals）およびBexxar（登録商標）（Corixa Pharmaceuticals）50

Is) を含み、市販されており、類似の方法を用いて、本発明の抗体を用いて放射性免疫複合体を調製することができる。

【0160】

本発明の抗体結合体を用いて、所定の生体反応を改変することができ、薬物部分は古典的な治療物質に限定されないと解釈される。例えば、薬物部分は、所望の生物活性を有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。そのようなタンパク質には、例えばアブリン、リシンA、シュードモナス (Pseudomonas) のエンドトキシン、もしくはジフテリア毒素のような酵素的に活性な毒素またはその活性断片；腫瘍壞死因子もしくはインターフェロン- α のようなタンパク質；または例えばリンフォカイン、インターロイキン-1 (「IL-1」)、インターロイキン-2 (「IL-2」)、インターロイキン-6 (「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子 (「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子 (「G-CSF」)、もしくは他の増殖因子が含まれてもよい。

【0161】

そのような治療部分を抗体に結合させるための技術は周知であり、例えば、Arnonら「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy.」「Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy」, Reisfeldら(eds), pp.243~56 (Alan R. Liss, Inc. 1985) ; Hellstromら、「Antibodies For Drug Delivery」、「Controlled Drug Delivery(2nd Ed.)」, Robinsonら(eds), pp.623~53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) ; Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy : A Review」、「Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications.」Pincheraら(eds.), pp.475~506(1985) : 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy.」、「Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy」、Baldwinら(eds.), pp.303~16(Academic Press 1985)、およびThorpeら, Immunol. Rev., 62:119~58(1982)を参照されたい。

【0162】

二重特異的分子

もう一つの局面において、本発明は、本発明の抗CD19抗体またはその断片を含む二重特異的分子を特徴とする。本発明の抗体またはその抗原結合部分は、もう一つの機能的分子、例えばもう一つのペプチドまたはタンパク質(例えば、もう一つの抗体または受容体のリガンド)に誘導体化または連結させて、少なくとも二つの異なる結合部位または標的分子に結合する二重特異的分子を作製することができる。本発明の抗体を、実際に、複数の他の機能的分子に誘導体化または連結させて、二つより多い異なる結合部位および/または標的部位に結合する多重特異的分子を作製してもよく；そのような多重特異的分子はまた、本明細書において用いられるように「二重特異的分子」という用語に含まれると意図される。本発明の二重特異的分子を作製するために、本発明の抗体は、それによって二重特異的分子が得られるように、もう一つの抗体、抗体断片、ペプチド、または結合模倣体のような一つまたは複数の他の結合分子に機能的に連結させることができる(例えば、化学的カップリング、遺伝的融合、非共有結合会合、またはその他)。

【0163】

したがって、本発明には、CD19に対する少なくとも一つの第一の結合特異性および第二の標的エピトープに対する第二の結合特異性を含む二重特異的分子が含まれる。本発明の特定の態様において、第二の標的エピトープは、Fc受容体、例えばヒトFc RI (CD64) またはヒトFc 受容体 (CD89) である。したがって、本発明には、Fc RまたはFc R発現エフェクター細胞(例えば、単球、マクロファージ、または多形核細胞 (PMN))とCD19を発現する標的細胞の両方に結合することができる二重特異的分子が含まれる。これらの二重特異的分子は、CD19発現細胞をエフェクター細胞にターゲティングして、CD19発現細胞の貪食、抗体依存的細胞性細胞障害性 (ADCC)、サイトカイン放出、またはスーパーオキシド陰イオンの產生のような、Fc受容体媒介エフェクター細胞活性を誘発する。

【0164】

二重特異的分子が多重特異的である本発明の一つの態様において、分子にはさらに、抗

10

20

30

40

50

Fc結合特異性および抗CD19結合特異性の他に、第三の結合特異性が含まれうる。一つの態様において、第三の結合特異性は抗増強因子（EF）部分、例えば、細胞障害活性に関与する表面タンパク質に結合し、それによって標的細胞に対する免疫応答を増加させる分子である。「抗増強因子部分」は、所定の分子、例えば抗原または受容体に結合し、それによつてFc受容体または標的細胞抗原に対する結合決定因子の作用の増強が起こる抗体、機能的抗体断片、またはリガンドとなりうる。「抗増強因子部分」は、Fc受容体または標的細胞抗原に結合することができる。または、抗増強因子部分は、第一および第二の結合特異性が結合する実体とは異なる実体に結合することができる。例えば、抗増強因子部分は、細胞障害性T細胞（例えば、CD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1、または標的細胞に対する免疫応答の増加が起こる他の免疫細胞によって）に結合することができる。

10

【0165】

一つの態様において、本発明の二重特異的分子は、結合特異性として、例えば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、Fd、dAbまたは一本鎖Fvを含む少なくとも一つの抗体、またはその抗体断片を含む。抗体はまた、その内容が特に参照により本明細書に組み入れられる、Landnerらに付与の米国特許第4,946,778号に記述されるようにFvまたは一本鎖構築物のような軽鎖もしくは重鎖二量体、またはその任意の最小の断片であつてもよい。

【0166】

一つの態様において、Fc受容体に対する結合特異性は、その結合がヒト免疫グロブリンG（IgG）によって遮断されないモノクローナル抗体によって提供される。本明細書において用いられるように、「IgG受容体」という用語は、第1染色体上に存在する任意の鎖遺伝子8個を指す。これらの遺伝子は、三つのFc受容体クラスに分類される膜貫通または可溶性受容体イソ型を全体で12個コードする。Fc RI (CD64)、Fc RII (CD32)、およびFc RIII (CD16)。一つの好ましい態様において、Fc受容体はヒト高親和性Fc RIである。ヒトFc RIは、72 kDa分子であり、これは単量体IgGに対して高い親和性（10⁸ ~ 10⁹ M⁻¹）を示す。

20

【0167】

特定の好ましい抗Fcモノクローナル抗体の產生および特徴付けは、その教示が完全に参照により本明細書に組み入れられる、PCT公報国際公開公報第88/00052号およびFangerらに付与の米国特許第4,954,617号に記述される。これらの抗体は、受容体のFc結合部位とは異なる部位でFc RI、Fc RII、またはFc RIIIのエピトープに結合し、このようにその結合は、IgGの生理的レベルによって実質的に遮断されない。本発明において有用である特異的抗Fc RI抗体は、mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62、およびmAb 197である。mAb 32を產生するハイブリドーマは、American Type Culture Collection ATCCアクセッション番号HB 9469から入手可能である。一つの態様において、抗Fc受容体抗体は、モノクローナル抗体22 (H22) のヒト化型である。H22抗体の產生および特徴付けは、Graziano, R.F.ら(1995)J. Immunol. 155(10):4996 ~ 5002およびTempestらに付与のPCT公報国際公開公報第94/10332号に記述されている。H22抗体產生細胞株は、American Type Culture CollectionにHA022CL1の名称で寄託され、アクセッション番号CRL 11177を有する。

30

【0168】

さらに他の好ましい態様において、Fc受容体の結合特異性は、その結合が好ましくはヒト免疫グロブリンA（IgA）によって遮断されないヒトIgA受容体、例えばFc-受容体（Fc RI (CD89)）に結合する抗体によって提供される。「IgA受容体」という用語には、第19染色体に存在する一つの遺伝子（Fc RI）の遺伝子産物が含まれると意図される。この遺伝子は、55 ~ 110 kDaのいくつかの選択的スプライシング膜貫通イソ型をコードすることが公知である。Fc RI (CD89)は、単球 / マクロファージ、好酸球および好中球顆粒球において構成的に発現されるが、非エフェクター細胞集団には発現されない。Fc RIは、IgA1およびIgA2の双方に関して中等度の親和性（~5 × 10⁷ M⁻¹）を有し、これはG-CSFまたはGM-CSFのようなサイトカインに対する曝露後増加する（Morton, H.C.ら(1996)Critical Reviews in Immunology 16:423 ~ 440）。IgAリガンド結合ドメイン外でFc RIに結合するA3、A59、A62、およびA77と同定された四つのFc RI-特異的モノクローナル抗体が

40

50

記述されている (Monteiro, R.C. ら (1992) J. Immunol. 148:1764)。

【0169】

Fc RIおよびFc RIは、(1)免疫エフェクター細胞、例えば単球、PMN、マクロファージ、および樹状細胞において主に発現される、(2)高レベルで発現される(例えば、細胞あたり5,000~100,000個)、(3)細胞障害活性のメディエータである(例えば、ADCC、食食)、および(4)それらにターゲティングされる自己抗原を含む抗原の抗原提示の増強を媒介することから、それらは本発明の二重特異的分子において用いるための好ましい誘発受容体である。

【0170】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本発明の二重特異的分子において用いることができる他の抗体は、マウス、キメラ、およびヒト化モノクローナル抗体である。

【0171】

本発明の二重特異的分子は、当技術分野で公知の方法を用いて、構成成分結合特異性、例えば抗FcRおよび抗CD19結合特異性を結合させることによって調製することができる。例えば、二重特異的分子の各結合特異性を個々に產生して、それらを互いに結合させることができる。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合、共有結合のために多様なカッピング剤または架橋剤を用いることができる。架橋剤の例には、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシニミジル-S-アセチル-チオアセテート(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート(SPDP)、およびスルホスクシニミジル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(スルホ-SMCC)(例えば、Karpovskiyら(1984)J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MAら(1985)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照されたい)。他の方法には、Paulus(1985)Behring Ins. Mitt. No. 78, 118~132; Brennanら(1985)Science 229:81~83およびGlennieら(1987)J. Immunol. 139:2367~2375において記述される方法が含まれる。好ましい結合物質はSATAおよびスルホ-SMCCであり、いずれもPierce Chemical Co. (Rockford, IL) から入手できる。

【0172】

結合特異性が抗体である場合、それらを、二つの重鎖のC-末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合によって結合させることができる。特に好ましい態様において、ヒンジ領域は結合の前に奇数、好ましくは1個のスルフヒドリル残基を含むように改変される。

【0173】

または、双方の結合特異性が同じベクターにおいてコードされ、同じ宿主細胞において発現および構築される。この方法は、二重特異的分子がmAb × mAb、mAb × Fab、Fab × F(ab')₂、またはリガンド × Fab融合タンパク質である場合に、特に有用である。本発明の二重特異的分子は、一つの一本鎖抗体および結合決定基を含む一本鎖分子となりうる、または二つの結合決定基を含む一本鎖二重特異的分子となりうる。二重特異的分子は少なくとも二つの一本鎖分子を含む。二重特異的分子を調製する方法は、例えば、米国特許第5,260,203号、米国特許第5,455,030号、米国特許第4,881,175号、米国特許第5,132,405号、米国特許第5,091,513号、米国特許第5,476,786号、米国特許第5,013,653号、米国特許第5,258,498号、および米国特許第5,482,858号に記述され、これら全ては本明細書において参照により本質的に組み入れられる。

【0174】

その特異的標的に対する二重特異的分子の結合は、例えば酵素結合結合免疫吸着測定法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ法(RIA)、FACS分析、バイオアッセイ法(例えば、増殖阻害)またはウェスタンプロットアッセイ法によって確認することができる。これらのアッセイ法のそれぞれは一般的に、対象複合体に対して特異的な標識試薬(例えば、抗体)を用いることによって、特に対象となるタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えば、FcR-抗体複合体は、例えば、抗体-FcR複合体を認識して特異的に結合する酵素結合抗体または抗体断片を用いて検出することができる。または、複合体は、任意の多様な他のイムノアッセイ法を用いて検出することができる。例えば、抗体を放射活性標識して、

10

20

30

40

50

ラジオイムノアッセイ法 (RIA) において用いることができる (例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Weinstraub, B. 「Principles of Radioimmunoassays」、Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques. The Endocrine Society, March 1 1986を参照されたい)。放射性同位元素は、カウンターもしくはシンチレーションカウンター、またはオートラジオグラフィーを用いるような手段によって検出することができる。

【0175】

薬学的組成物

もう一つの局面において、本発明は、薬学的に許容される担体と共に製剤化された、本発明のモノクローナル抗体、またはその抗原結合部分を一つまたは併用して含む組成物、例えば薬学的組成物を提供する。そのような組成物には、一つまたは併用の (例えば、二つまたはそれ以上の異なる) 本発明の抗体、免疫複合体、または二重特異的分子が含まれてもよい。例えば、本発明の薬学的組成物は、標的抗原上で異なるエピトープに結合する、または相補的活性を有する抗体 (または免疫複合体もしくは二重特異的分子) の組み合せを含みうる。

【0176】

本発明の薬学的組成物はまた、併用治療において、すなわち他の物質と併用して投与することができる。例えば、併用治療には、少なくとも一つの他の抗炎症または免疫抑制剤と併用した本発明の抗CD19抗体が含まれうる。併用治療において用いることができる治療物質の例は、本発明の抗体の使用に関する下記の章においてより詳しく記述される。

【0177】

本明細書において用いられるように、「薬学的に許容される担体」には、生理的に適合性である任意の全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸収遅延剤等が含まれる。好ましくは、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄、または表皮内投与 (例えば注射または注入) に適している。投与経路に応じて、活性化合物、すなわち抗体、免疫複合体、または二重特異的分子は、酸の作用および化合物を不活性化する可能性がある他の天然の条件から化合物を保護する材料によってコーティングしてもよい。

【0178】

本発明の薬学的組成物には、一つまたは複数の薬学的に許容される塩が含まれてもよい。 「薬学的に許容される塩」は、親化合物の所望の生物活性を保持して、望ましくない毒性作用を付与しない塩を指す (例えば、Berge, S.M.ら (1977) J. Pharm. Sci. 66:1~19を参照されたい)。そのような塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩が含まれる。酸付加塩には、塩酸、硝酸、磷酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、および燐等のような非毒性の無機酸と共に、脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸等のような非毒性有機酸に由来する塩が含まれる。塩基付加塩には、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、およびカルシウム等のようなアルカリ土類金属と共にN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、塩素、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、およびプロカイン等のような非毒性の有機アミンに由来する塩が含まれる。

【0179】

本発明の薬学的組成物にはまた、薬学的に許容される抗酸化剤が含まれてもよい。薬学的に許容される抗酸化剤の例には、(1) アスコルビン酸、塩酸システィン、硫酸水素ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、および亜硫酸ナトリウム等のような水溶性抗酸化剤、(2) アスコルビルパルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール (BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン (BHT)、レシチン、プロピルガレート、および -トコフェロール等のような脂溶性抗酸化剤、および(3) クエン酸、エチレンジアミン四酢酸 (EDTA)、ソルビトール、酒石酸、および磷酸等のような金属キレート剤、が含まれる。

【0180】

本発明の薬学的組成物において用いてもよい適した水溶性および非水溶性担体の例には

10

20

30

40

50

、水、エタノール、ポリオール（グリセロール、プロピレングリコール、およびポリエチレングリコール等）、およびその適した混合物、オリーブ油のような植物油、およびオレイン酸エチルのような注射用有機エステルが含まれる。例えば、レシチンのようなコーティング材料を用いることによって、分散剤の場合には必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって、適切な流動性を維持することができる。

【0181】

これらの組成物はまた、保存剤、湿潤剤、乳化剤および分散剤のようなアジュバントを含んでもよい。微生物の存在の予防は、上記の滅菌技法によって、および様々な抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、およびフェノールソルビン酸等を含めることによって確保してもよい。同様に、糖、および塩化ナトリウム等のような等張剤を組成物に加えることが望ましいかも知れない。さらに、注射用製剤の吸収持続型は、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンのような吸収を遅らせる物質を含むことによって得てもよい。

【0182】

薬学的に許容される担体には、滅菌水溶液または分散液、ならびに滅菌注射溶液または分散液の即時調製のための滅菌粉末が含まれる。薬学的に活性な物質のためにそのような媒体および物質を用いることは、当技術分野で公知である。如何なる通常の培地または物質も活性化合物と不適合性である場合を除き、本発明の薬学的組成物におけるその使用が企図される。補助活性化合物も同様に、組成物に組み入れることができる。

【0183】

治療的組成物は典型的に、製造および保存条件で滅菌および安定でなければならない。組成物は、高い薬物濃度に適した溶液、微小乳剤、リポソーム、または他の秩序だった構造として調製することができる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコール等）、およびその適した混合物を含む溶媒または分散媒体となりうる。適切な流動性は、例えばレシチンのようなコーティングを用いることによって、分散剤の場合には必要な粒径を維持することによって、および界面活性剤を用いることによって維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖、マンニトールのような多価アルコール、ソルビトール、または塩化ナトリウムを組成物に含めることが好ましいと思われる。注射用組成物の持続的な吸収は、吸収を遅らせる物質、例えばモノステアリン酸塩およびゼラチンを組成物に含めることによって得ることができる。

【0184】

滅菌注射溶液は、必要な量の活性化合物を、先に列挙した成分の一つまたは組み合わせと共に適当な溶媒に組み入れた後、必要に応じて微細濾過滅菌することによって調製することができる。一般的に、分散剤は、基礎分散培地および先に列挙した中から必要な他の成分を含む滅菌媒体に活性化合物を組み入れることによって調製される。滅菌注射溶液を調製するための滅菌粉末の場合、好ましい調製法は、既に濾過滅菌されたその溶液から活性成分プラス任意のさらなる所望の成分の粉末を生じる真空乾燥および凍結乾燥（凍結乾燥）である。

【0185】

担体材料と配合して単一の投与剤形を生じることができる活性成分の量は、治療すべき被験者、および特定の投与様式に依存して変化すると考えられる。担体材料と配合して単一の投与剤形を生じることができると活性成分の量は、一般的に治療効果を生じる組成物の量であると考えられる。一般的に100%の中で、この量は活性成分の約0.01%～約99%、好ましくは約0.1～約70%、最も好ましくは、薬学的に許容される担体と配合して活性成分約1%～約30%の範囲であると思われる。

【0186】

投与レジメンは、最適な所望の反応（例えば、治療反応）を提供するように調節される。例えば、1回ボーラス投与を行ってもよく、数回の分割用量を経時的に投与してもよく、または用量を治療的状況の緊急性に応じて比例的に減少または増加させてもよい。投与

10

20

30

40

50

の容易さおよび用量の均一性のために、非経口組成物を単位投与剤形に調製することが特に都合がよい。本明細書において用いられる単位投与剤形は、治療すべき被験者に関して単位用量として適している物理的に個別の単位を指し；各単位は、必要な薬学的担体に関連して所望の治療効果を生じるように計算された活性成分の既定量を含む。本発明の単位投与剤形の仕様は、(a)活性化合物の独自の特徴および得られる特定の治療効果、ならびに(b)個体における感受性の治療のためにそのような活性化合物を合成する場合の当技術分野において固有の制限、によって左右され、直接依存する。

【0187】

抗体を投与する場合、用量は、約0.0001～100 mg/kg、より通常0.01～5 mg/kg宿主体重の範囲である。例えは、用量は0.3 mg/kg体重、1 mg/kg体重、3 mg/kg体重、5 mg/kg体重、もしくは10 mg/kg体重となりえて、または1～10 mg/kgの範囲内となりうる。例としての治療レジメンは、1週間に1回、2週間に1回、3週間毎に1回、4週間毎に1回、毎月1回、3ヶ月に1回、または3～6ヶ月毎に1回の投与を含む。本発明の抗CD19抗体に関する好ましい投与レジメンには、1 mg/kg体重または3 mg/kg体重を静脈内投与によって投与することが含まれ、抗体は以下の投与スケジュールの一つを用いて投与される：(i)4週間毎に6回投与、その後3ヶ月毎；(ii)3週間毎；(iii)3 mg/kg体重の後に1 mg/kg体重を3週間毎。

10

【0188】

いくつかの方法において、異なる結合特異性を有する二つまたはそれ以上のモノクローナル抗体を同時に投与して、この場合、投与される各抗体の用量は、示された範囲内に入る。抗体は通常、複数回投与される。投与間隔は、例えは毎週、毎月、3ヶ月毎または毎年となりうる。間隔はまた、患者における標的抗原に対する抗体の血液中レベルを測定することによって示されるように不規則となりうる。いくつかの方法において、用量は約1～1000 μg/mlの抗体血漿濃度を得るように、およびいくつかの方法において約25～300 μg/mlを得るように調節される。

20

【0189】

または、抗体は徐放製剤として投与することができ、この場合必要な投与回数はより少ない。用量および投与回数は、患者における抗体の半減期に応じて変化する。一般的に、ヒト抗体は最も長い半減期を示し、その後にヒト化抗体、キメラ抗体、および非ヒト抗体が続く。投与の用量および回数は、治療が予防的または治療的であるか否かに依存して変化しうる。予防的適用の場合、比較的低用量を比較的少ない回数で長期間投与する。患者によっては、人生の残りの期間、治療を受け続ける。治療的応用の場合、疾患の進行が減少または停止するまで、および好ましくは患者が疾患症状の部分的または完全な改善を示すまで、比較的高用量を比較的短期間で投与することが時に必要である。その後、患者に予防レジメンを投与することができる。

30

【0190】

本発明の薬学的組成物における活性成分の実際の投与レベルは、患者に対して毒性を示すことなく、特定の患者に関する所望の治療反応、組成物、および投与様式を得るために有効である活性成分の量を得るために変化してもよい。選択された用量レベルは、用いられる本発明の特定の組成物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与経路、投与時間、用いる特定の化合物の排泄速度、治療期間、他の薬剤、用いる特定の組成物と併用して用いられる化合物および/または材料、治療される患者の年齢、性別、体重、状態、全身健康およびこれまでの既往、および医学の技術分野において周知の同様の要因を含む多様な薬物動態因子に依存すると考えられる。

40

【0191】

本発明の抗CD19抗体の「治療的有効量」によって、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、無病期間の回数および期間の増加、または疾患の罹患による障害もしくは無能の予防が起こる。例えは、CD19⁺腫瘍の処置に関して、「治療的有効量」は、好ましくは細胞増殖または腫瘍の増殖を、無処置被験者と比較して少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、およびさらにより好ましくは少

50

なくとも約80%阻害する。化合物が腫瘍の増殖を阻害できるか否かは、ヒト腫瘍における有効性を予測する動物モデル系において評価することができる。または、組成物のこの特性を、化合物の細胞増殖阻害能を調べることによって評価することができ、このような阻害は当業者に公知のアッセイ法によるインビトロで測定できる。治療化合物の治療的有効量は、被験者における腫瘍の大きさを減少させることができる、またはそうでなければ症状を改善することができる。当業者は、被験者の体格、被験者の症状の重症度、および選択した特定の組成物または投与経路のような要因に基づいてそのような量を決定することができると思われる。

【0192】

本発明の組成物は、当技術分野で公知の多様な方法の一つまたは複数を用いて、一つまたは複数の投与経路によって投与することができる。当業者によって認識されるように、投与経路および投与様式は所望の結果に応じて変化すると思われる。本発明の抗体の好ましい投与経路には、例えば注射または注入による、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄、または他の非経口投与経路が含まれる。本明細書において用いられるように「非経口投与」という句は、通常、注射による腸内および局所投与以外の投与様式を意味し、これには、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、囊内、眼窩内、心臓内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、表皮下、関節内、囊内、くも膜下、脊髄内、硬膜外、および大槽内注射および注入が含まれるがこれらに限定されない。

【0193】

または、本発明の抗体は、局所、表皮、または粘膜内投与経路のような、例えば鼻腔内、経口、膣内、直腸内、舌下、または局所のような、非経口経路によって投与することができる。

【0194】

活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、および微小封入送達系を含む、徐放製剤のような迅速な放出に対して化合物を保護すると思われる担体と共に調製することができる。エチレン-酢酸ビニル、ポリアンヒドリド、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸のような生体分解性の生体適合性ポリマーを用いることができる。そのような製剤の調製に関する多くの方法が特許出願されており、または一般的に当業者に公知である。例えば、「Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems」, J.R. Robinson, ed. Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照されたい。

【0195】

治療組成物は、当技術分野で公知の医学装置によって投与することができる。例えば、好ましい態様において、本発明の治療組成物は、米国特許第5,399,163号、同第5,383,851号、同第5,312,335号、同第5,064,413号、同第4,941,880号、同第4,790,824号、または同第4,596,556号に開示される装置のような、針のない皮下注射装置によって投与することができる。本発明において有用な周知のインプラントおよびモジュールの例には、以下が含まれる：制御された速度で薬剤を分配するための埋め込み型微量注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号、皮膚を通して薬剤を投与するための治療装置を開示する米国特許第4,486,194号、正確な注入速度で薬剤を送達するための薬剤注入ポンプを開示する米国特許第4,447,233号、持続的薬物送達のための可変流速埋め込み型注入装置を開示する米国特許第4,447,224号、多室区画を有する浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,439,196号、および浸透圧薬物送達システムを開示する米国特許第4,475,196号。これらの特許は、参照により本明細書に組み入れられる。そのような多くの他のインプラント、送達システム、およびモジュールが当業者に公知である。

【0196】

特定の態様において、本発明のヒトモノクローナル抗体は、インビトロで適切な分布を確保するために調製することができる。例えば、血液-脳関門(BBB)は、多くの非常に親水性の化合物を排除する。本発明の治療化合物がBBBを確実に通過するためには(所望の場合)、それらを例えばリポソームにおいて調製することができる。リポソームを製造する方法に関しては、例えば米国特許第4,522,811号、同第5,374,548号、および同第5,399,33

10

20

30

40

50

1号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器に選択的に輸送され、このように標的化薬物送達を増強する一つまたは複数の部分を含んでもよい（例えば、V.V. Ranade(1989)J. Clin. Pharmacol. 29:685を参照されたい）。例としてのターゲティング部分には、葉酸塩またはビオチン（例えば、Lowらに対する米国特許第5,416,016号を参照されたい）、マンノシド（Umezawaら(1988)Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038）、抗体（P.G. Bloemanら(1995)FEBS Lett. 357:140；M. Owaisら(1995)Antimicrob. Agents Chemother. 39:180）、界面活性剤プロテインA受容体（Briscoeら(1995)Am. J. Physiol. 269:R1233:134）、p120（Schreierら(1994)J. Biol. Chem. 269:9090）が含まれ；同様にK. Keinanen；M.L. Laukkonen(1994)FEBS Lett. 346:123；J.J. Killion, I.J. Fidler(1994)Immunomethods 4:273を参照されたい。

10

【0197】

用途および方法

本発明の抗体、特にヒト抗体、抗体組成物、および方法は、CD19媒介障害の診断および処置を伴う多数のインピトロおよびインピボ診断および治療的有用性を有する。例えば、これらの分子は、多様な障害を処置、予防、および診断するために、インピトロもしくはエクスピボで培養細胞に、または例えばインピボでヒト被験者に投与することができる。本明細書において用いられるように、「被験者」という用語には、ヒトおよび非ヒト動物が含まれると意図される。非ヒト動物には全ての脊椎動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ニワトリ、両生類、およびは虫類のような哺乳動物および非哺乳動物が含まれる。好ましい被験者にはCD19活性によって媒介される障害を有するヒト患者が含まれる。方法は、異常なCD19発現に関連した障害を有するヒト患者を処置するために特に適切である。CD19に対する抗体をもう一つの物質と共に投与する場合、両者をいずれかの順序で、または同時に投与することができる。

20

【0198】

CD19に関する本発明の抗体の特異的結合を考慮すると、本発明の抗体は、細胞表面上のCD19発現を特異的に検出するために用いることができ、その上免疫アフィニティ精製によってCD19を精製するために用いることができる。

【0199】

さらに、様々な腫瘍細胞におけるCD19の発現を考慮すると、本発明のヒト抗体、抗体組成物、および方法は、腫瘍形成性の障害、例えば、非ホジキンリンパ腫（NHL）、急性リンパ球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、バーキットリンパ腫、未分化型大細胞リンパ腫（ALCL）、多発性骨髄腫、皮膚T-細胞リンパ腫、結節性小切れ込み核細胞型リンパ腫、リンパ球性リンパ腫、末梢性T-細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T-細胞白血病／リンパ腫（ATLL）、成人T細胞白血病（T-ALL）、エントロブ拉斯ティック（entroblastic）／セントロサイティック（centrocytic）（cb/cc）濾胞性リンパ腫癌、びまん性大細胞B細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症（AILD）様T細胞リンパ腫、HIV関連体腔リンパ腫、胎児性癌、鼻咽喉の未分化癌（例えば、シュミンケ腫瘍）、カストルマン病、カポジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム大グロブリン血症および他のB-細胞リンパ腫を含む、CD19を発現する腫瘍細胞の存在を特徴とする障害を有する被験者を処置するために用いることができる。

30

【0200】

さらに、CD19の過剰発現は、B細胞寛容を喪失させ、自己免疫障害を発生させ得る（Teder et al. (2005) Curr Dir Autoimmun 8:55）。この自己免疫作用は、関節リウマチ患者の炎症関節におけるCD19+ B細胞の蓄積により確認された（He et al. (2001) J Rheumatol 28:2168）。従って、本発明のヒト抗体、抗体組成物および方法は、自己免疫障害、例えばCD19を発現するB細胞の存在により特徴付けられる障害、例えば関節リウマチを有する被験体の処置に使用され得る。

40

【0201】

一つの態様において、本発明の抗体（例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異的および二重特異的分子および組成物）は、CD19レベル、またはその膜表面にCD19を含む細胞

50

レベルを検出するために用いることができ、次にそのレベルを特定の疾患症状に結びつけることができる。または、抗体を用いてCD19機能を阻害または遮断することができ、次にこれを特定の疾患症状の予防または改善に結びつけて、それによって疾患のメディエーターとしてCD19を関係させることができる。これは、試料および対照試料を、抗体とCD19の複合体の形成を許容する条件で、抗CD19抗体に接触させることによって行うことができる。抗体とCD19とのあいだに形成された如何なる複合体も検出して、試料および対照において比較する。

【 0 2 0 2 】

もう一つの態様において、本発明の抗体（例えば、ヒト抗体、多重特異的および二重特異的分子および組成物）は最初に、インビトロでの治療または診断的使用に関連した結合活性について試験することができる。例えば、本発明の組成物は、以下の実施例において記述されるフローサイトメトリーアッセイ法を用いて試験することができる。

10

【 0 2 0 3 】

本発明の抗体（例えば、ヒト抗体、多重特異的および二重特異的分子、免疫複合体、および組成物）は、CD19関連疾患の治療および診断においてさらなる有用性を有する。例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異的または二重特異的分子および免疫複合体は、インビオまたはインビトロで以下の生物活性の一つまたは複数を誘発するためには用いることができる：CD19を発現する細胞の増殖を阻害するおよび／またはCD19を発現する細胞を殺す活性；ヒトエフェクター細胞の存在下でCD19を発現する細胞の貪食もしくはADCCを媒介する、またはCD19に対するCD19リガンド結合を遮断する活性。

20

【 0 2 0 4 】

特定の態様において、抗体（例えば、ヒト抗体、多重特異的および二重特異的分子および組成物）は、多様なCD19関連疾患を処置、予防、または診断するためにインビオで用いられる。CD19関連疾患の例には、中でも自己免疫疾患、関節免疫、癌、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、バーキットリンパ腫、未分化型大細胞リンパ腫（ALCL）、多発性骨髄腫、皮膚T-細胞リンパ腫、結節性小切れ込み核細胞型リンパ腫、リンパ球性リンパ腫、末梢性T-細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T-細胞白血病／リンパ腫（ATLL）、成人T細胞白血病（T-ALL）、エントロプラスティック／セントロサイト（cb/cc）濾胞性リンパ腫癌、びまん性大細胞B細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症（AILD）様T細胞リンパ腫、HIV関連体腔リンパ腫、胎児性癌、鼻咽喉の未分化癌（例えば、シュミンケ腫瘍）、カストルマン病、カボジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム大グロブリン血症、および他のB-細胞リンパ腫が含まれる。

30

【 0 2 0 5 】

本発明の抗体組成物（例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異的および二重特異的分子および免疫複合体）をインビオおよびインビトロで投与するためには適した経路は、当技術分野において周知であり、当業者によって選択される。例えば、抗体組成物は、注射（例えば、静脈内または皮下）によって投与することができる。用いられる分子の適した用量は、被験者の年齢および体重、ならびに抗体組成物の濃度および／または製剤に依存すると考えられる。

40

【 0 2 0 6 】

先に記述したように、本発明のヒト抗CD19抗体は、一つまたは複数の他の治療物質、例えば細胞障害物質、放射性障害物質、または免疫抑制剤と同時投与することができる。抗体は、物質に連結させることができ（免疫複合物として）、または物質とは別に投与することができる。後者の場合（別に投与）、抗体は、物質の前、後、もしくは同時に投与することができ、または他の公知の治療、例えば抗癌治療、例えば放射線療法と同時投与することができる。そのような治療物質には、中でも、それ自身、患者にとって毒性または亜毒性であるレベルに限って有効であるドキソルビシン（アドリアマイシン）、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムプシル、およびシクロホスファミド、ヒドロキシウレアのような抗新生物剤が含まれる。シスプラチンは、100 mg/用量を4週

50

間毎に1回静脈内投与し、アドリアマイシンは60～75 mg/ml用量を21日毎に静脈内投与する。本発明のヒト抗CD19抗体またはその抗原結合断片と化学療法剤とを同時投与することは、ヒト腫瘍細胞に対して細胞障害効果を生じる異なるメカニズムによって操作する二つの抗癌剤を提供する。そのような同時投与は、薬物に対する耐性の発生、またはそれらを抗体に非反応性にすると思われる腫瘍細胞の抗原性の変化による問題を解決することができる。

【0207】

標的特異的エフェクター細胞、例えば、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異的および二重特異的分子）に連結したエフェクター細胞も同様に、治療物質として用いることができる。ターゲティングのためのエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球、または単球のようなヒト白血球となりうる。他の細胞には、好酸球、ナチュラルキラー細胞、および他のIgGまたはIgA受容体を有する細胞が含まれる。所望の場合には、エフェクター細胞は、処置される被験者から得ることができる。標的特異的エフェクター細胞は、生理的に許容される溶液における細胞浮遊液として投与することができる。投与される細胞数は、 10^8 ～ 10^9 個のオーダーとなりうるが、これは治療目的に応じて変化すると思われる。一般的に、量は、標的細胞、例えばCD19を発現する腫瘍細胞での局在を得るために、および例えば貪食によって殺細胞を行うために十分であると思われる。投与経路も同様に変化しうる。

【0208】

標的特異的エフェクター細胞による治療は、標的細胞を除去するための他の技術と共に行うことができる。例えば、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異的および二重特異的分子）および/またはこれらの組成物を有するエフェクター細胞を用いる抗腫瘍治療を、化学療法と共に用いることができる。さらに、併用免疫療法は、異なる二つの細胞障害性エフェクター集団を腫瘍細胞の拒絶に向けるために用いてもよい。例えば、抗Fc RIまたは抗CD3に連結した抗CD19抗体を、IgGまたはIgA受容体特異的結合物質と共に用いてもよい。

【0209】

本発明の二重特異的および多重特異的分子はまた、細胞表面上での受容体のキャッピングおよび消失によるような、エフェクター細胞上のFc RまたはFc Rレベルを調節するために用いることができる。抗Fc受容体の混合物も同様に、この目的のために用いることができる。

【0210】

補体に結合するIgG1、-2、もしくは-3、またはIgMからの一部のような補体結合部位を有する本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異的および二重特異的分子および免疫複合体）も同様に、補体の存在下で用いることができる。一つの態様において、本発明の結合物質および適当なエフェクター細胞による標的細胞を含む細胞集団のエクスピボ処置は、補体または補体を含む血清を加えることによって補うことができる。本発明の結合物質をコーティングした標的細胞の貪食は、補体タンパク質の結合によって改善されうる。もう一つの態様において、本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異的および二重特異的分子）をコーティングした標的細胞はまた、補体によって溶解されうる。さらにもう一つの態様において、本発明の組成物は補体を活性化しない。

【0211】

本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体、多重特異的および二重特異的分子および免疫複合体）はまた、補体と共に投与することができる。特定の態様において、本開示は、ヒト抗体、多重特異的または二重特異的分子、および血清または補体を含む組成物を提供する。これらの組成物は、補体がヒト抗体、多重特異的、または二重特異的分子に対して非常に近位に存在する場合に有利でありうる。または、本発明のヒト抗体、多重特異的、または二重特異的分子および補体または血清は個別に投与することができる。

【0212】

10

20

30

40

50

本発明の抗体組成物（例えば、ヒト抗体、二重特異的、または多重特異的分子、または免疫複合体）および使用説明書を含むキットも同様に本発明の範囲に含まれる。キットはさらに、免疫抑制剤、細胞障害物質、または放射性障害物質、または本発明の一つもしくは複数のさらなるヒト抗体（例えば、CD19抗原において第一のヒト抗体とは異なるエピトープに結合する補体活性を有するヒト抗体）のような一つまたは複数のさらなる試薬を含みうる。

【0213】

したがって、本発明の抗体組成物によって処置した患者に、ヒト抗体の治療効果を増強または強化する細胞障害物質または放射性障害物質のようなもう一つの治療物質をさらに投与する（本発明のヒト抗体の前、同時、または後に）ことができる。

10

【0214】

他の態様において、被験者は、例えば被験者をサイトカインによって処置することによって、Fc またはFc 受容体の発現または活性を調節、例えば増強または阻害する物質によってさらに処置することができる。多重特異的分子による処置の際に投与するために好みしいサイトカインには、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、インターフェロン- α （IFN- α ）、および腫瘍壊死因子（TNF）が含まれる。

【0215】

本発明の組成物（例えば、ヒト抗体、多重特異的および二重特異的分子）はまた、例えばそのような細胞を標識するためにFc RまたはCD19を発現する細胞を標的とするために用いることができる。そのような用途に関して、結合物質を、検出されうる分子に連結することができる。このように、本発明は、Fc R、またはCD19のようなFc受容体を発現するエクスピボまたはインピトロ細胞を局在化するための方法を提供する。検出可能な標識は、例えば放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素共因子となりうる。

20

【0216】

特定の態様において、本発明は、試料および対照試料を、CD19に特異的に結合するヒトモノクローナル抗体、またはその抗原結合断片に、抗体またはその一部とCD19との複合体を形成させる条件で接触させる段階を含む、試料中のCD19抗原の存在を検出するための、またはCD19抗原の量を測定するため方法を提供する。次に、複合体の形成を検出して、対照試料と比較して試料のあいだで複合体の形成が異なれば、試料中にCD19抗原が存在することを示している。

30

【0217】

他の態様において、本発明は、先に記述したヒト抗体を被験者に投与することによって、被験者におけるCD19媒介障害、例えば、自己免疫疾患、関節リウマチ、癌、非ホジキンリンパ腫、急性リンパ球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、バーキットリンパ腫、未分化型大細胞リンパ腫（ALCL）、皮膚T-細胞リンパ腫、結節性小切れ込み核細胞型リンパ腫、リンパ球性リンパ腫、末梢性T-細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、T-細胞白血病／リンパ腫（ATLL）、成人T細胞白血病（T-ALL）、エントロプラスティック／セントロサイト（cb/cc）濾胞性リンパ腫癌、びまん性大細胞B細胞リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症（AILD）様T細胞リンパ腫、HIV関連体腔リンパ腫、胎児性癌、鼻咽喉の未分化癌（例えば、シュミンケ腫瘍）、カストルマン病、カポジ肉腫、多発性骨髄腫、ワルデンストレーム大グロブリン血症、および他のB-細胞リンパ腫を処置するための方法を提供する。そのような抗体およびその誘導体は、特定の障害に関連したCD 19誘導活性、例えば増殖および分化を阻害するために用いられる。抗体をCD19に接触させることによって（例えば、被験者に抗体を投与することによって）、CD19がそのような活性を誘導する能力が阻害され、このように、関連障害が処置される。抗体組成物は、単独で投与することができ、またはCD19媒介疾患を処置もしくは予防するために抗体組成物と共にもしくは相乗的に作用する細胞障害物質もしくは放射性障害物質のようなもう一つの治療物質と共に投与することができる。

40

【0218】

50

さらにもう一つの態様において、本発明の免疫複合体は、化合物（例えば、治療物質、標識、細胞毒素、放射性毒素、免疫抑制剤等）を抗体に連結させることによって、CD19細胞表面受容体を有する細胞に、そのような化合物をターゲティングするために用いることができる。例えば、抗CD19抗体を、米国特許第6,281,354号、米国特許第6,548,530号、米国特許出願公開第20030050331号、米国特許出願公開第20030064984号、米国特許出願公開第20030073852号、米国特許出願公開第20040087497号に記述され、または国際公開公報第03/022806号に公開される毒素化合物のいずれかに結合することができる。このように、本発明はまた、CD19を発現する細胞をエクスピボまたはインビボで局在化させる（例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素共因子のような検出可能な標識によって）ための方法を提供する。または、免疫複合体は、CD19に細胞毒素または放射性毒素をターゲティングすることによってCD19細胞表面受容体を有する細胞を殺すために用いることができる。10

【 0 2 1 9 】

本発明は、さらに制限的に解釈すべきではない以下の実施例によってさらに説明する。本出願を通して引用した全ての図面および全ての参考文献、特許、ならびに公表された特許出願の内容物は、特に参照として本明細書に組み入れられる。

【 0 2 2 0 】

実施例

実施例1：CD19に対するヒトモノクローナル抗体の作製

抗原

免疫の抗原として、B細胞腫瘍細胞Raji (ATCCアクセスション番号CCL-86) およびDaudi (ATCCアクセスション番号CCL-213) を使用した。20

【 0 2 2 1 】

トランスジェニックトランス導入染色体性KM- MOUSE (登録商標)

CD19に対する完全ヒトモノクローナル抗体は、ヒト抗体遺伝子を発現するKM系統のトランスジェニックトランス導入染色体性マウスを用いて作製した。このマウス系統は、Chen et al. (1993) EMBO J. 12: 811-820に記述されるように内因的なマウス 軽鎖遺伝子をホモ接合的に破壊され、HuMabマウスに関するPCT公報の国際公開公報01/09187号の実施例1に記載されるように内因的なマウス重鎖遺伝子がホモ接合的に破壊されている。このマウスは、Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851に記述されるようにヒト 軽鎖導入遺伝子KCo5を保有する。このマウスはまた、PCT公報の国際公開公報02/43478号に記述されるようにヒト重鎖導入染色体SC20を保有する。30

【 0 2 2 2 】

KM- MOUSE (登録商標) の免疫 :

CD19に対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製するために、RajiまたはDaudiのいずれかのB細胞腫瘍細胞株でKM- MOUSE (登録商標) 集団を免疫した。一般的な免疫スキームは、Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859 ; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851およびPCT公報の国際公開公報98/24884号に記述される。マウスは、最初の抗原注入時、6~16週齢であった。細胞調製物を用いてマウス (KM- MOUSE (登録商標)) を腹腔内 (IP) 免疫した。40

【 0 2 2 3 】

トランスジェニックマウスは、完全フロイントアジュバントまたはRibiアジュバント中の抗原を用いて二度IP免疫し、その後に不完全フロイントアジュバントまたはRibiアジュバント中の抗原を用いて3~21日間IP免疫（計11免疫まで）を行った。免疫反応は後眼窩採血により観察した。血漿をELISAにより（後述のようにして）スクリーニングし、十分な抗CD19ヒト免疫グロブリン価を有するマウスを融合に使用した。屠殺し脾臓を摘出する3日前にマウスに抗原で静脈内追加免疫を行った。

【 0 2 2 4 】

抗CD19抗体を産生するKM- MOUSE (登録商標) の選別0 :

CD19に結合する抗体を産生するKM- MOUSE (登録商標) を選別するために、Fishwild, D. 50

et al. (1996) (前出) によって最初に記述された改良型ELISAによって免疫マウス由來の血清を試験した。簡単に言うと、PBS中1~2 μg/mlの精製組み換えCD19融合タンパク質でマイクロタイタープレートをコーティングし、50 μl / ウェルを4で一晩インキュベートし、次いで5% BSAを含むPBS200 μl / ウェルでブロッキングした。CD19免疫マウス由來の血漿希釀物を各ウェルに加え、外界温度で1~2時間インキュベートした。そのプレートをPBS/Tweenで洗浄し、次いでアルカリホスファターゼ結合ヤギ抗ヒト 軽鎖ポリクローナル抗体と共に室温で1時間インキュベートした。洗浄後、そのプレートをpNPP基質で現像し、分光光度計を用いてOD415~650で分析した。最も高い抗CD19抗体価を示したマウスを融合に使用した。融合は後述のように行い、ELISAを用いて抗CD19活性についてハイブリドーマ上清を試験した。

10

【 0 2 2 5 】

CD19に対するヒトモノクローナル抗体を產生するハイブリドーマの作製：

KM-MOUSE (登録商標) から単離したマウス脾細胞は、標準的なプロトコルに基づきPEGを用いて、またはサイトパルス大型チャンバー細胞融合エレクトロポレーター (Cyto Pulse large chamber cell fusion electroporator) (Cyto Pulse Sciences, Inc., Glen Burnie, MD) を用いる電場型電気融合を用いて、PEGによりマウス骨髄腫細胞株に融合した。得られたハイブリドーマを抗原特異的抗体の產生に関してスクリーニングした。免疫したマウスからの脾臓リンパ球の単一細胞浮遊液を、50%PEG (Sigma) によって4分の1の数のSP2/0非分泌マウス骨髄腫細胞 (ATCC, CRL 1581) に融合させた。細胞を平底マイクロタイタープレートにおいて約1×10⁵個/ウェルで播種してDMEM (Mediatech, CRL 10013、高グルコース、L-グルタミン、およびピルビン酸ナトリウム) に5 mM HEPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50 mg/ml ゲンタマイシン、および1×HAT (Sigma, CRL P-7185) を加えたものにおいて10%ウシ胎児血清、10% P388D1 (ATCC, CRL TIB-63) 調整培地、3-5% origin (IGEN) を含む選択培地において約2週間インキュベートした。1~2週間後、HATをHTに交換した培地において細胞を培養した。個々のウェルを、ヒト抗CD19モノクローナルIgG抗体に関してELISA (上記) によってスクリーニングした。十分なハイブリドーマの増殖が起こった後、培地を通常10~14日後にモニターした。抗体を分泌するハイブリドーマを再播種して、再度スクリーニングし、ヒトIgGに関してなおも陽性であれば、抗CD19モノクローナル抗体を、限界希釈によって少なくとも2回サブクローニングした。安定なサブクローニングをインビトロで培養して、さらなる特徴付けのために組織培養培地において抗体の少量を產生させた。

20

【 0 2 2 6 】

HuMAbマウス (登録商標) より作製されたハイブリドーマクローン21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8をさらなる分析のために選択した。

30

【 0 2 2 7 】

実施例2：ヒトモノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8の構造の特徴付け

21D4および21D4aのモノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするcDNA配列を標準的なPCR技術を用いて21D4ハイブリドーマから獲得し、標準的なDNA配列決定技術を用いて配列決定を行った。21D4ハイブリドーマは、二つの軽鎖 (SEQ ID NO: 8および9) のうちの一方と対になった重鎖を有する抗体を產生することに留意されたい。両方の抗体 (すなわち、SEQ ID NO: 1および8のそれぞれV_H配列およびV_L配列を有する21D4、ならびにSEQ ID NO: 1および9のそれぞれV_H配列およびV_L配列を有する21D4a) はCD19に結合する。47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8モノクローナル抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードするcDNA配列は、標準的なPCR技術を用いてそれぞれ21D4、21D4a、47G4、27F3、3C10、5G7、13F1および46E8ハイブリドーマから獲得し、標準的なDNA配列決定技術を用いて配列決定を行った。

40

【 0 2 2 8 】

21D4の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図1Aに示し、それぞれSEQ ID NO: 59および1に示す。

50

【 0 2 2 9 】

21D4の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図1Bに示し、それぞれSEQ ID NO: 66および8に示す。

【 0 2 3 0 】

21D4重鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列の比較は、21D4重鎖がヒト生殖細胞系V_H5-51由来のV_Hセグメント、ヒト生殖細胞系3-10由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH4b由来のJ_Hセグメントを用いることを実証した。21D4 V_H配列と生殖細胞系V_H5-51配列のアラインメントを図8に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた21D4 V_H配列のさらなる分析は、図1Aおよび8ならびにそれぞれSEQ ID NO: 16、23および30に示されるような重鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。10

【 0 2 3 1 】

21D4軽鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列の比較は、21D4軽鎖がヒト生殖細胞系V_KL18由来のV_Lセグメントおよびヒト生殖細胞系JK2由来のJ_Kセグメントを用いることを実証した。21D4 V_L配列と生殖細胞系V_KL18配列のアラインメントを図15に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた21D4 V_L配列のさらなる分析は、図1Bおよび15ならびにそれぞれSEQ ID NO: 37、44および51に示されるような軽鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

【 0 2 3 2 】

21D4aの重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図1Aに示し、それぞれSEQ ID NO: 59および1に示す。20

【 0 2 3 3 】

21D4aの軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図1Cに示し、それぞれSEQ ID NO: 67および9に示す。

【 0 2 3 4 】

21D4a重鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列の比較は、21D4a重鎖がヒト生殖細胞系V_H5-51由来のV_Hセグメント、ヒト生殖細胞系3-10由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH4b由来のJ_Hセグメントを用いることを実証した。21D4a V_H配列と生殖細胞系V_H5-51配列のアラインメントを図8に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた21D4a V_H配列のさらなる分析は、図1Aおよび8ならびにそれぞれSEQ ID NO: 16、23および30に示されるような重鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。30

【 0 2 3 5 】

21D4a軽鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列の比較は、21D4a軽鎖がヒト生殖細胞系V_KL18由来のV_Lセグメントおよびヒト生殖細胞系JK3由来のJ_Kセグメントを用いることを実証した。21D4a V_L配列と生殖細胞系V_KL18配列のアラインメントを図16に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた21D4a V_L配列のさらなる分析は、図1Cおよび16ならびにそれぞれSEQ ID NO: 37、44および52に示されるような軽鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

【 0 2 3 6 】

47G4の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図2Aに示し、それぞれSEQ ID NO: 60および2に示す。40

【 0 2 3 7 】

47G4の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図2Bに示し、それぞれSEQ ID NO: 68および10に示す。

【 0 2 3 8 】

47G4重鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列の比較は、47G4重鎖がヒト生殖細胞系V_H1-69由来のV_Hセグメント、ヒト生殖細胞系6-19由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH5b由来のJ_Hセグメントを用いることを実証した。47G4 V_H配列と生殖細胞系V_H1-69配列のアラインメントを図9に示す。カバット系のCDR領域決50

定を用いた47G4 V_H 配列のさらなる分析は、図2Aおよび9ならびにそれぞれSEQ ID NO: 17、24および31に示されるような重鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

【0239】

47G4軽鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列の比較は、47G4軽鎖がヒト生殖細胞系 V_K A27由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系JK3由来のJKセグメントを用いることを実証した。47G4 V_L 配列と生殖細胞系 V_K A27配列のアラインメントを図17に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた47G4 V_L 配列のさらなる分析は、図2Bおよび17ならびにそれぞれSEQ ID NO: 38、45および53に示されるような軽鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

10

【0240】

27F3の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図3Aに示し、それぞれSEQ ID NO: 61および3に示す。

【0241】

27F3の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図3Bに示し、それぞれSEQ ID NO: 69および11に示す。

【0242】

27F3重鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列の比較は、27F3重鎖がヒト生殖細胞系 V_H 5-51由来の V_H セグメント、ヒト生殖細胞系6-19由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH6b由来のJ $_H$ セグメントを用いることを実証した。27F3 V_H 配列と生殖細胞系 V_H 5-51配列のアラインメントを図10に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた27F3 V_H 配列のさらなる分析は、図3Aおよび10ならびにそれぞれSEQ ID NO: 18、25および32に示されるような重鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

20

【0243】

27F3軽鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列の比較は、27F3軽鎖がヒト生殖細胞系 V_K L18由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系JK2由来のJ $_K$ セグメントを用いることを実証した。27F3 V_L 配列と生殖細胞系 V_K L18配列のアラインメントを図18に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた27F3 V_L 配列のさらなる分析は、図3Bおよび18ならびにそれぞれSEQ ID NO: 39、46および54に示されるような軽鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

30

【0244】

3C10の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図4Aに示し、それぞれSEQ ID NO: 62および4に示す。

【0245】

3C10の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図4Bに示し、それぞれSEQ ID NO: 70および12に示す。

【0246】

3C10重鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列の比較は、3C10重鎖がヒト生殖細胞系 V_H 1-69由来の V_H セグメント、ヒト生殖細胞系1-26由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH6b由来のJ $_H$ セグメントを用いることを実証した。3C10 V_H 配列と生殖細胞系 V_H 1-69配列のアラインメントを図11に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた3C10 V_H 配列のさらなる分析は、図4Aおよび11ならびにそれぞれSEQ ID NO: 19、26および33に示されるような重鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

40

【0247】

3C10軽鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列の比較は、3C10軽鎖がヒト生殖細胞系 V_K L15由来の V_L セグメントおよびヒト生殖細胞系JK2由来のJKセグメントを用いることを実証した。3C10 V_L 配列と生殖細胞系 V_K L15配列のアラインメントを図19に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた3C10 V_L 配列のさらなる分析は、図4B

50

および19ならびにそれぞれSEQ ID NO: 40、47および55に示されるような軽鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

【0248】

5G7の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図5Aに示し、それぞれSEQ ID NO: 63および5に示す。

【0249】

5G7の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図5Bに示し、それぞれSEQ ID NO: 71および13に示す。

【0250】

5G7重鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列の比較は
、5G7重鎖がヒト生殖細胞系V_H5-51由来のV_Hセグメント、ヒト生殖細胞系3-10由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH6b由来のJ_Hセグメントを用いることを実証した。5G7 V_H配列と生殖細胞系V_H5-51配列のアラインメントを図12に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた5G7 V_H配列のさらなる分析は、図5Aおよび12ならびにそれぞれSEQ ID NO: 20、27および34に示されるような重鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。
。

10

【0251】

5G7軽鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列の比較は
、5G7軽鎖がヒト生殖細胞系V_KL18由来のV_Lセグメントおよびヒト生殖細胞系JK1由来のJ_Kセグメントを用いることを実証した。5G7 V_L配列と生殖細胞系V_KL18配列のアラインメントを図20に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた5G7 V_L配列のさらなる分析は、図5Bおよび20ならびにそれぞれSEQ ID NO: 41、48および56に示されるような軽鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

20

【0252】

13F1の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図6Aに示し、それぞれSEQ ID NO: 64および6に示す。

【0253】

13F1の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図6Bに示し、それぞれSEQ ID NO: 72および14に示す。

【0254】

30

13F1重鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列の比較は
、13F1重鎖がヒト生殖細胞系V_H5-51由来のV_Hセグメント、ヒト生殖細胞系6-19由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH6b由来のJ_Hセグメントを用いることを実証した。13F1 V_H配列と生殖細胞系V_H5-51配列のアラインメントを図13に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた13F1 V_H配列のさらなる分析は、図6Aおよび13ならびにそれぞれSEQ ID NO: 21、28および35に示されるような重鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

【0255】

13F1軽鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列の比較は
、13F1軽鎖がヒト生殖細胞系V_KL18由来のV_Lセグメントおよびヒト生殖細胞系JK2由来のJ_Kセグメントを用いることを実証した。13F1 V_L配列と生殖細胞系V_KL18配列のアラインメントを図21に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた13F1 V_L配列のさらなる分析は、図6Bおよび21ならびにそれぞれSEQ ID NO: 42、49および57に示されるような軽鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

40

【0256】

46E8の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図7Aに示し、それぞれSEQ ID NO: 65および7に示す。

【0257】

46E8の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を図7Bに示し、それぞれSEQ ID NO: 73および15に示す。

50

【0258】

46E8重鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン重鎖配列の比較は、46E8重鎖がヒト生殖細胞系V_H5-51由来のV_Hセグメント、ヒト生殖細胞系6-19由来のDセグメント、およびヒト生殖細胞系JH6b由来のJ_Hセグメントを用いることを実証した。46E8 V_H配列と生殖細胞系V_H5-51配列のアラインメントを図14に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた46E8 V_H配列のさらなる分析は、図7Aおよび14ならびにそれぞれSEQ ID NO: 22、29および36に示されるような重鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

【0259】

46E8軽鎖免疫グロブリン配列と公知のヒト生殖細胞系免疫グロブリン軽鎖配列の比較は、46E8軽鎖がヒト生殖細胞系V_KL18由来のV_Lセグメントおよびヒト生殖細胞系JK2由来のJ_Kセグメントを用いることを実証した。46E8 V_L配列と生殖細胞系V_KL18配列のアラインメントを図22に示す。カバット系のCDR領域決定を用いた46E8 V_L配列のさらなる分析は、図7Bおよび22ならびにそれぞれSEQ ID NO: 43、50および58に示されるような軽鎖のCDR1領域、CDR2領域およびCD3領域の描写につながった。

【0260】

実施例3：抗CD19ヒトモノクローナル抗体の結合特異性および結合速度論の特徴付け

本実施例において、抗CD19抗体21D4および47G4の結合特異性をELISA分析によって試験した。

【0261】

ELISAによる結合特異性

マイクロタイパープレートを、PBS中1.0 μg/mlの精製全長CD19-Fc融合タンパク質50 μlでコーティングし、次いでPBS中1%のウシ血清アルブミン150 μlでプロッキングした。このプレートを30分～1時間インキュベートし、3回洗浄した。HuMAb抗CD19抗体47G4の希釈物を各ウェルに加え、37 °Cで1時間インキュベートした。公知のマウス抗CD19抗体を陽性対照として使用した。プレートをPBS/Tweenで洗浄し、次いで西洋ワサビペルオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG 特異的二次試薬と共に37 °Cで1時間インキュベートした。洗浄後、プレートをABTS基質 (1.46mMol/L) で現像し、OD 490nmで分析した。その結果を図23に示す。CD19 HuMAb 47G4はヒトCD19ペプチドに特異的に結合した。

【0262】

抗CD19抗体のエピトープマッピング

フローサイトメトリーを用いて抗CD19 HuMAbのエピトープ分類を決定した。抗CD19ヒトモノクローナル抗体21D4、21D4a、3C10、5G7、5G7-N19K、5G7-N19Qおよび13F1のエピトープへの結合は、0.3 μg/mlのビオチン化21D4または21D4a抗CD19ヒトモノクローナル抗体のいずれかと共にRaji B腫瘍細胞をインキュベートし、洗浄した後に非放射性抗CD19ヒトモノクローナル抗体を加えることによって評価した。アイソタイプ対照抗体は陰性対照として使用した。結合は、FITC標識抗ヒトIgG Abを用いて検出した。フローサイトメトリー分析は、FACScanフローサイトメトリー (Becton Dickinson, San Jose, CA) を用いて行った。その結果を図24に示す。このデータを分析する限り、抗CD19抗体21D4、21D4a、3C10、5G7および13F1は、同じエピトープ領域について競合する。

【0263】

実施例4：B細胞由来腫瘍細胞株に対するCD19抗体の結合

CD19 HuMAbのB細胞腫瘍株RajiおよびDaudiへの結合、またはCHO-CD19トランスフェクト細胞株への結合をフローサイトメトリーにより評価した。CD19の膜貫通型をコードする全長cDNAを含む発現プラスミドでCHO細胞をトランスフェクトした。Raji細胞株、Daudi細胞株およびCD19-CHO細胞株を次のCD19 HuMAb、21D4、21D4a、47G4、5G7、5G7-N19K、5G7-N19Q、3C10または13F1のうちの一つと共にインキュベートした。公知のマウス抗CD19抗体を陽性対照として用いた。細胞を洗浄し、フィコエリトリン標識した抗ヒトまたは抗マウスのいずれかの二次抗体によって検出し、フローサイトメトリーにより分析した。CHO-CD19細胞株、Daudi B細胞株、Raji B細胞株に対する結合およびRaji B細胞株に対する拡大版

10

20

30

40

50

の結合実験の結果を、それぞれ図25A、25B、25Cおよび25Dに示す。ヒト抗CD19モノクローナル抗体21D4および47G4は、CHO-CD19細胞株に結合した。ヒト抗CD19モノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、5G7、5G7-N19K、5G7-N19Q、3C10および13F1は、Raji B細胞株に結合した。抗CD HuMAb抗体21D4、21D4a、3C10、5G7、5G7-N19K、5G7-N19Qおよび13F1のEC₅₀値は、それぞれ、0.1413、0.1293、0.2399、0.1878、0.2240、0.2167および0.2659と算出された。47G4はまた、Daudi B腫瘍細胞株への結合も示した。全ての結果は、染色の幾何平均蛍光強度 (GMFI) により測定されたものを示す。これらのデータは、CD19タンパク質がB細胞由来の腫瘍細胞株の表面上に発現されること、および抗CD19HuMAb抗体21D4、21D4a、47G4、5G7、5G7-N19K、5G7-N19Q、3C10および13F1が細胞表面に発現されたCD19に結合することを示す。

10

【0264】

実施例5：Raji B腫瘍細胞に対する抗CD19ヒト抗体21D4および47G4のスキヤッチャード結合分析

Raji細胞はATCC (ATCCアクセッション番号CCL-86) から入手し、10%ウシ胎仔血清 (FBS) を含有するRPMI中で培養した。10% FBSを含有する4%のRPMIを用いて細胞を二度洗浄し、10%ウシ胎仔血清を含有するRPMI培地中 4×10^7 細胞/mlとなるよう調整した (24mM Tris pH7.2、137mM NaCl、2.7mM KCl、2mMグルコース、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1% BSAを含有する結合緩衝液)。ミリポアプレート (MAFB NOB) を水中1%の脱脂乳でコーティングし、これを4℃で一晩保存した。このプレートを結合緩衝液で洗浄し、非標識抗体 (1000倍過剰) を含有する結合緩衝液25μlをミリポア96ウェルガラス纖維フィルタープレートの対照ウェルに加えた (非特異的結合NSB)。最大結合対照のウェルには25マイクロリットルの緩衝液のみを加えた (総結合)。25μlの異なる濃度の¹²⁵I-抗CD19抗体21D4または47G4および25μlのRaji細胞 (4×10^7 細胞/ml) を含む結合緩衝液を加えた。このプレートをシェーカー (200 RPM) 上、4℃で2時間インキュベートした。インキュベーションが完了したら、ミリポアプレートを0.2mlの冷洗浄緩衝液 (24mM Tris pH7.2、500mM NaCl、2.7mM KCl、2mMグルコース、1mM CaCl₂、1mM MgCl₂、0.1% BSA) で三回洗浄した。フィルターを取り除き、ガンマカウンターで計数した。結合平衡の評価は、プリズムソフトウェア (San Diego, CA) により、単一部位の結合パラメータを用いて行った。上記のスキヤッチャード結合アッセイ法による、Raji細胞に対する抗体のK_Dは、21D4についてはおよそ2.14nM、47G4については12.02nMであった。

20

【0265】

実施例6：抗CD19モノクローナル抗体の内部移行

CD19を発現するRaji B腫瘍細胞またはCD19をトランスフェクトしたヒトCHO細胞への内部移行の能力について、Hum-Zap内部移行アッセイ法を用いて抗CD19 HuMAbを試験した。Hum-Zapは、毒素サポリンに結合されたヒトIgGに対する親和性を有する二次抗体の結合を通じて一次ヒト抗体の内部移行を試験する。

30

【0266】

CHO-CD19細胞株またはRaji B腫瘍細胞株を100μlウェルに 1.0×10^4 細胞 / ウェルとなるよう一晩または翌日二時間播種した。抗CD19抗体21D4または47G4のいずれかを開始濃度30nMでウェルに加え、1:3連続希釈となるよう滴定を行った。CD19に非特異的なヒトアイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。Hum-Zap (Advanced Targeting Systems, IT-22-25) を11nMの濃度で加えてプレートを48時間インキュベートした。次いでこのプレートを、1.0μCiの³H-チミジンで18~24時間パルスし、収集し、トップカウントシンチレーションカウンター (Packard Instruments) で読み取った。CHO-CD19およびB腫瘍細胞における内部移行の結果を、それぞれ図26Aおよび26Bに示す。CHO-CD19およびB腫瘍細胞においてHuMAb 47G4のみを試験した。抗CD19抗体47G4は、CHO-CD19細胞において³H-チミジン取り込みの抗体濃度依存的な減少を示した。21D4および47G4の両方のHuMAbは、Raji B腫瘍細胞における³H-チミジン取り込みの抗体濃度依存的な減少を示した。このデータは、抗CD19抗体21D4および47G4が、CD19を発現するCHO-CD19トランスフェクト細胞およびB腫瘍細胞に内部移行することを実証する。

40

50

【0267】

実施例7：毒素結合抗CD19抗体の細胞殺傷力の評価

本実施例において、チミジン取り込みアッセイ法においてCD19+細胞株を死滅させる能力について、毒素に結合させた抗CD19モノクローナル抗体を試験した。

【0268】

抗CD19モノクローナル抗体は、リンカー、例えばペプチジルリンカー、ヒドラゾンリンカーやジスルフィドリンカーやを介して毒素に結合させた。CD19+を発現するRaji細胞株を、 2.5×10^4 細胞/ウェルとなるよう3時間播いた。抗CD19抗体-毒素複合体を開始濃度30nMでウェルに加え、1:3連続希釈となるよう滴定を行った。CD19に非特異的なアイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。10倍過剰の非放射性抗体、21D4またはアイソタイプ対照抗体のいずれかを結合の競合に使用した。プレートを69時間インキュベートした。次いでこのプレートを、 $1.0 \mu\text{Ci}$ の ^3H -チミジンで24時間パルスし、収集し、トップカウントシンチレーションカウンター (Packard Instruments, Meriden, CT) で読み取った。結果をそのEC50値と合わせて図27に示す。このデータは抗CD19抗体21D4がRaji B細胞腫瘍細胞を死滅させることを実証する。10

【0269】

実施例8：抗CD19抗体を用いたインビボB細胞腫瘍の処置

本実施例において、癌性のB細胞腫瘍を移植したSCIDマウスをインビボで未修飾 (naked) の抗CD19抗体または毒素結合抗CD19抗体のいずれかで処置し、腫瘍の増殖に対する抗体のインビボ効果を試験した。20

【0270】

毒素結合抗CD19抗体は上記の通り調製した。機能的なBリンパ球およびTリンパ球を欠く重症複合免疫不全症 (SCID) マウスをB細胞悪性腫瘍の研究に使用した。Ramos B腫瘍細胞株由来の細胞を静脈内注射した。このマウスを 19.6mg/kg の毒素結合抗CD19抗体または 30mg/kg の未修飾の抗CD19抗体のいずれかで処置した。アイソタイプ対照抗体または製剤化緩衝液を陰性対照として用いた。この動物に、抗体または賦形剤を含有するおよそ $200 \mu\text{l}$ のPBSを腹腔内注射によって投与した。抗体-毒素複合体は一回投与として第7日に注射し、未修飾の抗体は一回投与として予防モデルについては第1日に、または処置モデルについては第7日、第14日および第21日にのいずれかの注射を行った。このマウスをおよそ6週間の間、後ろ足の麻痺について毎日観察した。電子カリパスを用いて、腫瘍を三次元的に測定し (高さ × 幅 × 長さ) 、腫瘍の容積を算出した。後ろ足の麻痺が生じた場合、マウスを安樂死させた。30

【0271】

カプラン・マイヤー分析 (図28) により実証されるように、毒素結合抗CD19抗体、予防的に投与した未修飾の抗CD19抗体または処置的措置として投与した抗CD19抗体による処置によって平均生存時間が増加した。示された平均生存時間の中で最大の増加は、未修飾の抗CD19抗体を用いた予防的処置によるものであった。

【0272】

体重の変化もまた測定し、体重のパーセント変化として算出した。このデータを図29に示す。30日間通してみると、一つの毒素結合抗体により体重が純増変化し、抗体および毒素 (複合体でない) により体重が純減変化した。予防的な未修飾抗CD19抗体による措置または抗CD19抗体の処置的措置のいずれかにより、体重が純増変化した。40

【0273】

実施例9：未修飾の抗CD19抗体を用いたインビボ腫瘍異種移植モデルの処置

リンパ腫腫瘍を移植したマウスを未修飾の抗CD19抗体によってインビボで処置し、腫瘍の増殖に対する抗体のインビボ効果を試験した。

【0274】

ARH-77 (ヒトBリンパ芽球性白血病; ATCCアクセス番号CRL-1621) 細胞およびRaji (ヒトBリンパ球性バーキットリンパ腫; ATCCアクセス番号CCL-86) 細胞を、標準的な実験手順を用いてインビトロで拡大培養した。6~8週齢の雄性CB17.SCIDマウス (Tac

onic, Hudson, NY) の右側の皮下に、マウス1匹あたり0.2mlのPBS/Matrigel (1:1) 中5 × 10⁶のARH-77細胞またはRaji細胞を移植した。移植後毎週二回、マウスの体重を測定し電子カリパスを用いて腫瘍を三次元的に測定した。腫瘍の容積は、高さ × 幅 × 長さ / 2として算出した。平均80mm³のARH-77腫瘍または平均170mm³のRaji腫瘍を有するマウスを無作為に処置グループに加えた。第0日にこれらのマウスにPBS賦形剤、アイソタイプ対照抗体または未修飾の抗CD19 HuMAb 2H5を腹腔内に投与した。腫瘍が腫瘍エンドポイント (2000mm³) に達した場合、そのマウスを安樂死させた。結果を図30A (ARH-77腫瘍) および30B (Raji腫瘍) に示す。未修飾の抗CD19抗体21D4は、腫瘍エンドポイントの容積 (2000mm³) に達するまでの平均時間を延長し、腫瘍の増殖の進行を遅らせた。従って、抗CD19抗体の単独処置は、腫瘍の増殖に対して直接的なインビオ阻害効果を有する。

10

【0275】

実施例10：非フコシル化HuMAbの作製

抗体のフコシル残基の量を減少させると、その抗体のADCC能力を増加させることが実証されている。本実施例においては、フコシル残基を欠く抗CD19 HuMAb 21D4を作製した。

【0276】

抗体21D4の重鎖および軽鎖を発現するベクターを用いてフコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8を欠くCHO細胞株Ms704-PF (Biowa, Inc., Princeton, NJ) を電気穿孔した。6mM L-グルタミンおよび500 μg/ml G418 (Invitrogen, Carlsbad, CA) を含有するEx-Cell 325-PF CHO培地 (JRH Biosciences, Lenexa, KS) 中で培養することにより薬物耐性クローリングを選択した。標準的なELISA法によってクローリングをIgGの発現についてスクリーニングした。

20

【0277】

CE-LIFによるMAbのオリゴ糖の特徴付け

CHOフコシル化細胞株由来の抗CD19抗体由来のN結合型オリゴ糖とMs704-PF由来の抗CD19モノクローナル抗体試料の比較分析は、キャピラリー電気泳動レーザー誘起蛍光法 (cLIF) (Chen and Evangelista (1998) Electrophoresis 15:1892) によって行った。精製した抗体のN結合型オリゴ糖は、試料を12.5mU PNGaseF (Prozyme) と共に40 °Cで一晩インキュベートすることによってIgG試料 (100 μg) から遊離させた。使用した条件の下で、CHOフコシル化細胞および非フコシル化細胞において発現されたHuMAb 21D4のFc部分からN結合型グリカンが遊離した。エタノール沈殿によりMAbタンパク質を除去した後、グリカンを含有する上清を減圧遠心分離によって乾燥し、フコース残基の脱シアル化および損失を最小限に抑える穏やかな還元的アミノ化条件 (THF中15%酢酸および1Mシアノ水素化ホウ素ナトリウム (Sigma)) 下で19mM 8-アミノピレン-1,3,6-トリスルホネート (APTS) (Bectman) に再懸濁させた。グリカン標識反応を40 °Cで一晩継続し、その後に試料を水で25倍希釈した。APTS標識グリカンを、50cmの有効長を有する50 μm内径のN-CHOコートキャピラリー (Beckman) を用いる、逆極性下でのP/ACE MDQ CEシステム (Beckman) によるレーザー誘起蛍光検出キャピラリー電気泳動に供した。試料は圧力 (8秒間) 注射し、分離は糖分離ゲルバッファー (Carbohydrate Separation Gel Buffer) (Beckman) を用い、20 °C、25kVで20分間行った。分離は、3mWアルゴンイオンレーザーならびに励起波長488nmおよび発光波長520nmのレーザー誘起蛍光検出システム (Beckman) を用いて観察した (Ma and Nashabeh (1999) Anal. Chem. 71:5185)。オリゴ糖プロフィールの相違を、フコシル化細胞株由来の抗体とMs704-PF細胞株由来の抗体の間で観察した。この相違は、Ms704-PF由来の抗CD19抗体におけるフコース残基の非存在と一致した。

30

【0278】

HPAE-PADを用いるHPLCによる单糖分析

IgG試料 (200 μg) を、2N TFA (中性糖を予想した場合) または6N HCl (アミノ糖を予想した場合) のいずれかを用いて40 °Cで4時間、酸加水分解に供した。試料を外界温度下での減圧遠心分離によって乾燥させ、HPAE-PAD (Dionex) による分析の前に200 μlの水で再構成した。プレカラムであるアミノトラップおよびボレートトラップ (Dionex) と共にCarboPac PA10 4 × 250mmカラムを用いて单糖を分離した。手順はダイオネクス・テクニカ

40

50

ルノート53に従った。単糖のピーク種別および相対存在量は、単糖標準(Dionex)を用いて決定した。

【0279】

非フコシル化抗CD19 21D4抗体はまた、標準的なキャピラリー等電点電気泳動キットアッセイ法(Beckman Coulter)を用いて試験した。このアッセイ法から、フコシル化21D4抗体についてはpH8.45、フコシル化21D4a抗体についてはpH8.44および8.21、ならびに非フコシル化21D4抗体についてはpH8.52および8.30のpI値を観察した。

【0280】

実施例11：抗CD19抗体のADCC活性の評価

本実施例においては、蛍光細胞傷害アッセイ法において、抗体依存的な細胞傷害性(ADCC)を介してエフェクター細胞の存在下でCD19+細胞を死滅させる能力について、フコシル化および非フコシル化抗CD19モノクローナル抗体を試験した。

【0281】

非フコシル化ヒト抗CD19モノクローナル抗体21D4は、上記の通り調製した。ヒトエフェクター細胞は、以下のように全血から調製した。ヒト末梢血単核球を標準的なフィコールパック(Ficoll-paque)分離によってヘパリン添加全血から精製した。これらの細胞を10%FBS(培地)および200U/mlのヒトIL-2を含有するRPMI1640培地に再懸濁し、37℃で一晩インキュベートした。次の日に細胞を収集し、培地で一度洗浄し、再懸濁して 2×10^7 細胞/mlとした。標的CD19+細胞をBATDA試薬(Perkin Elmer, Wellesley, MA)と共に(2.5mMプロベネシド補充培地(アッセイ培地)中 1×10^6 標的細胞/mLあたり2.5μlのBATDA)37

で20分間インキュベートした。標的細胞を、20mM HEPESおよび2.5mMプロベネシドを含有するPBSで4回洗浄し、スピンドラウンし、最終量をアッセイ培地中 1×10^5 細胞/mlとした。

【0282】

以下のようなDelfia蛍光発光分析を用いて、フコシル化および非フコシル化ヒト抗CD19モノクローナル抗体21D4に対する抗体特異的ADCCについて、CD19+細胞株ARH-77(ヒトBリンパ球性白血病; ATCCアクセッション番号CRL-1621)を試験した。標的細胞株ARH77(100μlの標識した標的細胞)を、50μlのエフェクター細胞および50μlの21D4抗体または非フコシル化21D4抗体のいずれかと共にインキュベートした。この実験を通して、1:50の標的:エフェクター比を使用した。ヒトIgG1アイソタイプ対照を陰性対照として用いた。2100rpmのパルススピンおよび37℃で1時間のインキュベーションの後、上清を収集し、再度素早くスピンし、20μlの上清を平底プレートに移し、このプレートに180μlのEu溶液(Perkin Elmer, Wellesley, MA)を加えてフュージョンアルファTRFプレートリーダー(Perkin Elmer)で読み取った。その%溶解は次式から算出した：(試料放出-自然放出*100)/(最大放出-自然放出)。式中、自然放出は標的細胞のみを含むウェルからの蛍光であり、最大放出は標的細胞を含みかつ3%リゾール(Lysol)で処理したウェルからの蛍光である。ARH-77細胞株についての細胞傷害活性%特異的溶解を図31に示す。CD19+発現細胞株ARH-77は、HuMAb抗CD19抗体21D4による抗体媒介性の細胞傷害活性および抗CD19抗体21D4の非フコシル化形態に関連する特異的溶解の割合の増加を示した。このデータは、非フコシル化HuMAb抗CD19抗体がCD19+発現細胞に対して増加した特異的細胞傷害活性を示すことを実証する。

【0283】

実施例12：示差走査熱量測定による抗CD19モノクローナル抗体の熱安定性

抗CD19モノクローナル抗体の熱安定性を、それらの融解温度の熱量分析を用いて比較した。

【0284】

融解温度の熱量測定(登録商標)は、自動サンプラーと接続されたVP-キャピラリーDSC示差走査マイクロ熱量計プラットホーム(MicroCal LLC, Northampton, MA, USA)を用いて行った。試料細胞量は0.144mLである。抗体のグリコシル化形態および脱グリコシル化形態に関する変性データは、2.3μMの濃度の試料を30~95℃の間、1/分の速度で加熱

10

20

30

40

50

することによって獲得した。タンパク質試料は、pH7.4のリン酸緩衝生理学的食塩水 (PBS) 中に入れた。同じ緩衝液を基準細胞において使用し、比較によってモル熱容量を得た。観察されたサーモグラムを基準線補正し、ソフトウェアOrigin v.7.0を用いて2状態モデルに基づき正規化したデータを分析した。このデータを表2に示す。

【0285】

(表2) 抗CD19抗体の熱安定性の測定

クローン	熱安定性 T_m 1 (°C)
21D4	68.7
21D4a	69.7
5G7	68.5
5G7 IgG4	67.4
13F1 IgG4	68.4
46E8	66.4
47G4	67.2

10

【0286】

実施例13：グリコシル化部位の評価

HuMAb抗CD19抗体5G7は、配列分析によりその可変領域にN-X-S/Tグリコシル化モチーフを有することが見出された。N結合型配列部位 (N-X-S/T) の存在は、MAbへの糖類の付加に必要であるが十分ではない。すなわち、タンパク質のフォールディングおよび溶媒露出度 (accessibility) により実際には糖類を付加しないN-X-S/T配列を有する可能性がある。5G7の可変領域におけるグリコシル化部位の確認は、LC-MSおよびウェスタン分析の両方によって試験した。

20

【0287】

液体クロマトグラフィ-質量分析法 (LC-MS) は、タンパク質、例えば抗体の質量を決定するための標準的なツールである。抗CD19 HuMAb 5G7および13F1のN結合型オリゴ糖は、分析の前に、試料を12.5mU PNGaseF (Prozyme) と共に40℃で一晩インキュベートすることによってIgG試料 (100 μg) から遊離させた。使用した条件下で、N結合型グリカンはHuMAbのFc部分から遊離した。クローン5G7について、本発明者らは高存在量の二つの質量を観察し；一つの質量 (49,855Da) は定常領域の保存されたN結合部位 (N297) における糖をPNGaseF消化によって除去した後の推定質量に相当し、第二の質量 (52,093Da) は二番目の部位に糖類が付加したものに相当する。本発明者らは、Fab領域のグリカンがPNGaseF消化によって除去されることを見出し；従って、このデータは、クローン5G7の可変領域に糖類が存在することを支持する。クローン13F1について、観察された質量は糖類が付加しないタンパク質配列の推定質量に一致した。

30

【0288】

上記の結果を確認するために、本発明者らは、糖類特異的染色法を用いてクローン5G7および13F1のFab断片に対するウェスタンプロットアッセイ法を行った。Fab断片およびFc断片は、1mMシスティンを含有する25 μgのIgG試料に1.25 μgの活性化パパインを加えることによって得た。試料を40℃で4時間インキュベートし、その反応を30mMヨードアセトアミドで停止した。試料は、4~20%Tris-グリシンSDS-PAGEおよびその後のPVDF膜への電気プロットによって分析した。このプロットの糖類特異的染色は、製造元により指示されたプロトコルに従ってゲルコード糖タンパク質染色キット (Gel Code Glycoprotein Staining Kit) (Pierce) を用いて行った。結果は、5G7抗体におけるFabのグリコシル化を検出したが、13F1抗体においては検出されなかった。これらの結果は、5G7抗体がFab領域においてグリコシル化されることを示した。

40

【0289】

上述のように、抗CD19モノクローナル抗体5G7は、グリコシル化部位を有する可変領域を含む。可変領域のグリコシル化部位は、抗体の免疫原性を増加させ、抗原結合を変化させることによりpK値を変化させ得るので、可変領域のN-X-S/Tグリコシル化モチーフ配列を変異させてグリコシル化を減少させることが有利であり得る。標準的な分子生物学技術

50

を用いて、19位から始まるN-I-S配列をK-I-S(5G7-N19K)またはQ-I-S(5G7-N19Q)のいずれかに変更するよう5G7抗体配列を修飾した。

【0290】

実施例14：蛍光分光法による抗CD19モノクローナル抗体の安定性

抗CD19モノクローナル抗体の安定性は、蛍光分光法により化学変性の中間点を測定することによって比較した。

【0291】

化学変性の蛍光測定は、マイクロマックス(Micromax)プレートリーダー付きSPEX Fluorolog 3.22(SPEX, Edison, NJ)を用いて実施した。測定は、16の異なる濃度の塩酸グアニジニウムを含有するPBS緩衝液中で平衡状態になるよう24時間静置した抗体試料を用いて実施した。測定は、黒色、低容量、非結合表面の384ウェルプレート(Corning, Acton, MA)において行い、12μLのウェル容量に2μMの抗体が必要であった。蛍光は280nmで励起させ、発光スペクトルは300~400nmで測定した。スキャン速度は1秒/nmであり、スリットを5nm帯域に設定した。緩衝液プランクはPBSを用いて行い、データから自動的に差し引いた。そのデータを表3に示す。

【0292】

(表3) 抗CD19抗体の蛍光安定性

クローン	アンフォールディング 中間点(M)	凝集ピーク(M)
21D4	3.01	
21D4a	2.97	
5G7	2.91	
5G7 IgG4	2.63	
27F3	2.77	
13F1 IgG4	2.58	2.29
46E8	2.43	2.16
47G4	1.68	

【0293】

実施例15：抗CD19抗体を用いるインビボB細胞Raji腫瘍の処置

本実施例において、癌性B細胞腫瘍を移植したSCIDマウスを未修飾の抗CD19抗体または毒素結合抗CD19抗体のいずれかを用いてインビボで処置し、腫瘍の増殖の対する抗体のインビボ効果を試験した。

【0294】

毒素結合抗CD19抗体は上記の通り調製した。機能的なBリンパ球およびTリンパ球を欠く重症複合免疫不全症(SCID)マウスをB細胞悪性腫瘍の研究に使用した。Raji B腫瘍細胞株由来の細胞を皮下注射した。このマウスを30mg/kgの抗体または0.3μモル/kg(毒素)の抗体-毒素複合体で処置した。アイソタイプ对照抗体または製剤化緩衝液を陰性対照として用いた。この動物に、抗体または賦形剤を含有するおよそ200μlのPBSを腹腔内注射によって投与した。抗体は一回投与(SD)として第0日に注射するかまたは反復投与(RD)として第0日、第7日および第14日に注射するかのいずれかであった。このマウスを腫瘍の増殖について電子カリパスを用いて毎日観察し；腫瘍を三次元的に測定し(高さ×幅×長さ/2)、腫瘍の容積を算出した。腫瘍が腫瘍エンドポイント(2000mm³)に達するかまたは20%超の体重減少を示した場合、マウスを安楽死させた。結果を図32に示す。各々の場合、抗CD19抗体は陰性対照と比較してより小さい腫瘍容積を示し、毒素結合抗体は未修飾抗体による処置よりも小さい腫瘍容積を示した。

【0295】

体重の変化もまた測定し、体重の%変化として算出した。その結果を図33に示す。結果は、毒素結合抗体を用いた場合体重が純減変化し、賦形剤または未修飾抗体のいずれかを用いた場合純増することを示した。

【0296】

10

20

30

40

50

実施例16：カニクイザルにおけるB細胞研究

本実施例において、親の抗CD19抗体または非フコシル化 (nf) 抗CD19抗体のいずれかをカニクイザルに静脈内注射した。白血球の絶対計数および白血球の部分集合を投与後に決定し、投与前の値と比較した。

【0297】

カニクイザルから採取した血液試料を親CD19抗体またはnf抗CD19抗体のいずれかで染色し、標準的な方法を用いるFACSによって分析した。本研究に使用した全てのサルのB細胞が親およびnfの抗CD19抗体の両方で陽性染色された。各グループに2匹の雄ザルおよび2匹の雌ザルを含めた。血液試料は、第7日および投与前に採取した。伏在静脈にゆっくりボーラス静脈内注射を行い、動物に1mg/kgの親またはnfの抗CD19抗体を投与した。血液試料は、投与24時間後、48時間後、72時間後、ならびに7日後、14日後、21日後および28日後に採取した。血液試料は、PK決定、血液学のためおよびフローサイトメトリーのために採取した。各時点で、次の細胞表面抗原を血液から観察した：CD2+/CD20+ (全てのリンパ球)、CD20+ (Bリンパ球)、CD3+ (Tリンパ球)、CD3+/CD4+ (Tヘルパーリンパ球)、CD3+/CD8+ (T細胞傷害性リンパ球)、CD3-/CD16+ (NK細胞)、CD3-/CD14+ (単球)。

10

【0298】

図34は、第7日および投与前の平均値と比較した場合のCD20陽性細胞数の変化を示す。親抗CD19抗体は24時間後にCD20陽性B細胞数における55%の減少を誘導したが、非フコシル化抗体は、およそ90%というより強力なB細胞数の抑制的減少をもたらした。nf抗CD19グループにおいては、B細胞数は処置の2日後、3日後および7日後もこのレベルで維持されたが、親抗体は見かけ上基準に戻り始めていた。図35は、個々のサル各々のCD20陽性細胞の基準からの%変化を示す。nf抗CD19抗体で処置した4匹のサルは全て、親抗CD19抗体と比較してCD20陽性細胞の%のより大きな減少を示した。まとめるところこれらのデータは、nf抗CD19抗体がその親抗体と比較して循環B細胞を枯渇させるのにより効果的であることを示唆する。

20

【0299】

実施例17：抗CD19抗体の免疫組織化学研究

HuMab抗CD19の組織結合プロフィールを評価するために、FITC結合21D4 (21D4-FITC、F : P=4) および非フコシル化21D4 (nf21D4) (nf21D4-FITC、F : P=3) を、脾臓、扁桃、小腸、小脳、大脳、心臓、肝臓、肺および腎臓を含む正常 (非新生物性) ヒト組織 (各々1~2試料) ならびに慢性リンパ球性白血病、濾胞性リンパ腫、辺縁層リンパ腫、マントル細胞リンパ腫およびびまん性大B細胞リンパ腫を含むB細胞新生物 (各々1~2試料) のパネルを用いて試験した。非フコシル化21D4抗体は上記の通り調製した。FITC結合Hu-IgG₁ (Hu-IgG₁-FITC) をアイソタイプ対照抗体として用いた。

30

【0300】

瞬間凍結しOCTに包埋された正常組織およびリンパ腫組織はCooperative Human Tissue Network (Philadelphia, PA) またはNational Disease Research Institute (Philadelphia, PA) から購入した。5μmのクリオスタッフ切片を室温で10分間アセトンで固定し、使用するまで-80°で保存した。EnVision+System (Dako, Carpinteria, CA) を用いる間接的なペルオキシダーゼ免疫染色を本発明者らの慣用的なプロトコルに従って行った。簡単に言うと、スライドをPBS (Sigma, St. Louis, MO) で二度洗浄し、次いでDako EnVision+Systemとして提供されるペルオキシダーゼブロックと共に10分間インキュベートした。PBSで二度洗浄した後、スライドを、1%ヒトグロブリンおよび1mg/mlの熱凝集ヒトIgGを補充したDakoプロテインブロックと共に20分間インキュベートすることで、非特異的結合部位をブロックした。次に、一次抗体 (0.4μg/mlまたは2μg/mlの21D4-FITCおよびnf21D4-FITC) またはアイソタイプ対照 (0.4μg/mlまたは2μg/mlのHu-IgG1-FITC) を切片に適用し、1時間インキュベートした。PBSで三度洗浄した後、スライドをマウス抗FITC抗体 (20μg/ml) と共に30分間インキュベートした。PBSでさらに三度洗浄した後、スライドをDako EnVision+Systemとして提供されるペルオキシダーゼ結合抗マウスIgGポリマーと共に30分間インキュベートした。最後に、スライドを上記の通り洗浄し、Dako EnVisio

40

50

n+Systemとして提供されるDAB基質-色素原溶液と6分間反応させた。次いで慣用的な組織学的手順に従ってスライドを脱イオン水で洗浄し、マイヤーヘマトキシリン(Dako)で対比染色し、脱水し、洗浄し、Permount(Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ)をカバースリップとしてのせた。

【0301】

21D4-FITCおよびnf21D4-FITCの両方による特異的染色は、リンパ系組織またはリンパ系の豊富な組織(脾臓、扁桃および小腸)ならびにリンパ腫組織において観察された。脾臓および扁桃において、強い特異的染色は主に、B細胞領域、すなわち脾臓のリンパ小節、扁桃のマントルゾーンおよび胚中心に分布した。小腸においては、強い特異的免疫反応は主にパイエル板またはリンパ系凝集体(lymphoid aggregates)に局在し、弱～強の染色は粘膜の粘膜固有層に分散したリンパ球に局在した。強い染色はまた、濾胞性リンパ腫および辺縁層リンパ腫の腫瘍細胞において示され、中～強の染色は慢性リンパ球性白血病、びまん性大B細胞リンパ腫、およびマントル細胞リンパ腫において示された。

10

【0302】

正常な小脳、大脳、心臓、肝臓、肺、および腎臓組織においては、21D4-FITCまたはnf21D4-FITCのいずれで染色した場合も、肺組織および腎臓組織における病巣リンパ系細胞または凝集体における一部の染色を除いて意味のある染色は観察されなかった。さらに、これらの組織は、最大10 μg/mlの高濃度で染色した。同様に、アイソタイプ対照抗体と比較して特異的な染色は観察されなかった。

20

【0303】

21D4-FITCとnf21D4-FITCの比較は、全ての組織における類似の染色パターンを示した。この特異的染色は0.4 μg/mlで飽和またはほぼ飽和した。しかし、21D4-FITCによる染色強度はnf21D4-FITCによるそれよりも約0.5～1等級強い。このことはおそらく部分的に、21D4-FITCのF:P比が高い(4対3)ことに起因すると考えられる。

【0304】

実施例18：抗CD19抗体の細胞殺傷力の評価

本実施例において、チミジン取り込みアッセイ法においてCD19+細胞株を死滅させる能力について、抗CD19モノクローナル抗体を単独でまたは毒素に結合させて試験した。

【0305】

抗CD19モノクローナル抗体は、リンカー、例えばペプチジルリンカー、ヒドラゾンリンカーまたはジスルフィドリンカーを介して毒素に結合させた。CD19+を発現するRaji細胞株またはSU-DHL-6細胞株を、 1×10^4 細胞/ウェルとなるよう播いた。抗CD19抗体単独または抗CD19抗体-毒素複合体のいずれかを開始濃度30nMでウェルに加え、8つの希釈物について1:3連続希釈となるよう滴定を行った。CD19に非特異的なヒトアイソタイプ対照抗体を陰性対照として用いた。プレートを69時間インキュベートした。次いでこのプレートを、0.5 μCiの³H-チミジンで24時間パルスし、収集し、トップカウントシンチレーションカウンター(Packard Instruments, Meriden, CT)で読み取った。結果をそのEC50値と合わせて図36に示す。図36AはRaji細胞に対する未修飾抗体を示す。図36BはSU-DHL-6細胞に対する未修飾抗体を示す。図36CはSU-DHL-6細胞に対する毒素結合抗CD19抗体を示す。このデータは、抗CD19抗体21D4がRaji B細胞腫瘍細胞に結合してこれを死滅させ、かつSU-DHL-6細胞に対して予想外に高レベルの細胞殺傷力を有することを実証する。

30

【0306】

実施例19：B細胞枯渇研究

抗CD19抗体がB細胞を枯渇できるかどうかを決定するため、全血B細胞枯渇アッセイ法を設計した。

【0307】

ヒト全血をAllCells Inc. (Berkeley, CA)から購入し、同日に室温に移した。意図する抗体の非存在下もしくは1～30mg/mlの存在下、または未処置グループとしてPBSの存在下で2mlの全血をインキュベートした。血液-抗体混合物は5% CO₂下、37℃で一晩インキュベートした。実験当日、10分間のインキュベーションおよびその後の遠心分離により、

40

50

血液を1:10比でRBC溶解緩衝液を用いて二度溶解させた。二度目の遠心分離後、細胞ペレットをFACS緩衝液（2% FBSおよび20%バーゼンを含有するPBSプラスカルシウムおよびマグネシウム）で一度洗浄し、その後に標準的なフローサイトメトリープロトコルを用いてT細胞マーカーとしての抗CD3抗体（Becton Dickinsonカタログ番号555332）およびB細胞マーカーとしての抗CD22抗体（Becton Dickinsonカタログ番号340708）でFACS染色を行った。細胞を氷上で20分間インキュベートした後、最終洗浄を行い、FACS緩衝液中5mg/mlのヨウ化プロピジウム溶液（Sigmaカタログ番号P4864）に再懸濁した。Becton Dickinson製のFASCaliburシステムおよびCellquestソフトウェアを用いるフローサイトメトリーによりデータを収集し、FlowJoソフトウェアを通じたリンパ球サイズのゲーティングを利用して分析した。パーセント変化は、非処置グループにおける%陽性B細胞-抗体処置グループにおける%陽性B細胞/非処置グループにおける%陽性B細胞×100を決定することにより算出した。結果を表4に示す。健常な血液ドナーから8.7%のB細胞が一晩のインキュベーション（抗体なし）後に血中に保持された。30mg/mlの陽性対照リツキサン（Rituxan）と全血のインキュベーションは、未処置の抗体なしグループと比較した場合にB細胞数における46%の枯渇を示した。非フコシル化（nf）抗CD19抗体で処置したグループは、B細胞枯渇に対してはっきりとした効果を有し、B細胞を約40%抑制した。親抗体はB細胞数に対して中程度の効果を有した。

【0308】

（表4）全血からのB細胞の枯渇

サンプル	%陽性 (CD22)	%変化
抗体なし	8.7	--
アイソタイプ対照	7.5	14.2
リツキサン	4.7	46.3
親の抗CD19 mAb	7.0	20.0
Nf抗CD19 mAb	5.2	40.5

【0309】

配列表の概要

10

20

SEQ ID NO:	配列	SEQ ID NO:	配列
1	V_H アミノ酸 21D4 および 21D4a	41	V_K CDR1 アミノ酸 5G7
2	V_H アミノ酸 47G4	42	V_K CDR1 アミノ酸 13F1
3	V_H アミノ酸 27F3	43	V_K CDR1 アミノ酸 46E8
4	V_H アミノ酸 3C10	44	V_K CDR2 アミノ酸 21D4 および 21D4a
5	V_H アミノ酸 5G7	45	V_K CDR2 アミノ酸 47G4
6	V_H アミノ酸 13F1	46	V_K CDR2 アミノ酸 27F3
7	V_H アミノ酸 46E8	47	V_K CDR2 アミノ酸 3C10
8	V_K アミノ酸 21D4	48	V_K CDR2 アミノ酸 5G7
9	V_K アミノ酸 21D4a	49	V_K CDR2 アミノ酸 13F1
10	V_K アミノ酸 47G4	50	V_K CDR2 アミノ酸 46E8
11	V_K アミノ酸 27F3	51	V_K CDR3 アミノ酸 21D4
12	V_K アミノ酸 3C10	52	V_K CDR3 アミノ酸 21D4a
13	V_K アミノ酸 5G7	53	V_K CDR3 アミノ酸 47G4
14	V_K アミノ酸 13F1	54	V_K CDR3 アミノ酸 27F3
15	V_K アミノ酸 46E8	55	V_K CDR3 アミノ酸 3C10
16	V_H CDR1 アミノ酸 21D4 および 21D4a	56	V_K CDR3 アミノ酸 5G7
17	V_H CDR1 アミノ酸 47G4	57	V_K CDR3 アミノ酸 13F1
18	V_H CDR1 アミノ酸 27F3	58	V_K CDR3 アミノ酸 46E8
19	V_H CDR1 アミノ酸 3C10	59	V_H ヌクレオチド 20D4 および 21D4a
20	V_H CDR1 アミノ酸 5G7	60	V_H ヌクレオチド 47G4
21	V_H CDR1 アミノ酸 13F1	61	V_H ヌクレオチド 27F3
22	V_H CDR1 アミノ酸 46E8	62	V_H ヌクレオチド 3C10
23	V_H CDR2 アミノ酸 21D4 および 21D4a	63	V_H ヌクレオチド 5G7
24	V_H CDR2 アミノ酸 47G4	64	V_H ヌクレオチド 13F1
25	V_H CDR2 アミノ酸 27F3	65	V_H ヌクレオチド 46E8
26	V_H CDR2 アミノ酸 3C10	66	V_K ヌクレオチド 21D4
27	V_H CDR2 アミノ酸 5G7	67	V_K ヌクレオチド 21D4a
28	V_H CDR2 アミノ酸 13F1	68	V_K ヌクレオチド 47G4
29	V_H CDR2 アミノ酸 46E8	69	V_K ヌクレオチド 27F3

10

20

30

40

30	V _H CDR3 アミノ酸 21D4 および 21D4a	70	V _K ヌクレオチド 3C10
31	V _H CDR3 アミノ酸 47G4	71	V _K ヌクレオチド 5G7
32	V _H CDR3 アミノ酸 27F3	72	V _K ヌクレオチド 13F1
33	V _H CDR3 アミノ酸 3C10	73	V _K ヌクレオチド 46E8
34	V _H CDR3 アミノ酸 5G7	74	VH 5-51 生殖系列アミノ酸
35	V _H CDR3 アミノ酸 13F1	75	VH 1-69 生殖系列アミノ酸
36	V _H CDR3 アミノ酸 46E8	76	VK L18 生殖系列アミノ酸
37	V _K CDR1 アミノ酸 21D4 および 21D4a	77	VK A27 生殖系列アミノ酸
38	V _K CDR1 アミノ酸 47G4	78	VK L15 生殖系列アミノ酸
39	V _K CDR1 アミノ酸 27F3	79	CD19 アミノ酸
40	V _K CDR1 アミノ酸 3C10	80	JH4b 生殖系列
		81	JH5b 生殖系列
		82	JH6b 生殖系列
		83	JH6b 生殖系列
		84	JK2 生殖系列
		85	JK3 生殖系列
		86	JK1 生殖系列
		87	JK2 生殖系列

【図面の簡単な説明】

【0310】

【図1A】21D4および21D4aヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 59) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 1) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 16) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 23) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 30) 領域に線引きをし、V、DおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図1B】21D4ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 66) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 8) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 37) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 44) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 51) 領域に線引きをし、VおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図1C】21D4aヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 67) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 9) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 37) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 44) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 52) 領域に線引きをし、VおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図2A】47G4ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 60) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 2) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 17) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 24) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 31) 領域に線引きをし、V、DおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図2B】47G4ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 68) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 10) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 38) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 45) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 53) 領域に線引きをし、VおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図3A】27F3ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO:

10

20

30

40

50

61) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 3) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 18) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 25) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 32) 領域に線引きをし、V、DおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図3B】27F3ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 69) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 11) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 39) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 46) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 54) 領域に線引きをし、VおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図4A】3C10ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 62) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 4) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 19) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 26) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 33) 領域に線引きをし、V、DおよびJの生殖細胞系の由来を示す。 10

【図4B】3C10ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 70) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 12) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 40) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 47) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 55) 領域に線引きをし、VおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図5A】5G7ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 63) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 5) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 20) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 27) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 34) 領域に線引きをし、V、DおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図5B】5G7ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 71) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 13) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 41) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 48) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 56) 領域に線引きをし、VおよびJの生殖細胞系の由来を示す。 20

【図6A】13F1ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 64) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 6) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 21) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 28) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 35) 領域に線引きをし、V、DおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図6B】13F1ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 72) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 14) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 42) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 49) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 57) 領域に線引きをし、VおよびJの生殖細胞系の由来を示す。 30

【図7A】46E8ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 65) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 7) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 22) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 29) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 36) 領域に線引きをし、V、DおよびJの生殖細胞系の由来を示す。

【図7B】46E8ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列 (SEQ ID NO: 73) およびアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 15) を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 43) 領域、CDR2 (SEQ ID NO: 50) 領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 58) 領域に線引きをし、VおよびJの生殖細胞系の由来を示す。 40

【図8】21D4 (SEQ ID NO: 1) および21D4a (SEQ ID NO: 1) の重鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_H5-51のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 74) のアラインメントを示す。JH4b生殖細胞系はSEQ ID NO: 80として開示する。

【図9】47G4 (SEQ ID NO: 2) の重鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_H1-69のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 75) のアラインメントを示す。JH5b生殖細胞系はSEQ ID NO: 81として開示する。

【図10】27F3 (SEQ ID NO: 3) の重鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_H5-51のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 74) のアラインメントを示す。JH6b生殖細胞系はSEQ ID NO: 82として開示する。

【図11】3C10 (SEQ ID NO: 4) の重鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_H1-69のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 75) のアラインメントを示す。JH6b生殖細胞系はSEQ ID 50

NO: 82として開示する。

【図12】5G7 (SEQ ID NO: 5) の重鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_H5-5 1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 74) のアライメントを示す。JH6b生殖細胞系はSEQ ID NO: 83として開示する。

【図13】13F1 (SEQ ID NO: 6) の重鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_H5-5 1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 74) のアライメントを示す。JH6b生殖細胞系はSEQ ID NO: 82として開示する。

【図14】46E8 (SEQ ID NO: 7) の重鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_H5-5 1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 74) のアライメントを示す。JH6b生殖細胞系はSEQ ID NO: 82として開示する。

【図15】21D4 (SEQ ID NO: 8) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_KL 1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 76) のアライメントを示す。JK2生殖細胞系はSEQ ID NO: 84として開示する。

【図16】21D4a (SEQ ID NO: 9) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_KL 1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 76) のアライメントを示す。JK3生殖細胞系はSEQ ID NO: 85として開示する。

【図17】47G4 (SEQ ID NO: 10) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_KA 27のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 77) のアライメントを示す。JK3生殖細胞系はSEQ ID NO: 85として開示する。

【図18】27F3 (SEQ ID NO: 11) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_KL 18のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 76) のアライメントを示す。JK2生殖細胞系はSEQ ID NO: 84として開示する。

【図19】3C10 (SEQ ID NO: 12) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_KL 15のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 78) のアライメントを示す。JK2生殖細胞系はSEQ ID NO: 84として開示する。

【図20】5G7 (SEQ ID NO: 13) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_KL 1のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 76) のアライメントを示す。JK1生殖細胞系はSEQ ID NO: 86として開示する。

【図21】13F1 (SEQ ID NO: 14) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_KL 18のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 76) のアライメントを示す。JK2生殖細胞系はSEQ ID NO: 87として開示する。

【図22】46E8 (SEQ ID NO: 15) の軽鎖可変領域のアミノ酸配列と、ヒト生殖細胞系V_KL 18のアミノ酸配列 (SEQ ID NO: 76) のアライメントを示す。JK2生殖細胞系はSEQ ID NO: 87として開示する。

【図23】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体47G4がヒトCD19に特異的に結合することを実証する実験結果を示すグラフである。

【図24】CD19に対するヒトモノクローナル抗体がRaji細胞に対する結合について競合することを実証する実験結果を示すグラフである。

【図25 A】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、3C10、5G7および13F1がB細胞腫瘍細胞株の細胞表面に結合することを実証するフローサイトメトリーの結果を示す。ヒトCD19でトランスフェクトしたCHO細胞に対するHuMAb 21D4および47G4のフローサイトメトリー。

【図25 B】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、3C10、5G7および13F1がB細胞腫瘍細胞株の細胞表面に結合することを実証するフローサイトメトリーの結果を示す。Daudi B腫瘍細胞に対するHuMAb 47G4のフローサイトメトリー。

【図25 C】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、3C10、5G7および13F1がB細胞腫瘍細胞株の細胞表面に結合することを実証するフローサイトメトリーの結果を示す。Raji B腫瘍細胞に対するHuMAb 21D4および47G4のフローサイトメトリー。

【図25 D】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体21D4、21D4a、47G4、3C10、5G7および13F1がB細胞腫瘍細胞株の細胞表面に結合することを実証するフローサイトメトリー

10

20

30

40

50

の結果を示す。Raji B腫瘍細胞に対するHuMAb 21D4、21D4a、3C10、5G7および13F1のフローサイトメトリー。

【図26A】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体21D4および47G4がCHO-CD19およびCD19を発現するRaji B腫瘍細胞に侵入することを3H-チミジン放出アッセイ法によって実証する内部移行実験の結果を示す。CHO-CD19細胞へのHuMAb 47G4の内部移行。

【図26B】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体21D4および47G4がCHO-CD19およびCD19を発現するRaji B腫瘍細胞に侵入することを3H-チミジン放出アッセイ法によって実証する内部移行実験の結果を示す。Raji B腫瘍細胞へのHuMAb 21D4および47G4の内部移行。

【図27】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体がRaji B細胞腫瘍細胞を死滅させることを実証するチミジン取り込みアッセイ法の結果を示す。 10

【図28】Ramos全身動態モデルにおけるマウス生存率のカプラン・マイヤープロットを示す。

【図29】Ramos全身動態モデルにおけるマウスの体重変化を示す。

【図30】未修飾の抗CD19抗体21D4による処置がインビボでリンパ腫腫瘍に対して直接的な抑制効果を有することを実証するインビボマウス腫瘍モデル研究の結果を示す。(A) A RH-77腫瘍。(B) Raji腫瘍。 20

【図31】非フコシル化ヒトモノクローナル抗CD19抗体が抗体依存的細胞性細胞傷害性(ADCC)依存的様式でヒト白血病細胞に対する細胞傷害性を増加させることを実証するADCCアッセイ法の結果を示す。

【図32】毒素結合抗CD19抗体が腫瘍の容積を減少させることを実証するインビボマウス腫瘍モデル研究の結果を示す。

【図33】Raji腫瘍モデル研究におけるマウスの体重変化を示す。

【図34】フコシル化または非フコシル化抗CD19 HuMAb処置後のCD20+細胞集団の減少を示すカニクイザル研究の結果を示す。

【図35】フコシル化または非フコシル化抗CD19 HuMAb処置後の個々のカニクイザルの結果を示す。

【図36A】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体単独またはその毒素複合体がRaji B細胞腫瘍細胞およびSU-DHL-6 B細胞腫瘍細胞を死滅させることを実証するチミジン取り込みアッセイ法の結果を示す。 30

【図36B】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体単独またはその毒素複合体がRaji B細胞腫瘍細胞およびSU-DHL-6 B細胞腫瘍細胞を死滅させることを実証するチミジン取り込みアッセイ法の結果を示す。

【図36C】ヒトCD19に対するヒトモノクローナル抗体単独またはその毒素複合体がRaji B細胞腫瘍細胞およびSU-DHL-6 B細胞腫瘍細胞を死滅させることを実証するチミジン取り込みアッセイ法の結果を示す。

【図1A】

抗CD19 21D4および21D4a VH

V セグメント: 5-51
 D セグメント: 3-10
 J セグメント: JH4b

1 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
 GAG GTG CAG CTG GTG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTC
 CDR1
 55 K I S C K G S G Y S F S S W I G W
 AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT AGC AGC TGG ATC GGC TCG
 CDR2
 109 V R Q M P G K G L E W M G I I Y P D
 GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GAT
 CDR2
 163 D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
 GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGT CCG TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GGC
 CDR3
 217 D K S I R T A Y L Q W S S L K A S D
 GAC AAG TCC ATC AGG ACC GGC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTG AAG GGC TCG GAC
 CDR3
 271 T A M Y Y C A R H V T M I W G V I Y I
 ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAT GTT ACT ATG ATT TGG GGA GTT ATT ATT
 CDR3
 325 D F N G Q G T L V T V S S
 GAC TTC TGG GGC CAG GGA ACC CTC GTC ACC GTC TCC TCA

【図1B】

抗CD19 21D4 VK

V セグメント: L18
 J セグメント: JK2

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC GGA GAC AGA
 CDR1
 55 V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
 GTC ACC ATC ACT TSC CGG GCA ACT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GGC TGG TAT
 CDR2
 109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
 CAG CGC AAA CCA CGG AAA GCT CCT AGG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG
 CDR2
 163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
 CDR3
 217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT ATT TAC TGT CAA CAG
 CDR3
 271 F N S Y P F T F G P G T K V D I K
 TTT ATG AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAG

【図1C】

抗CD19 21D4a VK

V セグメント: L18
 J セグメント: JK3

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
 GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC GGA GAC AGA
 CDR1
 55 V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
 GTC ACC ATC ACT TSC CGG GCA ACT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GGC TGG TAT
 CDR2
 109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
 CAG CGC AAA CCA CGG AAA GCT CCT AGG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG
 CDR2
 163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
 GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
 CDR3
 217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
 CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT ATT GCA ACT ATT TAC TGT CAA CAG
 CDR3
 271 F N S Y P F T F G P G T K V D I K
 TTT ATG AGT TAC CCA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAG

【図2A】

抗CD19 4764 VH

V セグメント: 1-69
 D セグメント: 6-19
 J セグメント: JH5b

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
 CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG CCT GGG TCC TCG GTC
 CDR1
 55 K V S C K D S G G T F S S Y A I S W
 AAG GTC TCC TGC AAG GAC TCT GGA GGC ATT TTC AGC ACC TAT GCT ATC AGC TGG
 CDR2
 109 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
 GTG CGA CAG GGC CCT GGA CAA GGA CCT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATC CCT ATC
 CDR2
 163 F G T T N Y A Q Q F Q G R V T I T A
 TTT GGT ACA ACA AAC TAC GCA CAG CCT CAG GCC AGA GTC AGC ATT ACC GCG
 CDR3
 217 D E S T S T A Y M E L S S L R S R D
 GAC GAA TCC AGC AGC AGC AGC GCA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGT CTG AGA ATT GAG GAC
 CDR3
 271 T A V Y Y C A R E A V A A D W L D P
 ACG GGC GTG TAT TAC TGT GCG AGA GAA GCA GTC GCT GGG GAC TGG TTA GAC CCC
 325 W G Q G T L V T V S S
 TGG GGC CAG GGA ACC CTC GTC ACC GTC TCC TCA

【図2B】

抗CD19 4764 VK

V セグメント: A27
J セグメント: JK3

1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E R
GAA ATT GTG TTG AGC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA AGA
CDR1

55 A T L S C R A S Q S V S S S Y L A W
GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT ACC AGC AGC TAC TTA GGC TGG
CDR2

109 Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G A S S
TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC ATC TAT GGT GCA TCC AGC
CDR2

163 R A T G I F D R F S G S G S G T D F
AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGG TCT GGG ACA GAC TTC
CDR3

217 T L T I S R L E P E D F A V Y Y C Q
ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA GTG TAT TAC TGT CAG
CDR3

271 Q Y G S S R F F F G P G T K V D I K
CAG TAT GGT AGC TCA CGA TTC ACT TTC GGC CCT GGG ACC AAA GTG GAT ATC AAA

【図3A】

抗CD19 27F3 VH

V セグメント: 5-51
D セグメント: 6-19
J セグメント: JH6b

1 E V Q L V G S G A E V K K P G E S I
GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GCA GGA GAG GTG AAA AGG CCC GGG GAG TCT CTG
CDR1

55 K I S C K G S G Y S F T S Y W I A W
AAG ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TAC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG
CDR2

109 V R Q M F G K G L E W M G I I Y P G
GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT
CDR2

163 D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CGS TCC TTC CAA GGC CAG GTC ACC ATC TCA GCC
CDR3

217 D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D
GAC ATG TCC ATC AGC ACC GGC TAC CTG CAG TGG AGC AGC CTC AAG GCC TCG GAC
CDR3

271 T A M Y Y C A R Q G Y S S G H D S Y
ACC GCC ATG TAC TAC TGT GCG AGA CAG GGG TAT AGC AGT GGC TGG GAC TCC TAC
CDR3

325 Y G M G V W G Q G T T V T V S S
TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA GGG ACC AGC GTC ACC GTC TCC TCA

【図3B】

抗CD19 27F3 VK

V セグメント: L18
J セグメント: JK2

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC GGA GAC AGA
CDR1

55 V T I T C R A S Q G I S S A I A W Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GCC AGT AGC AGT GCT TTA GGC TGG TAT
CDR2

109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA CGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAC GAT GGC TCC AGT TTC
CDR2

163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC AGC AGT GGA CCT GGG ACA GAT TTC ACT
CDR3

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTG ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG
CDR3

271 F N S Y P X T F G Q G S T K L F I K
TTT ATG AGT TAC CCG TAC ACT TTT GGC CAG SGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

【図4A】

抗CD19 3C10 VH

V セグメント: 1-69
D セグメント: 1-26
J セグメント: JH6b

1 Q V Q L V Q S G A E V K K P G S S V
CAG GTC CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AGG CCT GGG TCC TCG GGT
CDR1

55 K V S C K A S G G T F S S Y T I N W
AAG GTC TCC TGC ATG GCT TCT GGA GCC ACC TTC AGC AGC TAT ACT ATC ARC TGG
CDR2

109 V R Q A P G Q G L E W M G G I I P I
GTG CGA CAG CGC CCT GGA CAA CGG CCT GAG TGG ATG GGA GGG ATC ATT CCT ATC
CDR2

163 F G I P N Y A Q K F Q G R V T I T A
TTT GGT ATA CCT AAC TAC GCA CAG AGG TTC CAG GGT AGA GTT ACG ATT ACC GCG
CDR2

217 D E S T N T A Y M E L S S L R A E D
GAC GAA TCC AGC AAC ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA GCT GAG GAC
CDR3

271 T A V Y Y C A R A S G G S A D Y S Y
ACG GCC GTT TAT TAC TGT GCG AGA GCC AGT GGT GGG AGC GCG GAC TAT TCC TAC
CDR3

325 G M D V W G Q G T A V T V S S
GGT ATG GAC GTC TGG GGC CAA CGG ACC AGC GTC ACC GTC TCC TCA

【図4B】

抗CD19 3C10 VK

V セグメント: L15
J セグメント: JK2

1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R
GAC ATC CAG ATG ACC CAG TGT CCA TCC TCA CTG TCT GCA TCT GTC GGA GAC AGA

CDR1

55 V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
GTC ACC ATC ACT TGT CGG GCG AGT CAG GGT ATT AGC AGC TGG TTA GCC TGG TAT

CDR2

109 Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L
CAG CAG AAA CCA GAG AAA GCG CCT AAG TCC CTG ATC TAT GCT GCA TCC AGT TTG

CDR3

163 Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
CAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR1

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAC TAC TGG CAA CAG

CDR2

271 Y X R X P Y T F G Q G T K L E I K
TAT AAG AGA TAC CGG TAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

【図5A】

抗CD19 5G7 VH

V セグメント: 5-51
D セグメント: 3-10
J セグメント: JH6b

1 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
GAG CTG CAG CTG GTC CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

CDR1

55 N I S C K G S G Y S F T S Y W I G W
AAC ATC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC AGC TTT ACC AGC TAC TGG ATC GGC TGG

CDR2

109 V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

CDR3

163 D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CGG TCC TTC CAA GCC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

CDR1

217 D K S I N T A Y L Q W S S L K A S D
GAC AAG TCC ATC AAC ACC GCC TAC CTG CAG TGG AGC ACC CTG AAG GCC TCG GAC

CDR2

271 T A M Y Y C A R G V S K I W G V I M
ACC GCC ATG TAT TAC TGT CGG AGA GGG GTT TCT AGC ATT TGG GGA GTT ATT ATG

CDR3

325 D V W G Q G T T V T V S S
GAC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

【図5B】

抗CD19 5G7 VK

V セグメント: L18
J セグメント: JK1

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TGT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTC GGA GAC AGA

CDR1

55 V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT

CDR2

109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG

CDR3

163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT

CDR1

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG

CDR2

271 F N S Y P W T F G Q G T K V E I K
TTT AAT AGT TAC CGG TGG AGC TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTC GAA ATC AAA

【図6A】

抗CD19 13F1 VH

V セグメント: 5-51
D セグメント: 6-19
J セグメント: JH6b

1 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L
GAG CTG CAG CTG GTC CAG TCT GGA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG

CDR1

55 Q I S C K G S G Y T F T N Y W I A W
CAG ACC TCC TGT AAG GGT TCT GGA TAC ACC TTT ACC AAC TAC TGG ATC GGC TGG

CDR2

109 V R Q M P G K G L E W M G I I Y P G
GTG CGC CAG ATG CCC GGG AAA GGC CTG GAG TGG ATG GGG ATC ATC TAT CCT GGT

CDR3

163 D S D T R Y S P S F Q G Q V T I S A
GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CGG TCC TTC CAA GCC CAG GTC ACC ATC TCA GCC

CDR1

217 D K S I S T A Y L Q W S S L K A S D
GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTA CAG TGG AGC GCC CTG AAG GCC TCG GAC

CDR2

271 T A M Y Y C A R G V S S G W R S Y
ACC GCC ATG TAT TAC TGT CGG AGA CAG GCA TAT AGC AGT GGC TGG GGC TCC TAC

CDR3

325 Y G M G V W G Q G T T V T V S S
TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA

【図6B】

抗CD19 13F1 VH

V セグメント: L18
J セグメント: JK2

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCF GCA TCT GTC GGA GAC AGA
CDR1

55 V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG SCA AGT CAG GCC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT
CDR2

109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA CGG AAA GCT CCT ARG CGC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGC TTG
CDR2

163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
CDR3

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG
CDR3

271 F N S Y P H T F G Q G T K L E I K
TTT ATG AGT TAC CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

【図7A】

抗CD19 46E8 VH

V セグメント: 5-51
D セグメント: 6-19
J セグメント: JH6b

1 E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C R G S G Y S P S F Q V T I S A
GAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GCA GCA GAG GTG AAA AAG CCC GGG GAG TCT CTG
CDR1

55 Q I S C K G S G Y T F Q N Y H I A W
CAG ATC TCC TGT AGG GGT TCT GGA TAC ACC TTT ACC ARC TAC TGG ATC GCC TGG
CDR2

109 V R Q M P G K G L E W M G Q I Y P G D T R Y S P S F Q V T I S A
GTG CGC CAG ATG ATG CCC GGG AAA GCC CTG GAG TGG ATG GGG ACC ATC TAT CCT GGT
CDR2

163 D S D T R Y S P S F Q B Q V N T I S A
GAC TCT GAT ACC AGA TAC AGC CCG TCC TTC CAR GCC CAG GTC ACC ATC TCA GCC
CDR3

217 D K S I S T A Y L Q W S G C L K A S D
GAC AAG TCC ATC AGC ACC GCC TAC CTA CAG TGG AGC GGC CTG AAG GGC TCG GAC
CDR3

271 T A M Y Y C A R Q G Y S S G W R S Y
ACC GCC ATG TAT TAC TGT GCG AGA CAG GGA TAT ACC AGT GGC TGG CGC TCC TAC
CDR3

325 Y G M G V W G Q G T T V T V S S
TAC GGT ATG GGC GTC TGG GGC CAA CGG ACC ACC GTC ACC GTC TCC TCA

【図7B】

抗CD19 46E8 VH

V セグメント: L18
J セグメント: JK2

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCF GCA TCT GTC GGA GAC AGA
CDR1

55 V T I T C R A S Q G I S S A L A W Y
GTC ACC ATC ACT TGC CGG SCA AGT CAG GCC ATT AGC AGT GCT TTA GCC TGG TAT
CDR2

109 Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA CGG AAA GCT CCT ARG CGC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGC AGT TTG
CDR2

163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
CDR3

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG
CDR3

271 F N S Y P H T F G Q G T K L E I K
TTT ATG AGT TAC CCT CAC ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

【図8】

抗CD19 21D4 VH

5-51 生殖細胞系
21D4 VH
21D4a VH

CDR1
E V Q L V Q S G A E V K K P G E S L K I S C R G S G Y S P S F Q V T I S A
CDR2
V R Q M P G K G L E W M G Q I Y P G D T R Y S P S F Q V T I S A
CDR3
D K S I S T A Y L Q W S G C L K A S D
5-51 生殖細胞系
21D4 VH
21D4a VH

JH6b 生殖細胞系
21D4 VH
21D4a VH

CDR1
D Y W G Q G T L V T V S S
(JH6b)
(JH4b)

CDR2
D K S I S T A Y L Q W S G C L K A S D
H V T M I W G V I I
H V T M I W G V I I

CDR3
D Y W G Q G T L V T V S S
H V T M I W G V I I

【図13】

សេចក្តីថ្ងៃទី ១៣១ | វិចិត្តន៍ ២០១៨

【図15】

<p>1.18 生殖细胞系 11D4 VR</p> <p>1.18 生殖细胞系 11D4 VR</p> <p>1.18 生殖细胞系 11D4 VR</p>	<p>CDR1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S</p> <p>CDR2 A L A W V Q Q K P G R A P K I L I Y D A S S L E S G V P S R P</p> <p>CDR3 S C S G S G T D P T I T I S I Q P E D F A T Y C Q Q F N S</p>	<p>Y P Y T P G Q G T K L E I K (J2R2)</p>
---	---	---

【 13 】

<p>EVQLVQSGAEVKPGESLKIISCKGSGYSFRTSYWIGW VHQMPGKGILDEWMGIVTYPGDSDTRYSSPSFQGQVTLISA</p> <p>DKSISTAYLQWSSLDKASDITAMVYCAR</p> <p>YGMDDVWGGQGTTVTVSS</p>	<p>CDR1</p> <p>CDR2</p> <p>CDR3</p>	<p>CDR1</p> <p>CDR2</p> <p>CDR3</p>
<p>EVQLVQSGAEVKPGESLKIISCKGSGYSFRTSYWIGW VHQMPGKGILDEWMGIVTYPGDSDTRYSSPSFQGQVTLISA</p> <p>DKSISTAYLQWSSLDKASDITAMVYCAR</p> <p>YGMDDVWGGQGTTVTVSS</p>	<p>CDR1</p> <p>CDR2</p> <p>CDR3</p>	<p>CDR1</p> <p>CDR2</p> <p>CDR3</p>
<p>EVQLVQSGAEVKPGESLKIISCKGSGYSFRTSYWIGW VHQMPGKGILDEWMGIVTYPGDSDTRYSSPSFQGQVTLISA</p> <p>DKSISTAYLQWSSLDKASDITAMVYCAR</p> <p>YGMDDVWGGQGTTVTVSS</p>	<p>CDR1</p> <p>CDR2</p> <p>CDR3</p>	<p>CDR1</p> <p>CDR2</p> <p>CDR3</p>
<p>EVQLVQSGAEVKPGESLKIISCKGSGYSFRTSYWIGW VHQMPGKGILDEWMGIVTYPGDSDTRYSSPSFQGQVTLISA</p> <p>DKSISTAYLQWSSLDKASDITAMVYCAR</p> <p>YGMDDVWGGQGTTVTVSS</p>	<p>CDR1</p> <p>CDR2</p> <p>CDR3</p>	<p>CDR1</p> <p>CDR2</p> <p>CDR3</p>

【図14】

1 6 】

GLB 生殖细胞系
21D4a VK

GLB 生殖细胞系
21D4a VK

GLB 生殖细胞系
21D4a VK

CDR1
A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G T S S

CDR2
A I T A W Y Q Q K P G K A P K L I Y D A S S L E S G V P S R E

CDR3
S G S G S G T D F T L I S S L Q P E D F A T Y Y C Q F N S

CDR2
Y P
F T F G P G T K V D I K
(JK3)

GLB 生殖细胞系
21D4a VK

GLB 生殖细胞系
21D4a VK

【図 1 6

CDR1	CDR2	CDR3
A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G S	A L A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S S L E S G V P S	Y P
- - - - -	- - - - -	- - - - -
G L I 8 生殖细胞系	S G S G S G T D F T L I S S L Q P E D F A T Y Y Q C Q R	F T F G T K V D I K
21D4a VK	- - - - -	- - - - -
G L I 8 生殖细胞系	S G S G S G T D F T L I S S L Q P E D F A T Y Y Q C Q R	(JK3)
21D4a VK	- - - - -	- - - - -
G L I 8 生殖细胞系	S G S G S G T D F T L I S S L Q P E D F A T Y Y Q C Q R	Y P
21D4a VK	- - - - -	- - - - -

21DM2 WK 45 H1

【 図 1 7 】

抗CD19 47G4 VK領域

【図19】

杭GD19 3C10 VK5512

【 図 1 8 】

A27 生殖细胞系 4764 VK	E I V L T Q S P G T I L S S P G E R A T L S C R A S Q S V V S S	CDR1
A27 生殖细胞系 4764 VK	S Y L A W Y Q Q S P G Q A P R L L I V Y G A S S R A T G I P D R	CDR2
A27 生殖细胞系 4764 VK	F S G S G S G T D F T L T I S R L E P E D F A V Y X C Q Y G	CDR3
A27 生殖细胞系 4764 VK	S S F P T G T K V D I K	(JK2)

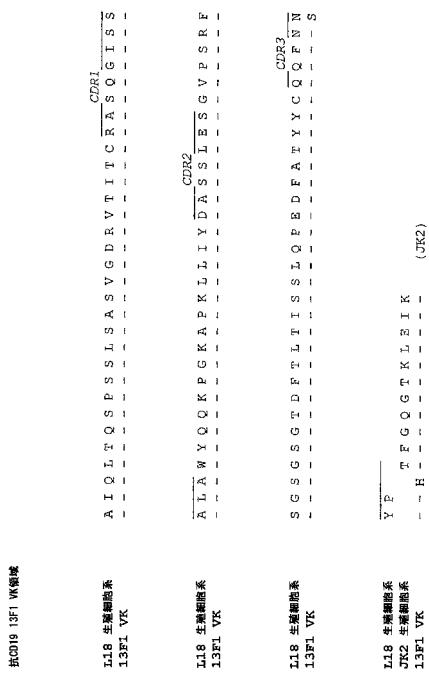
抗CD19 27F3 VK領域

【図20】

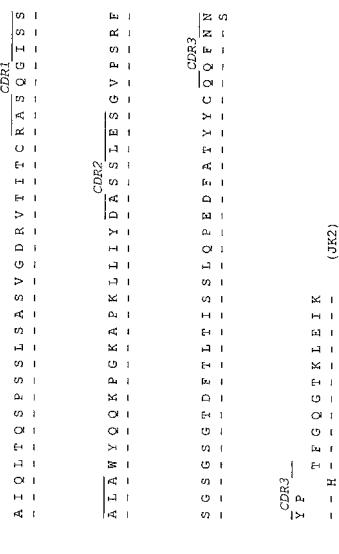
L18 生瘤细胞系 567 VK	A T Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	CDR1	A T Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S	CDR1
L18 生瘤细胞系 567 VK	A T A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D R S S T E S G V P S R F	CDR2	A T A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y D R S S T E S G V P S R F	CDR2
L18 生瘤细胞系 567 VK	S G S S G S G T D F T L I T S S L Q P E D F A T Y Y C Q F N N	CDR3	S G S S G S G T D F T L I T S S L Q P E D F A T Y Y C Q F N N	CDR3
L18 生瘤细胞系 567 VK	Y P		Y P	
L18 生瘤细胞系 JK1 生瘤细胞系 567 VK	W W T F G Q G T K V E I K		W T F G Q G T K V E I K	
L18 生瘤细胞系 JK2 生瘤细胞系 27F3 VK	(JK1)		(JK2)	

抗CD19 5G7 VK領域

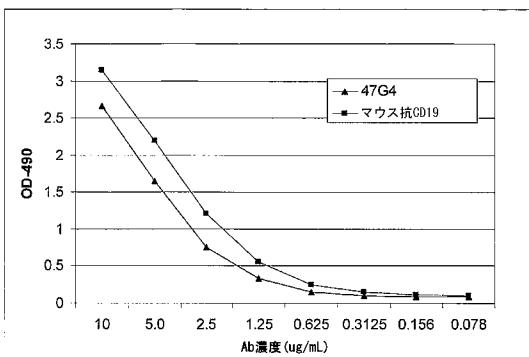
【図21】



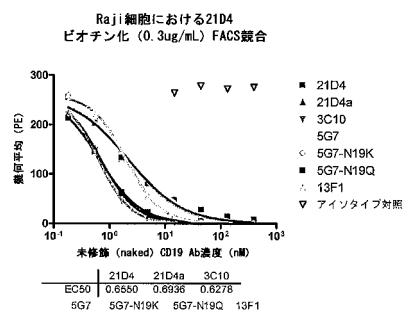
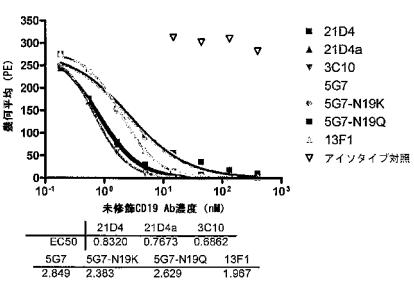
【図22】



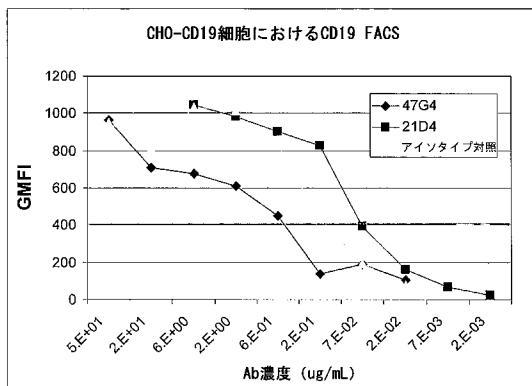
【図23】



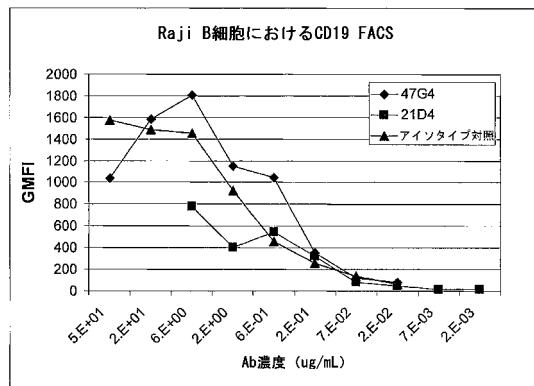
【図24】

Raji細胞における21D4a
ビオチン化 (0.3ug/mL) FACS競合

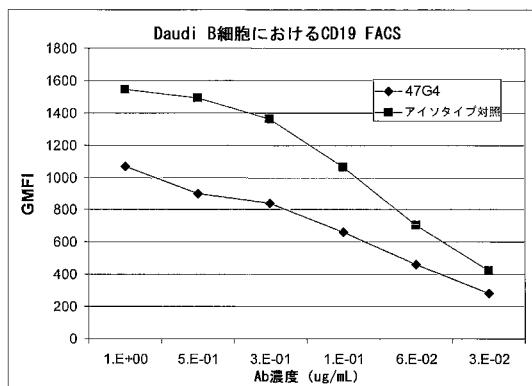
【図25A】



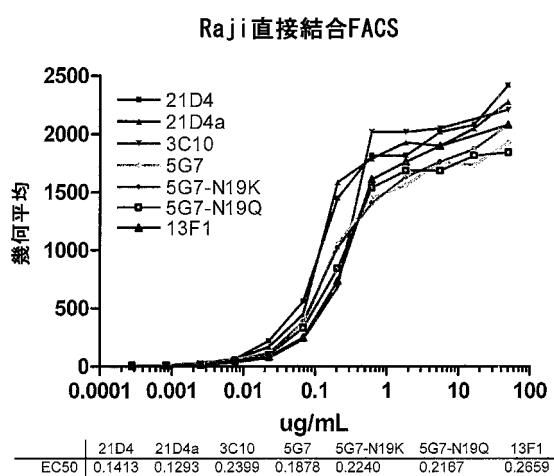
【図25C】



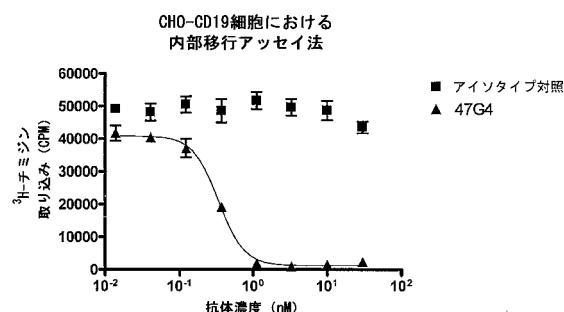
【図25B】



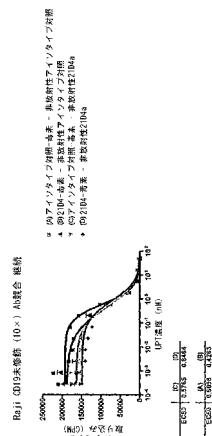
【図25D】



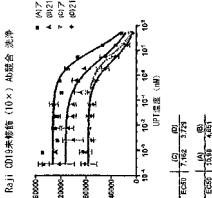
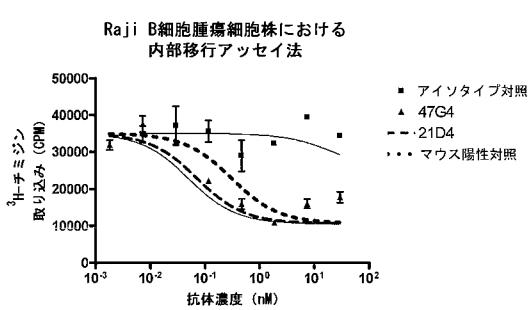
【図26A】



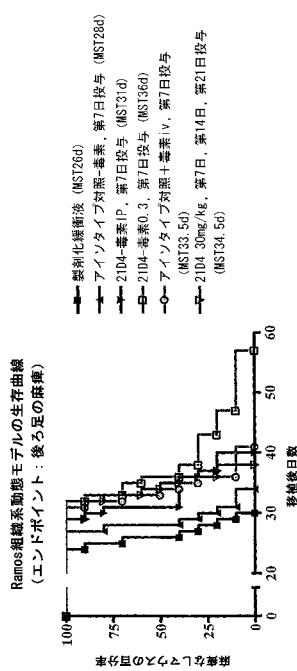
【図27】



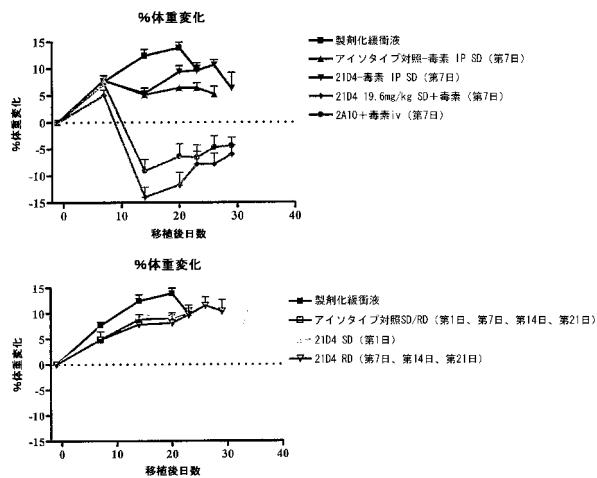
【図26B】



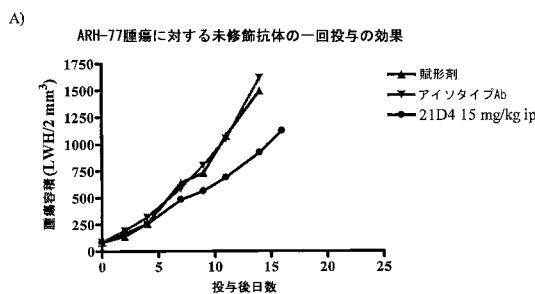
【図28】



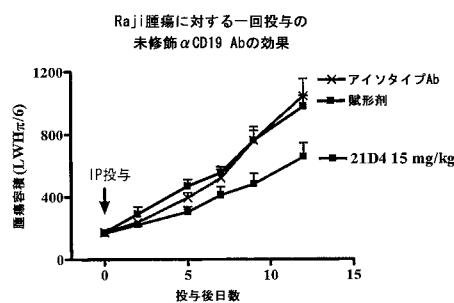
【図29】



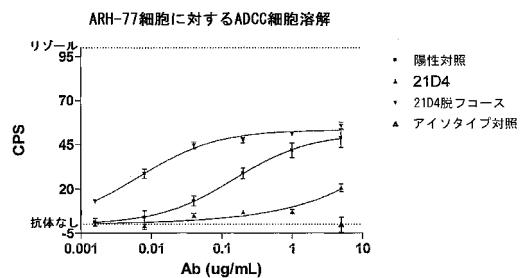
【図30】



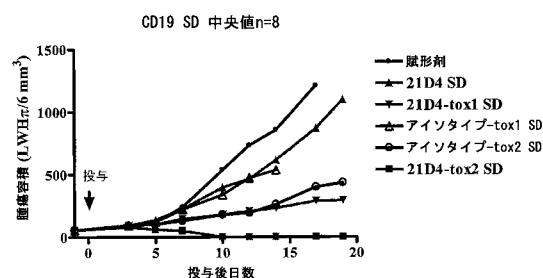
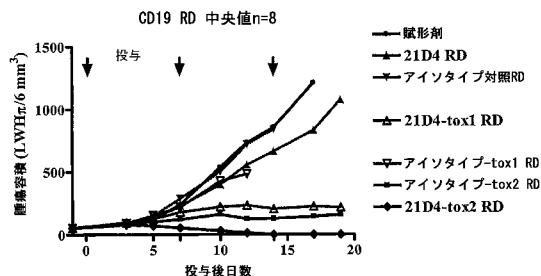
B)



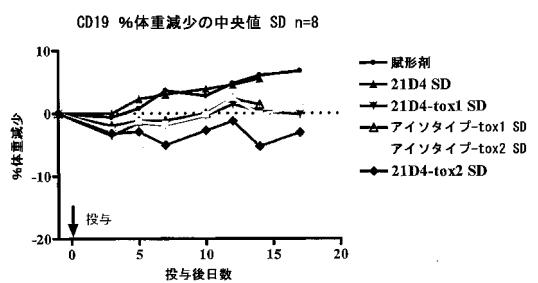
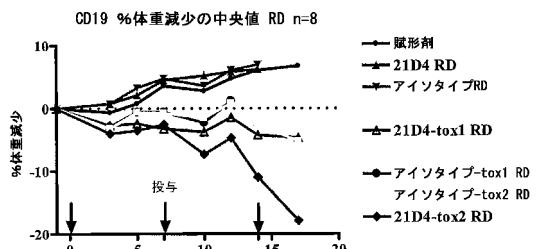
【図31】



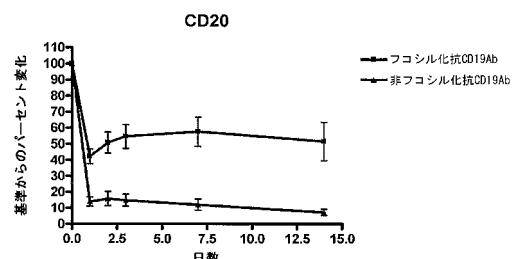
【図32】



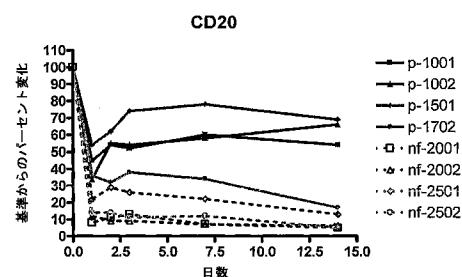
【図33】



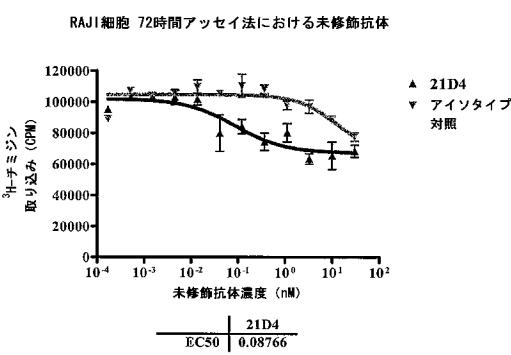
【図34】



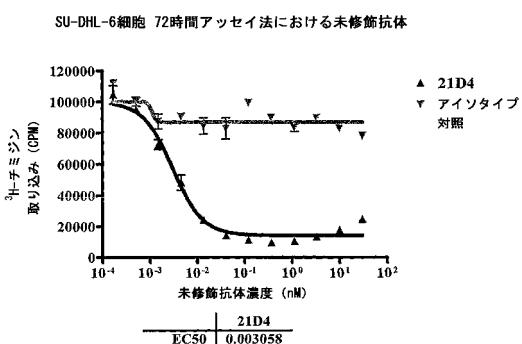
【図35】



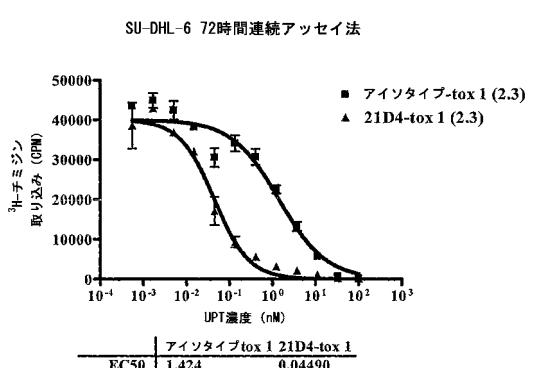
【図36A】



【図36B】



【図36C】



【配列表】

0005215180000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 12 N	1/15	(2006.01)	C 12 N	15/00
C 12 N	1/19	(2006.01)	C 12 N	1/15
C 12 N	1/21	(2006.01)	C 12 N	1/19
C 12 N	5/10	(2006.01)	C 12 N	1/21
C 12 P	21/08	(2006.01)	C 12 N	5/00 101
			C 12 P	21/08

(31)優先権主張番号 60/804,083

(32)優先日 平成18年6月6日(2006.6.6)

(33)優先権主張国 米国(US)

前置審査

(74)代理人 100170520

弁理士 澤本 真奈美

(72)発明者 ラオ - ナイク チェタナ

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ウォルナット クリーク マッターホーン ドライブ 56
5

(72)発明者 キング デイビッド ジョン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ベルモント テラス ドライブ 1744

(72)発明者 リュー ジー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 パロアルト マダックス ドライブ 3209

(72)発明者 ファン ハイチュン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 フレモント クレストウッド ストリート 4329

(72)発明者 パスモア デイビッド ビー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンカルロス ハル ドライブ 1630

(72)発明者 ベル アラステア フレイサー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 マウンテン ピュー ハイ スクール ウェイ 900 ア
パートメント 2135

(72)発明者 カーダレリ ジョセфин エム .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンカルロス レスリー ドライブ 126

(72)発明者 パン チン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ロスアルトス ヘリテージ コート 1235

(72)発明者 ティ ドウ ト ウエン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サンノゼ サドル ラック ストリート 1390 #44
5

(72)発明者 チェン シャーリン

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サニーベイル モンタナ テラス 661

(72)発明者 タナマチ ドーン エム .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ミルピタス コットンウッド ドライブ 521

審査官 北村 悠美子

(56)参考文献 国際公開第2005/012493 (WO, A1)

特表2002-512020 (JP, A)

特表平11-505704 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 07K 16/00 - 16/46

C 12N 15/00 - 15/90

WPI

CA / BIOSIS / MEDLINE (STN)

UniProt / GeneSeq