

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6215704号
(P6215704)

(45) 発行日 平成29年10月18日 (2017.10.18)

(24) 登録日 平成29年9月29日 (2017.9.29)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 P 37/00 (2006.01)
 C 0 7 K 16/28 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 P 37/00

請求項の数 58 (全 69 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2013-524483 (P2013-524483)
 (86) (22) 出願日 平成23年8月19日 (2011.8.19)
 (65) 公表番号 特表2013-537547 (P2013-537547A)
 (43) 公表日 平成25年10月3日 (2013.10.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2011/051572
 (87) 国際公開番号 W02012/022985
 (87) 国際公開日 平成24年2月23日 (2012.2.23)
 審査請求日 平成26年5月28日 (2014.5.28)
 審査番号 不服2016-5305 (P2016-5305/J1)
 審査請求日 平成28年4月11日 (2016.4.11)
 (31) 優先権主張番号 1013989.7
 (32) 優先日 平成22年8月20日 (2010.8.20)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(73) 特許権者 505093736
 ユニバーシティ、オブ、サウサンプトン
 イギリス国 サウサンプトン エスオー 1
 7 1 ビージェー、ハイフィールド、ユニ
 バーシティ ロード
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニクス国際特許事務所
 (72) 発明者 クレグ、マーク
 イギリス国 サウサンプトン ジェネラル
 ホスピタル エスオー 1 6 6 ワイディ
 ー、ファカルティ オブ メディシン、ユ
 ニバーシティ オブ サウサンプトン、キ
 ャンサー サイエンス ユニット

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 F C ガンマ R I I B (C D 3 2 B) 特異的抗体および C D 2 0 特異的抗体の併用使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) F c R I I b と結合することができる F c ドメインを有する、標的細胞の細胞表面抗原と特異的に結合する抗体分子

と、組み合わせて

(i i) F c R I I b が前記抗体分子の前記 F c ドメインに結合することを妨げるか、または低減させる薬剤

を含む組成物であって、

前記細胞表面抗原が、C D 1 9 または C D 2 0 から選択され、

前記薬剤は、抗体；キメラ抗体；単鎖抗体；F a b 抗体フラグメント、F (a b ')₂ 抗体フラグメント、F v 抗体フラグメント、S c F v 抗体フラグメントまたは d A b 抗体フラグメントのいずれかであり、

コントロールに対して F c R I I b 発現の上昇したレベルを有する標的細胞を有する患者の処置において使用されるためのものであり、

前記コントロールは、同じガン又は炎症性疾患を有する患者における同じタイプの細胞における F c R I I b 発現のメジアンレベルであることを特徴とする組成物。

【請求項 2】

前記薬剤は、前記標的細胞上に存在する F c R I I b が前記抗体分子の前記 F c ドメインに結合することを妨げるか、または低下させる、請求項 1 に記載の組成物。

【請求項 3】

10

20

F c R I I b と結合することができる F c ドメインを有する、標的細胞の細胞表面抗原と特異的に結合する前記抗体分子は F c R I I b 依存的様式で前記標的細胞内に内部移行されることが可能である、請求項 1 又は 2 に記載の組成物。

【請求項 4】

F c R I I b が前記抗体分子の前記 F c ドメインに結合することを妨げるか、または低減させる前記薬剤はさらに、前記抗体分子の前記標的細胞内への内部移行を妨げるか、または低減させる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 5】

前記標的細胞がガン細胞である、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 6】

前記標的細胞が B 細胞である、請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 7】

処置される前記患者がガン患者であり、かつ、前記処置がガン処置である、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 8】

前記ガンが、非ホジキンリンパ腫である、請求項 5 ~ 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 9】

前記ガンが、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫または慢性リンパ性白血病から選択される、請求項 5 ~ 8 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 10】

前記薬剤は、F c R I I b と特異的に結合する 1 つまたは複数の抗体分子である、請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 11】

前記 1 つまたは複数の抗体分子は、エフェクター細胞を動員することができるドメインを含まない、請求項 10 に記載の組成物。

【請求項 12】

前記 1 つまたは複数の抗体分子がモノクローナル抗体分子である、請求項 11 に記載の組成物。

【請求項 13】

前記薬剤は、下記の C D R を含む可変性重鎖 (V H) :

(i) 配列番号 29 および配列番号 30 および配列番号 31 ; または
 (i i) 配列番号 35 および配列番号 36 および配列番号 37 ; または
 (i i i) 配列番号 41 および配列番号 42 および配列番号 43 ; または
 (i v) 配列番号 47 および配列番号 48 および配列番号 49 ; または
 (v) 配列番号 53 および配列番号 54 および配列番号 55 ; または
 (v i) 配列番号 59 および配列番号 60 および配列番号 61 ; または
 (v i i) 配列番号 65 および配列番号 66 および配列番号 67 ; または
 (v i i i) 配列番号 71 および配列番号 72 および配列番号 73 ; または
 (i x) 配列番号 77 および配列番号 78 および配列番号 79 ; または
 (x) 配列番号 83 および配列番号 84 および配列番号 85 ; または
 (x i) 配列番号 89 および配列番号 90 および配列番号 91 ; または
 (x i i) 配列番号 95 および配列番号 96 および配列番号 97 ; または
 (x i i i) 配列番号 101 および配列番号 102 および配列番号 103
 を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 14】

前記薬剤は、下記の C D R を含む可変性軽鎖 (V L) :

(i) 配列番号 32 および配列番号 33 および配列番号 34 ; または
 (i i) 配列番号 38 および配列番号 39 および配列番号 40 ; または
 (i i i) 配列番号 44 および配列番号 45 および配列番号 46 ; または
 (i v) 配列番号 50 および配列番号 51 および配列番号 52 ; または

10

20

30

40

50

(v) 配列番号 56 および配列番号 57 および配列番号 58 ; または
(vi) 配列番号 62 および配列番号 63 および配列番号 64 ; または
(vii) 配列番号 68 および配列番号 69 および配列番号 70 ; または
(viii) 配列番号 74 および配列番号 75 および配列番号 76 ; または
(ix) 配列番号 80 および配列番号 81 および配列番号 82 ; または
(x) 配列番号 86 および配列番号 87 および配列番号 88 ; または
(xi) 配列番号 92 および配列番号 93 および配列番号 94 ; または
(xii) 配列番号 98 および配列番号 99 および配列番号 100 ; または
(xiii) 配列番号 104 および配列番号 105 および配列番号 106
を含む、請求項 1 ~ 13 のいずれかに記載の組成物。

10

【請求項 15】

前記薬剤は、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 からなる群から選択される可変性重鎖 (VH) アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 14 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 16】

前記薬剤は、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 からなる群から選択される可変性軽鎖 (VL) アミノ酸配列を含む、請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の組成物。

20

【請求項 17】

前記薬剤は、下記の CDR アミノ酸配列：

(i) 配列番号 29 および配列番号 30 および配列番号 31 および配列番号 32 および配列番号 33 および配列番号 34 ; または
(ii) 配列番号 35 および配列番号 36 および配列番号 37 および配列番号 38 および配列番号 39 および配列番号 40 ; または
(iii) 配列番号 41 および配列番号 42 および配列番号 43 および配列番号 44 および配列番号 45 および配列番号 46 ; または
(iv) 配列番号 47 および配列番号 48 および配列番号 49 および配列番号 50 および配列番号 51 および配列番号 52 ; または
(v) 配列番号 53 および配列番号 54 および配列番号 55 および配列番号 56 および配列番号 57 および配列番号 58 ; または
(vi) 配列番号 59 および配列番号 60 および配列番号 61 および配列番号 62 および配列番号 63 および配列番号 64 ; または
(vii) 配列番号 65 および配列番号 66 および配列番号 67 および配列番号 68 および配列番号 69 および配列番号 70 ; または
(viii) 配列番号 71 および配列番号 72 および配列番号 73 および配列番号 74 および配列番号 75 および配列番号 76 ; または
(ix) 配列番号 77 および配列番号 78 および配列番号 79 および配列番号 80 および配列番号 81 および配列番号 82 ; または
(x) 配列番号 83 および配列番号 84 および配列番号 85 および配列番号 86 および配列番号 87 および配列番号 88 ; または
(xi) 配列番号 89 および配列番号 90 および配列番号 91 および配列番号 92 および配列番号 93 および配列番号 94 ; または
(xii) 配列番号 95 および配列番号 96 および配列番号 97 および配列番号 98 および配列番号 99 および配列番号 100 ; または
(xiii) 配列番号 101 および配列番号 102 および配列番号 103 および配列番号 104 および配列番号 105 および配列番号 106
を含む、請求項 1 ~ 16 のいずれかに記載の組成物。

30

40

【請求項 18】

50

前記薬剤は、下記のアミノ酸配列：

- (i) 配列番号 3 および配列番号 1 6 ; または
- (i i) 配列番号 4 および配列番号 1 7 ; または
- (i i i) 配列番号 5 および配列番号 1 8 ; または
- (i v) 配列番号 6 および配列番号 1 9 ; または
- (v) 配列番号 7 および配列番号 2 0 ; または
- (v i) 配列番号 8 および配列番号 2 1 ; または
- (v i i) 配列番号 9 および配列番号 2 2 ; または
- (v i i i) 配列番号 1 0 および配列番号 2 3 ; または
- (i x) 配列番号 1 1 および配列番号 2 4 ; または
- (x) 配列番号 1 2 および配列番号 2 5 ; または
- (x i) 配列番号 1 3 および配列番号 2 6 ; または
- (x i i) 配列番号 1 4 および配列番号 2 7 ; または
- (x i i i) 配列番号 1 5 および配列番号 2 8

を含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 1 9】

前記薬剤は、F c R I I b が前記抗体の前記 F c ドメインに結合することを妨げるか、または低減させるために請求項 1 3 ~ 1 8 において定義されるような薬剤と競合することができる、請求項 1 ~ 1 2 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 0】

前記薬剤は F c R I I b のシグナル伝達を妨げるか、または低減させる、請求項 1 ~ 1 9 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 1】

前記薬剤は前記標的細胞による前記抗体分子の内部移行を妨げるか、または低減させる、請求項 1 ~ 2 0 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 2】

細胞表面抗原と特異的に結合する前記抗体分子が C D 2 0 抗体である、請求項 1 ~ 2 1 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 3】

前記 C D 2 0 抗体が I 型 C D 2 0 抗体である、請求項 2 2 に記載の組成物。

【請求項 2 4】

前記細胞表面抗原が C D 2 0 であり、かつ、細胞表面抗原に特異的に結合する前記抗体分子が I 型抗体である、請求項 1 ~ 2 3 のいずれかに記載の組成物。

【請求項 2 5】

抗体分子の F c ドメインと、標的細胞上の F c R I I b との間における結合を妨げるか、または低減させるための薬剤の使用であって、

前記抗体分子は前記標的細胞の表面抗原と特異的に結合し、

前記細胞表面抗原が、C D 1 9 または C D 2 0 から選択され、

前記薬剤は、抗体；キメラ抗体；単鎖抗体；F a b 抗体フラグメント、F (a b ') ₂ 抗体フラグメント、F v 抗体フラグメント、S c F v 抗体フラグメントまたは d A b 抗体フラグメントのいずれかであり、

コントロールに対して F c R I I b 発現の上昇したレベルを有する標的細胞を有する患者の処置において使用されるための医薬品の製造においてであり、

前記コントロールは、同じガン又は炎症性疾患を有する患者における同じタイプの細胞における F c R I I b 発現のメジアンレベルであることを特徴とする使用。

【請求項 2 6】

前記薬剤は、前記標的細胞上に存在する F c R I I b が前記抗体分子の前記 F c ドメインに結合することを妨げるか、または低下させる、請求項 2 5 に記載の使用。

【請求項 2 7】

F c R I I b と結合することができる F c ドメインを有する、標的細胞の細胞表面抗

10

20

30

40

50

原と特異的に結合する前記抗体分子は F c R I I b 依存的様式で前記標的細胞内に内部移行されることが可能である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の使用。

【請求項 2 8】

F c R I I b が前記抗体分子の前記 F c ドメインに結合することを妨げるか、または低減させる前記薬剤はさらに、前記抗体分子の前記標的細胞内への内部移行を妨げるか、または低減させる、請求項 2 5 ~ 2 7 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 9】

前記標的細胞がガン細胞である、請求項 2 5 ~ 2 8 のいずれかに記載の使用。

【請求項 3 0】

前記標的細胞が B 細胞である、請求項 2 5 ~ 2 9 のいずれかに記載の使用。

10

【請求項 3 1】

処置される前記患者がガン患者であり、かつ、前記処置がガン処置である、請求項 2 5 ~ 3 0 のいずれかに記載の使用。

【請求項 3 2】

前記ガンが、非ホジキンリンパ腫である、請求項 2 9 ~ 3 1 のいずれかに記載の使用。

【請求項 3 3】

前記ガンが、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫または慢性リンパ性白血病から選択される、請求項 2 9 ~ 3 2 のいずれかに記載の使用。

【請求項 3 4】

20

前記薬剤は、F c R I I b と特異的に結合する 1 つまたは複数の抗体分子である、請求項 2 5 ~ 3 3 のいずれかに記載の使用。

【請求項 3 5】

前記 1 つまたは複数の抗体分子は、エフェクター細胞を動員することができるドメインを含まない、請求項 3 4 に記載の使用。

【請求項 3 6】

前記 1 つまたは複数の抗体分子がモノクローナル抗体分子である、請求項 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 7】

前記薬剤は、下記の C D R を含む可変性重鎖 (V H) :

30

(i) 配列番号 2 9 および配列番号 3 0 および配列番号 3 1 ; または

(i i) 配列番号 3 5 および配列番号 3 6 および配列番号 3 7 ; または

(i i i) 配列番号 4 1 および配列番号 4 2 および配列番号 4 3 ; または

(i v) 配列番号 4 7 および配列番号 4 8 および配列番号 4 9 ; または

(v) 配列番号 5 3 および配列番号 5 4 および配列番号 5 5 ; または

(v i) 配列番号 5 9 および配列番号 6 0 および配列番号 6 1 ; または

(v i i) 配列番号 6 5 および配列番号 6 6 および配列番号 6 7 ; または

(v i i i) 配列番号 7 1 および配列番号 7 2 および配列番号 7 3 ; または

(i x) 配列番号 7 7 および配列番号 7 8 および配列番号 7 9 ; または

(x) 配列番号 8 3 および配列番号 8 4 および配列番号 8 5 ; または

40

(x i) 配列番号 8 9 および配列番号 9 0 および配列番号 9 1 ; または

(x i i) 配列番号 9 5 および配列番号 9 6 および配列番号 9 7 ; または

(x i i i) 配列番号 1 0 1 および配列番号 1 0 2 および配列番号 1 0 3

を含む、請求項 2 5 ~ 3 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 3 8】

前記薬剤は、下記の C D R を含む可変性軽鎖 (V L) :

(i) 配列番号 3 2 および配列番号 3 3 および配列番号 3 4 ; または

(i i) 配列番号 3 8 および配列番号 3 9 および配列番号 4 0 ; または

(i i i) 配列番号 4 4 および配列番号 4 5 および配列番号 4 6 ; または

(i v) 配列番号 5 0 および配列番号 5 1 および配列番号 5 2 ; または

50

(v) 配列番号 56 および配列番号 57 および配列番号 58 ; または
(vi) 配列番号 62 および配列番号 63 および配列番号 64 ; または
(vii) 配列番号 68 および配列番号 69 および配列番号 70 ; または
(viii) 配列番号 74 および配列番号 75 および配列番号 76 ; または
(ix) 配列番号 80 および配列番号 81 および配列番号 82 ; または
(x) 配列番号 86 および配列番号 87 および配列番号 88 ; または
(xi) 配列番号 92 および配列番号 93 および配列番号 94 ; または
(xii) 配列番号 98 および配列番号 99 および配列番号 100 ; または
(xiii) 配列番号 104 および配列番号 105 および配列番号 106
を含む、請求項 25 ~ 37 のいずれかに記載の使用。

10

【請求項 39】

前記薬剤は、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14 および配列番号 15 からなる群から選択される可変性重鎖 (VH) アミノ酸配列を含む、請求項 25 ~ 38 のいずれかに記載の使用。

【請求項 40】

前記薬剤は、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、配列番号 26、配列番号 27 および配列番号 28 からなる群から選択される可変性軽鎖 (VL) アミノ酸配列を含む、請求項 25 ~ 39 のいずれかに記載の使用。

20

【請求項 41】

前記薬剤は、下記の CDR アミノ酸配列：

(i) 配列番号 29 および配列番号 30 および配列番号 31 および配列番号 32 および配列番号 33 および配列番号 34 ; または
(ii) 配列番号 35 および配列番号 36 および配列番号 37 および配列番号 38 および配列番号 39 および配列番号 40 ; または
(iii) 配列番号 41 および配列番号 42 および配列番号 43 および配列番号 44 および配列番号 45 および配列番号 46 ; または
(iv) 配列番号 47 および配列番号 48 および配列番号 49 および配列番号 50 および配列番号 51 および配列番号 52 ; または
(v) 配列番号 53 および配列番号 54 および配列番号 55 および配列番号 56 および配列番号 57 および配列番号 58 ; または
(vi) 配列番号 59 および配列番号 60 および配列番号 61 および配列番号 62 および配列番号 63 および配列番号 64 ; または
(vii) 配列番号 65 および配列番号 66 および配列番号 67 および配列番号 68 および配列番号 69 および配列番号 70 ; または
(viii) 配列番号 71 および配列番号 72 および配列番号 73 および配列番号 74 および配列番号 75 および配列番号 76 ; または
(ix) 配列番号 77 および配列番号 78 および配列番号 79 および配列番号 80 および配列番号 81 および配列番号 82 ; または
(x) 配列番号 83 および配列番号 84 および配列番号 85 および配列番号 86 および配列番号 87 および配列番号 88 ; または
(xi) 配列番号 89 および配列番号 90 および配列番号 91 および配列番号 92 および配列番号 93 および配列番号 94 ; または
(xii) 配列番号 95 および配列番号 96 および配列番号 97 および配列番号 98 および配列番号 99 および配列番号 100 ; または
(xiii) 配列番号 101 および配列番号 102 および配列番号 103 および配列番号 104 および配列番号 105 および配列番号 106
を含む、請求項 25 ~ 40 のいずれかに記載の使用。

30

40

【請求項 42】

50

前記薬剤は、下記のアミノ酸配列：

- (i) 配列番号 3 および配列番号 1 6 ; または
- (i i) 配列番号 4 および配列番号 1 7 ; または
- (i i i) 配列番号 5 および配列番号 1 8 ; または
- (i v) 配列番号 6 および配列番号 1 9 ; または
- (v) 配列番号 7 および配列番号 2 0 ; または
- (v i) 配列番号 8 および配列番号 2 1 ; または
- (v i i) 配列番号 9 および配列番号 2 2 ; または
- (v i i i) 配列番号 1 0 および配列番号 2 3 ; または
- (i x) 配列番号 1 1 および配列番号 2 4 ; または
- (x) 配列番号 1 2 および配列番号 2 5 ; または
- (x i) 配列番号 1 3 および配列番号 2 6 ; または
- (x i i) 配列番号 1 4 および配列番号 2 7 ; または
- (x i i i) 配列番号 1 5 および配列番号 2 8

を含む、請求項 2 5 ~ 4 1 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 3】

前記薬剤は、F c R I I b が前記抗体の前記 F c ドメインに結合することを妨げるか、または低減させるために請求項 3 7 ~ 4 2 において定義されるような薬剤と競合することができる、請求項 2 5 ~ 3 6 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 4】

前記薬剤は F c R I I b のシグナル伝達を妨げるか、または低減させる、請求項 2 5 ~ 4 3 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 5】

前記薬剤は前記標的細胞による前記抗体分子の内部移行を妨げるか、または低減させる、請求項 2 5 ~ 4 4 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 6】

細胞表面抗原と特異的に結合する前記抗体分子が C D 2 0 抗体である、請求項 2 5 ~ 4 5 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 7】

前記 C D 2 0 抗体が I 型 C D 2 0 抗体である、請求項 4 6 に記載の使用。

【請求項 4 8】

前記細胞表面抗原が C D 2 0 であり、かつ、細胞表面抗原に特異的に結合する前記抗体分子が I 型抗体である、請求項 2 5 ~ 4 7 のいずれかに記載の使用。

【請求項 4 9】

標的細胞表面抗原と特異的に結合し、かつ、F c R I I b と結合することができる F c ドメインを有する抗体分子による処置に対する患者の標的細胞の応答を予測するための方法であって、前記標的細胞における F c R I I b の発現レベルを求めることを含み、それにより、コントロールに対して F c R I I b の上昇したレベルが前記抗体分子による処置に対する応答における低下または前記抗体分子による処置に対する応答の非存在を予測するものであり、

前記細胞表面抗原が、C D 1 9 または C D 2 0 から選択され、

前記コントロールは、同じガン又は炎症性疾患を有する患者における同じタイプの細胞における F c R I I b 発現のメジアンレベルであることを特徴とする方法。

【請求項 5 0】

F c R I I b と結合することができる F c ドメインを有する、標的細胞の細胞表面抗原と特異的に結合する前記抗体分子は F c R I I b 依存的様式で前記標的細胞内に内部移行されることが可能である、請求項 4 9 に記載の方法。

【請求項 5 1】

前記標的細胞がガン細胞である、請求項 4 9 又は 5 0 に記載の方法。

【請求項 5 2】

10

20

30

40

50

前記標的細胞がB細胞である、請求項49～51のいずれかに記載の方法。

【請求項53】

処置される前記患者がガン患者であり、かつ、前記処置がガン処置である、請求項49～52のいずれかに記載の方法。

【請求項54】

前記ガンが、非ホジキンリンパ腫である、請求項51～53のいずれかに記載の方法。

【請求項55】

前記ガンが、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫または慢性リンパ性白血病から選択される、請求項51～54のいずれかに記載の方法。

10

【請求項56】

細胞表面抗原と特異的に結合する前記抗体分子がCD20抗体である、請求項49～55のいずれかに記載の方法。

【請求項57】

前記CD20抗体がI型CD20抗体である、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

前記細胞表面抗原がCD20であり、かつ、細胞表面抗原に特異的に結合する前記抗体分子がI型抗体である、請求項49～57のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

20

【0001】

本発明は、抗体のFcドメインと、細胞表面のFcRIIbとの間における結合を妨げる薬剤に関連する。本発明はまた、抗体に基づく組成物により処置される標的細胞、例えば、ガン細胞などを有する患者を処置することにおいて使用されるためのそのような薬剤を含む組成物に関連する。

【0002】

さらに、本発明は、抗体に基づく処置、特に、抗体リガンドがFcRIIb媒介の内部移行を受けやすい抗体に基づく処置に対する標的細胞の応答を予測するための方法、ならびに、とりわけ、そのような処置に対する標的細胞の応答についての予後マーカーとしてのFcRIIb発現レベルおよび/またはFcRIIbを介する治療抗体媒介内部移行の使用に関連する。

30

【背景技術】

【0003】

モノクローナル抗体(mAb)が治療効果を発揮し得る機構は、生来のエフェクターシステム、例えば、細胞傷害性細胞(例えば、マクロファージ)および酵素(例えば、補体)などを動員し、その後、これらが、mAbが結合する細胞を標的とすることにより、ガン細胞および他の望まれない細胞の除去を刺激することによってである。

【0004】

例えば、I型抗CD20mAb(例えば、現在のマーケットリーダーであるリツキシマブなど)は、mAbの抗原結合ドメインを介してであるが、B細胞の表面のCD20分子に結合し、これらの標的B細胞を除くことによって働く。それらは、これらのエフェクター細胞の表面に発現するFcガンマ受容体(FcγR)を介してmAbのFcドメインと相互作用するエフェクター細胞を動員し、活性化することによってこのことを行う。

40

【0005】

抗CD20モノクローナル抗体(mAb)のリツキシマブは、濾胞性リンパ腫(FL)およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)の患者の全生存(OS)を改善している(1～4)。マントル細胞リンパ腫(MCL)では、ほとんどの応答のみが認められ(5)、一方、慢性リンパ性白血病(CLL)では、最初の単剤リツキシマブ試験は他の非ホジキンリンパ腫(NHL)対応物の場合に見られるほどの際立った応答をもたらさなかった(このことが(6)において総説される)。リンパ腫の一部はリツキシマブに対

50

する元来的な抵抗性を示すか、または、最終的には、リツキシマブを含有する併用治療に対して抵抗性になる(7)。リツキシマブ処置に対する種々のNHLサブタイプのこの処置抵抗性および認められた感受性の背後にある分子的基础は現在不明であり、しかし、この分子的基础には、CD20発現のレベル(8~10)、補体防御分子(CD55およびCD59)の高発現(11、12)、アポトーシス抵抗性の発達(13)、および、低親和性対立因子の発現の結果としての最適でないFc-ガンマ-受容体(FcR)相互作用(14)が含まれるかもしれない。

【0006】

処置が最適でないか、または、抵抗性が明らかである場合、そのような抗体の有効性を増大させることが非常に望ましい。

【0007】

Fc:FcR相互作用が抗CD20mAbの効力にとって非常に重要であることが一般に受け入れられている(15~18)。このことと一致して、より大きい親和性の158V対立因子をFcRIIIaにおいて有するリンパ腫患者は、低親和性の158Fアロタイプを有するリンパ腫患者と比較して、リツキシマブに対してより良好に応答する(14)。このことは、多くの研究者に、mAbとFcRIIIaとの相互作用を、例えば、脱フコシル化により増強することに集中するようにさせている(19)。対照的に、ITAMを有する受容体、例えば、抗原についてのB細胞受容体(BCR)などによって受け取られる刺激性活性の負の調節因子として作用する阻害性FcRIIbおよび活性化FcRの潜在的影響にはあまり関心が向けられてこなかった。B細胞において、この相互作用は、免疫複合体の結合の後におけるB細胞の増殖を制限するために役立ち、これに対して、マクロファージにおいては、FcRIIbの会合により、細胞障害活性の阻害をもたらされる(15)。

【0008】

B細胞悪性腫瘍の中には、FcRIIbが、CLL/SLL、MCLおよびFLの表面に発現され、後者は特に転換時においてである。DLBCLでは、FcRIIbの発現はより弱く、したがって、このことから、相関がなぜ、その発現と、リツキシマブ-CHOP(R-CHOP)化学療法に対する応答との間において何ら明らかにできなかったかが説明される(20、21)。活性化FcRの場合と同様に、FcRIIbの活性に影響を与える多型もまた見出されており(22、23)、232I対立因子がBCR媒介のカルシウム流束を232T対立因子よりも効率的に阻害する。しかしながら、WengおよびLevy(24)は、これらの多型と、リツキシマブ治療に対する応答との間における相関をFL患者において立証することができなかった。

【0009】

増大する数の抗CD20mAbが臨床研究のために利用可能になっている。これらの様々な抗CD20mAbは、CD20を原形質膜において再分布させるそれらの能力および様々なエフェクターアッセイにおけるそれらの活性に従って、I型(例えば、リツキシマブ、オフアツムマブ)またはII型(例えば、トシツモマブ(B1)、GA101、11B8)として分類することができる(25~27)。

【0010】

本発明者らおよび他の研究者は、II型mAbは、B細胞標的を多くのモデル系において除くことがより強力であることを示している(18、19)。例えば、リソソーム細胞死を誘発するII型mAbのより大きな能力が明白でない、正常なB細胞除去のヒトCD20遺伝子組換え(Tg)モデルにおいて(25、27)、本発明者らは、この効力が内部移行に対するそれらの抵抗性と相関したことを明らかにした(28)。これは、リツキシマブのようなI型mAbとは対照的である。リツキシマブのようなI型mAbは、エネルギーおよび温度に依存し、かつ、アクチンの再分布を伴うプロセス(28)でCD20と一緒に細胞表面から迅速に内部移行するからである。モジュレーションの速度が、種々の起源(原発性腫瘍対細胞株; CLL対FL)に由来する細胞に関して顕著に異なった。だが、このことの分子的基础は説明されないままであった。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 1 】

国際公開WO 2 0 0 8 / 0 0 2 9 3 3は、F c ガンマ R I I B (C D 2 3 B) 特異的抗体およびC D 2 0 特異的抗体、ならびに、B細胞関連の疾患または障害を、両抗体の組合せを使用して処置する方法を記載する。しかしながら、患者の一部、すなわち、その標的細胞が上昇したレベルのF c R I I bを発現する患者を認識および/または処置するための教示または示唆、あるいは、抗体のどのタイプがF c R I I b抗体との併用処置のために好適であるかに対する教示または示唆が何ら認められない。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 1 2 】

予想外であったが、本発明者らは今回、モジュレーションが、細胞サブタイプにもかかわらず、F c R I I bの表面発現と強く相関し、過剰発現により、R a m o s細胞が、遅いモジュレート体から迅速なモジュレート体に変換され得ることを示す。F c R I I bの内部移行がC D 2 0と一緒に起こり、また、それに先立って、その活性化が生じた。まとめると、これらのデータは、種々のN H Lサブタイプのサブタイプ内およびサブタイプ間の両方におけるモジュレーション速度の以前に認められた不均一性についての明確な分子的根拠をもたらす。

【 0 0 1 3 】

すなわち、本発明者らは今回、驚くべきことに、抗原、例えば、C D 2 0などに対する抗体の有効性を決定する重要な要因が、同じ細胞の表面における阻害性F c R I I b (これは、C D 3 2、C D 3 2 B、C D 3 2 B 1、C D 3 2 B 2、F c R I I、F c R I I bまたはF c R I I Bとしてもまた知られており、C D 3 2、C D 3 2 B、C D 3 2 B 1、C D 3 2 B 2、F c R I I、F c R I I bまたはF c R I I Bを包含する)との相互作用であることを示す。この相互作用は標的細胞による抗体の内部移行を引き起こし、したがって、この内部移行により、抗体はエフェクター細胞のF c受容体と相互作用することができなくなる。本発明者らはさらに、薬剤、例えば、抗C D 3 2 m A bなどがこの内部移行を阻止し得ることを明らかにする。本発明者らはまた、そのような薬剤が、細胞表面抗原を標的化するために様々な抗体(例えば、リツキシマブなど)との組合せで使用され得ること、また、それらの活性を、正常なB細胞または腫瘍細胞を除くためにインビボにおいて改善し得ることを明らかにする。

【 0 0 1 4 】

本発明によると、(i) F c R I I bと結合することができるF cドメインを有する、標的細胞の細胞表面抗原と特異的に結合する抗体分子と、組み合わせて

(i i) F c R I I bが前記抗体分子の前記F cドメインに結合することを妨げるか、または低減させる薬剤を含む組成物であって、F c R I I b発現の上昇したレベルを有する標的細胞を有する患者の処置において使用されるためのものであることを特徴とする組成物を提供する。

【 0 0 1 5 】

別の側面によると、本発明は、抗体分子のF cドメインと、標的細胞上のF c R I I bとの間における結合を妨げるか、または低減させる薬剤の使用であって、前記抗体分子は前記標的細胞の表面抗原と特異的に結合し、F c R I I b発現の上昇したレベルを有する標的細胞を有する患者の処置において使用されるための医薬品の製造においてであることを特徴とする使用を提供する。

【 0 0 1 6 】

別の側面によると、本発明は、F c R I I bを発現する標的細胞を有する患者を処置する方法であって、(i) F c R I I bと結合することができるF cドメインを有する、前記標的細胞の表面抗原と特異的に結合する抗体分子と、組み合わせて(i i) 前記抗体分子の前記F cドメインと、F c R I I bとの間における結合を妨げるか、または低減させる薬剤を投与することを含み、かつ、前記患者が、それらの標的細胞が上昇したレベルのF c R I I bを発現することに基づいて選択されることを特徴とする方法を提供

する。

【0017】

本発明の前記組成物、使用または方法の特定の実施形態において、前記薬剤は、前記標的細胞上に存在するFcRIIbが前記抗体分子の前記Fcドメインに結合することを妨げるか、または低下させる。

【0018】

別の側面によると、本発明は、標的細胞におけるFcRIIb発現の使用であって、FcRIIbと結合することができるFcドメインを有する、前記標的細胞の表面抗原に特異的に結合する抗体分子による処置に対する前記標的細胞の応答についての予後マーカーとしての使用であり、それにより、FcRIIbの上昇したレベルが前記抗体分子による処置に対する応答における低下または前記抗体分子による処置に対する応答の非存在を示すものである、使用を提供する。

10

【0019】

1つの実施形態において、標的細胞におけるFcRIIb発現の予後マーカーとしての使用は、標的細胞におけるFcRIIc発現の予後マーカーとしての使用を必要としない。

【0020】

別の側面によると、本発明は、標的細胞表面抗原と特異的に結合し、かつ、FcRIIbと結合することができるFcドメインを有する抗体分子による処置に対する患者の標的細胞の応答を予測するための方法であって、前記標的細胞におけるFcRIIbの発現レベルを求めることを含み、それにより、FcRIIbの上昇したレベルが前記抗体分子による処置に対する応答における低下または前記抗体分子による処置に対する応答の非存在を予測するものであることを特徴とする方法を提供する。

20

【0021】

1つの実施形態において、患者の標的細胞の応答を予測するための方法は、標的細胞上のFcRIIbの発現レベルを求めることを含み、かつ、標的細胞上のFcRIIcの発現レベルを求めることをさらに含まない。

【0022】

必ずしもすべての抗体が、それらの共通するFc結合抗体定常ドメインおよび知られているFcガンマ受容体結合能にもかかわらず、FcRIIb依存的様式で内部移行されず、このことにより、FcRIIb機能調節試薬を含む併用治療による治療的成功のために、また、逆に、患者に利益をもたらさないことになる処置を回避するために非常に重要である好適な抗体の特定が行われることが明らかにされている。

30

【0023】

本発明の前記組成物、使用または方法の特定の実施形態において、FcRIIbと結合することができるFcドメインを有する、標的細胞の細胞表面抗原と特異的に結合する前記抗体分子はFcRIIb依存的様式で前記標的細胞内に内部移行されることが可能である。

【0024】

本発明の組成物、使用または方法のある特定の実施形態において、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを妨げるか、または低減させる薬剤はさらに、その後での抗体分子の細胞内への内部移行を妨げるか、または低減させる。

40

【0025】

本発明の組成物、使用または方法のある特定の実施形態において、標的細胞はガン細胞である。好都合には、標的細胞はB細胞である。

【0026】

好都合なことではあるが、本発明によれば、標的細胞における上昇したFcRIIb発現がコントロールまたは参照物に対して求められる。好ましくは、コントロールは、標的細胞と同じタイプの細胞におけるFcRIIb発現の正常なレベルである。

【0027】

50

「Fc RIIb発現の上昇したレベル」は下記において「定義」のもとで定義される。Fc RIIb発現レベルは、イソタイプコントロールに対するFc RIIbの幾何平均蛍光強度（Geo MFI）の比率として測定することができる。代替において、Fc RIIb発現レベルは腫瘍生検物の免疫組織化学によって測定することができる。当業者は、Fc RIIb発現レベルを求めるための多数の技術および方法論が存在することを理解するであろう。

【0028】

本発明はまた、Fc RIIb抗体との併用処置のために好適である抗体、すなわち、標的細胞表面からFc RIIb依存的様式で内部移行されるそのような抗体をどのようにして特定するかを教示する。本発明はさらに、Fc RIIb抗体との併用処置のために好適である患者サブセットを特定するための手段を提供する。

10

【0029】

別の局面において、本発明は、標的細胞表面抗原に対する抗体のFcドメインと、標的細胞上のFc RIIbとの間における結合を低減させるか、または妨げる薬剤を特定するためのアッセイであって、Fcドメインと、Fc RIIbとの間における結合の程度を試験剤の存在下および非存在下で求めることを含むアッセイを提供する。試験剤が、FcドメインがFc RIIbに結合することを低減させるか、または妨げるならば、有用な薬剤が特定される。そのようなアッセイはまた、どの薬剤（例えば、抗体分子）が抗Fc RIIb抗体との併用治療のために好適であるかを特定するためにも有用である。

【0030】

20

別の好ましい実施形態において、本発明の使用および方法の実施において有用である薬剤を特定するためのアッセイは、ウエスタンブロッティングによって検出されるような細胞内ITIMモチーフにおけるチロシン-293のリン酸化によって示されるように、Fc RIIbの刺激/シグナル伝達を阻止する薬剤についてスクリーニングすることを伴う。例えば、Raji細胞が、リン酸化Fc RIIbについての免疫ブロッティングの前に抗Fc RIIb試験剤の存在下または非存在下で細胞表面抗原に対する抗体、例えば、抗CD20mAbのリツキシマブとともに培養される。リン酸化Fc RIIbの量が、リツキシマブによって刺激された細胞では上昇するが、AT10を阻止剤として使用する図4Aに示されるのと同様な試験剤の添加によって阻害されるはずである。加えて、これらの薬剤は好ましくは、図1Aに示されるクエンチングアッセイによるリツキシマブの内部移行もまた阻止するはずである。図2Bは、抗Fc RIIb阻止実体、この場合にはAT10による阻止の典型的な一例を示す。そのようなアッセイはまた、どの薬剤（例えば、抗体分子）が抗Fc RIIb抗体との併用治療のために好適であるかを特定するためにも有用である。

30

【0031】

好ましい実施形態実施において、Fc RIIb抗体との併用治療のために好適である薬剤を特定するために使用されるアッセイは、薬剤（例えば、抗体分子）のFc RIIb発現細胞内への内部移行の割合を測定する。このアッセイは、この方法が、薬剤（例えば、抗体分子）標的発現細胞およびFc RIIb発現細胞とのインキュベーションの後で細胞表面に保持される薬剤（例えば、抗体分子）の割合を求めることを含み、それにより、細胞表面で利用可能な薬剤（例えば、抗体分子）の低下する割合（これは、増大する抗体分子の内部移行に相当する）が抗体分子による処置に対する応答を予測するものであるという点で特徴づけられる。

40

【0032】

Neubig et al (2003) Pharmacol. Rev. 55, 597-606（これは参照によって本明細書中に組み込まれる）は、Fc RIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを妨げるか、または低減させる薬剤を本発明に従って特定するためにスクリーニングされ得るリガンドの様々なクラスを記載する。

【0033】

上述のリガンドは小さい有機実体または無機実体であってもよく、しかし、好ましくは

50

ペプチドまたはポリペプチドである。典型的には、リガンドが小さい有機実体または有機実体であるとき、リガンドは M_r が50～2000であり、例えば、100～1000であり、例えば、100～500である。

【0034】

典型的には、リガンドは、 $mM \sim \mu M$ の K_d により、例えば、 μM （マイクロモル濃度）～ nM の範囲における K_d によりFcRIIbに結合する。一般には、最も低い K_d を有するリガンドが好ましい。

【0035】

リガンドは、ペプチド模倣体、核酸、ペプチド核酸（PNA）またはアプタマーであってもよい。リガンドはまた、脂質または炭水化物であってもよい。

10

【0036】

リガンドは、FcRIIbに結合するポリペプチドであってもよい。そのようなポリペプチド（ポリペプチドによって、オリゴペプチドが含まれる）は典型的には、500の M_r から50,000の M_r までであり、しかし、より大きくてもよい。

【0037】

ポリペプチドはまた、モジュール構成に基づく結合性タンパク質、例えば、アンキリン反復タンパク質、アルマジロ反復タンパク質、ロイシンリッチタンパク質、テトラトリオペプチド反復タンパク質または設計されたアンキリン反復タンパク質（DARPin）、あるいは、リボカリンまたはフィブロネクチンドメインまたはアフィリン足場に基づくタンパク質などであってもよい。

20

【0038】

好都合には、試験剤は試験化合物のライブラリーであり、好ましくは、ライブラリーは、ペプチドライブラリー、タンパク質ライブラリー、抗体ライブラリー、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリー、あるいは、scFVファージディスプレイライブラリーまたはFabファージディスプレイライブラリーのいずれかである。

【0039】

好ましくは、本発明による組成物、使用または方法において、薬剤（ii）は、FcRIIbと特異的に結合する1つまたは複数の抗体分子である。好都合には、そのような1つまたは複数の抗体分子は、エフェクター細胞を動員することができるドメインを含まない。エフェクター細胞を動員すること。

30

【0040】

好都合なことではあるが、そのような1つまたは複数の抗体分子は1つまたは複数のモノクローナル抗体である。

【0041】

好ましくは、薬剤はFcRIIbのシグナル伝達を妨げるか、または低減させる。一層より好ましくは、薬剤は、標的細胞による抗体分子の内部移行を妨げるか、または低減させる。

【0042】

下記の実施形態において、配列番号は、下記のクローン1～13において示される配列を示す。

40

【0043】

当業者は気づいているであろうように、3つの相補性決定領域（CDR）が免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の両方の可変ドメインには存在する。本明細書中に記載されるそれぞれのCDRに対するアミノ酸の帰属は、Kabat EA et al. 1991, In "Sequences of Proteins of Immunological Interest" Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242, pp xv-xvii.)による定義に従っている。

【0044】

当業者は気づいているかもしれないように、他の方法もまた、アミノ酸をそれぞれのCDRに帰属するために存在する。例えば、International Immunogenetics情報システム（IMGT（登録商標））（<http://www.imgt.org/> and Lefranc a

50

nd Lefranc “The Immunoglobulin FactsBook” published by Academic Press, 2001)。

【 0 0 4 5 】

1つの実施形態において、前記薬剤は、下記のC D Rを含む可変性重鎖（V H）：

（i）配列番号29および配列番号30および配列番号31；または
 （i i）配列番号35および配列番号36および配列番号37；または
 （i i i）配列番号41および配列番号42および配列番号43；または
 （i v）配列番号47および配列番号48および配列番号49；または
 （v）配列番号53および配列番号54および配列番号55；または
 （v i）配列番号59および配列番号60および配列番号61；または
 （v i i）配列番号65および配列番号66および配列番号67；または
 （v i i i）配列番号71および配列番号72および配列番号73；または
 （i x）配列番号77および配列番号78および配列番号79；または
 （x）配列番号83および配列番号84および配列番号85；または
 （x i）配列番号89および配列番号90および配列番号91；または
 （x i i）配列番号95および配列番号96および配列番号97；または
 （x i i i）配列番号101および配列番号102および配列番号103
 を含む。

10

【 0 0 4 6 】

好ましくは、前記薬剤は、下記のC D Rを含む可変性軽鎖（V L）：

（i）配列番号32および配列番号33および配列番号34；または
 （i i）配列番号38および配列番号39および配列番号40；または
 （i i i）配列番号44および配列番号45および配列番号46；または
 （i v）配列番号50および配列番号51および配列番号52；または
 （v）配列番号56および配列番号57および配列番号58；または
 （v i）配列番号62および配列番号63および配列番号64；または
 （v i i）配列番号68および配列番号69および配列番号70；または
 （v i i i）配列番号74および配列番号75および配列番号76；または
 （i x）配列番号80および配列番号81および配列番号82；または
 （x）配列番号86および配列番号87および配列番号88；または
 （x i）配列番号92および配列番号93および配列番号94；または
 （x i i）配列番号98および配列番号99および配列番号100；または
 （x i i i）配列番号104および配列番号105および配列番号106
 を含む。

20

30

【 0 0 4 7 】

選択的に、前記薬剤は、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14および配列番号15からなる群から選択される可変性重鎖（V H）アミノ酸配列を含む。

【 0 0 4 8 】

選択的に、前記薬剤は、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27および配列番号28からなる群から選択される可変性軽鎖（V L）アミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 4 9 】

好ましくは、前記薬剤は、下記のC D Rアミノ酸配列：

（i）配列番号29および配列番号30および配列番号31および配列番号32および配列番号33および配列番号34；または
 （i i）配列番号35および配列番号36および配列番号37および配列番号38および配列番号39および配列番号40；または
 （i i i）配列番号41および配列番号42および配列番号43および配列番号44およ

50

び配列番号 4 5 および配列番号 4 6 ; または
 (i v) 配列番号 4 7 および配列番号 4 8 および配列番号 4 9 および配列番号 5 0 および
 配列番号 5 1 および配列番号 5 2 ; または
 (v) 配列番号 5 3 および配列番号 5 4 および配列番号 5 5 および配列番号 5 6 および配
 列番号 5 7 および配列番号 5 8 ; または
 (v i) 配列番号 5 9 および配列番号 6 0 および配列番号 6 1 および配列番号 6 2 および
 配列番号 6 3 および配列番号 6 4 ; または
 (v i i) 配列番号 6 5 および配列番号 6 6 および配列番号 6 7 および配列番号 6 8 およ
 び配列番号 6 9 および配列番号 7 0 ; または
 (v i i i) 配列番号 7 1 および配列番号 7 2 および配列番号 7 3 および配列番号 7 4 お
 よび配列番号 7 5 および配列番号 7 6 ; または
 (i x) 配列番号 7 7 および配列番号 7 8 および配列番号 7 9 および配列番号 8 0 および
 配列番号 8 1 および配列番号 8 2 ; または
 (x) 配列番号 8 3 および配列番号 8 4 および配列番号 8 5 および配列番号 8 6 および配
 列番号 8 7 および配列番号 8 8 ; または
 (x i) 配列番号 8 9 および配列番号 9 0 および配列番号 9 1 および配列番号 9 2 および
 配列番号 9 3 および配列番号 9 4 ; または
 (x i i) 配列番号 9 5 および配列番号 9 6 および配列番号 9 7 および配列番号 9 8 およ
 び配列番号 9 9 および配列番号 1 0 0 ; または
 (x i i i) 配列番号 1 0 1 および配列番号 1 0 2 および配列番号 1 0 3 および配列番号
 1 0 4 および配列番号 1 0 5 および配列番号 1 0 6
 を含む。

【 0 0 5 0 】

よりさらに好ましくは、前記薬剤は、下記のアミノ酸配列：

(i) 配列番号 3 および配列番号 1 6 ; または
 (i i) 配列番号 4 および配列番号 1 7 ; または
 (i i i) 配列番号 5 および配列番号 1 8 ; または
 (i v) 配列番号 6 および配列番号 1 9 ; または
 (v) 配列番号 7 および配列番号 2 0 ; または
 (v i) 配列番号 8 および配列番号 2 1 ; または
 (v i i) 配列番号 9 および配列番号 2 2 ; または
 (v i i i) 配列番号 1 0 および配列番号 2 3 ; または
 (i x) 配列番号 1 1 および配列番号 2 4 ; または
 (x) 配列番号 1 2 および配列番号 2 5 ; または
 (x i) 配列番号 1 3 および配列番号 2 6 ; または
 (x i i) 配列番号 1 4 および配列番号 2 7 ; または
 (x i i i) 配列番号 1 5 および配列番号 2 8
 を含む。

【 0 0 5 1 】

本発明の薬剤はまた、配列番号 1 および配列番号 2 の定常領域 (C H) および (C L)
 を含む場合がある。

【 0 0 5 2 】

さらなる実施形態において、薬剤は、F c R I I b が抗体分子の F c ドメインに結合
 することを妨げるか、または低減させるために、本明細書中に記載される本発明の薬剤と
 競合することができ、例えば、上記実施形態において述べられるアミノ酸配列 (例えば、
 配列番号 1 ~ 配列番号 1 0 6) を含む薬剤と競合することができる。

【 0 0 5 3 】

F c R I I b が抗体分子の F c ドメインに結合することを妨げるか、または低減させ
 るために、本明細書中で定義されるような薬剤 (例えば、抗原分子など) と「競合するこ
 とができる」によって、試験された薬剤が、少なくとも部分的には、本明細書中に定義さ

10

20

30

40

50

れるような薬剤のFcRIIbへの結合を阻害するか、または、そうでない場合には妨害し、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを妨げることができること、または低減させることができることが意味される。

【0054】

例えば、薬剤は、本明細書中に記載される薬剤の結合を少なくとも10%、例えば、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%阻害するか、または、100%さえ阻害すること、および/あるいは、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを妨げるか、または低減させる薬剤の能力を少なくとも10%、例えば、少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%阻害するか、または、100%させ阻害することが可能であるかもしれない。

10

【0055】

競合的結合が、当業者には広く知られている方法によって、例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などによって求められ得る。

【0056】

ELISAアッセイを、エピトープ改変抗体または阻止抗体を評価するために使用することができる。競合性抗体を特定するために好適なさらなる方法が、Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Lane(これは参照によって本明細書中に組み込まれる)に開示される(例えば、567頁~569頁、574頁~576頁、583頁および590頁~612頁、1988、CSSL、NY、ISBN0-87969-314-2を参照のこと)。

20

【0057】

本発明の薬剤は下記の定常領域(CHおよびCL)を含むことができる：
IgG1-CH [配列番号1]

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT
YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNW
YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE
LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

30

-CL [配列番号2]

QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKS
HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【0058】

本発明の薬剤はクローン1~14の1つまたは複数の配列を含むことができる：

クローン1

40

VH [配列番号3]

【表1】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS	CAASGFTFS	NYGMH	WVRQAPGKGLEWVA	VISYDGSNKYYADSVKGRF
	FrH1			CDRH1
FrH2		CDRH2		
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	EWDAFDI	WGQGT	TLTVSS	
	FrH			CDRH3
FrH4				

50

-VL [配列番号16]

【表 2】

```

QSVLTQPPSASGTPGQRTISC[TGSSSNIGAGYDVH]WYQQLPGTAPKLLIY[SDNQRPS]GVPDRFSGSKSG
                                FrL1          CDRL1          FrL2
CDRL2          FrL3
TSASLAISGLRSEDEADYYC[AAWDDSLSGSWV]FGGGTKLTVLG
                                CDRL3          FrL4

```

10

C D R 領域

—
 CDRH1: NYGMH [配列番号29]
 CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号30]
 CDRH3: EWRDAFDI [配列番号31]

—
 CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号32]
 CDRL2: SDNQRPS [配列番号33]
 CDRL3: AAWDDSLSGSWV [配列番号34]

20

【 0 0 5 9 】

クローン 2

—
 -VH [配列番号4]

【表 3】

```

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[TYGMH]WVRQAPGKGLEWVA[VIAYDGSKKDYADSVKG]RFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR[EYRDAFDI]WGQGTLLTVSS

```

-VL [配列番号17]

【表 4】

```

QSVLTQPPSASGTPGQRTISC[TGSSSNIGAGYDVH]WYQQLPGTAPKLLIY[GNSNRPS]GVPDRFSGSKSGTTA
SLAISGLRSEDEADYYC[AAWDDSVSGWM]FGGGTKLTVLG

```

30

C D R 領域

—
 CDRH1: TYGMH [配列番号35]
 CDRH2: VIAYDGSKKDYADSVKG [配列番号36]
 CDRH3: EYRDAFDI [配列番号37]

40

—
 CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号38]
 CDRL2: GNSNRPS [配列番号39]
 CDRL3: AAWDDSVSGWM [配列番号40]

【 0 0 6 0 】

クローン 3

—
 -VH [配列番号5]

【表 5】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN NYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSNRYADSVKGRFTM
 SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DRWNGMDVWGQGTLLTVSS

-VL [配列番号18]

【表 6】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC SGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIY ANNQRPSGVPDRFSGSKSGTSA
 SLAISGLRSEADYYC AAWDDSLNGPWVFGGGTKLTVLG

10

—
C D R 領域

—
 CDRH1: NYGMH [配列番号41]
 CDRH2: VISYDGSNRYADSVKG [SEQ ID NO: 42]
 CDRH3: DRWNGMDV [配列番号43]

—
 CDRL1: SGSSSNIGAGYDVH [配列番号44]
 CDRL2: ANNQRPS [配列番号45]
 CDRL3: AAWDDSLNGPWV [配列番号46]

20

—
【0061】

クローン 4

—
-VH [配列番号6]

【表 7】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS SYGMHWVRQAPGKGLEWVA VISYDGSDTAYADSVKGRFTISR
 DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR DHSVIGAFDIWGQGTLLTVSS

30

-VL [配列番号19]

【表 8】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC SGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY DNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASL
 AISGLRSEADYYC SSYAGSNNVVFGGGTKLTVLG

C D R 領域

40

—
 CDRH1: SYGMH [配列番号47]
 CDRH2: VISYDGSDTAYADSVKG [配列番号48]
 CDRH3: DHSVIGAFDI [配列番号49]

—
 CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [配列番号50]
 CDRL2: DNNKRPS [配列番号51]
 CDRL3: SSYAGSNNVV [配列番号52]

【0062】

クローン 5

50

-VH [配列番号7]

【表 9】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDQLGEAFDIWGQGTLLTVSS

-VL [配列番号20]

【表 10】

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEADYYCATWDDSLSGPVFGGGTKLTVLG

10

C D R 領域

—
CDRH1: NYGMH [配列番号53]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号54]

CDRH3: DQLGEAFDI [配列番号55]

—
CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号56]

CDRL2: DNNKRPS [配列番号57]

CDRL3: ATWDDSLSGPV [配列番号58]

20

【0063】

クローン 6

-VH [配列番号8]

【表 11】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDYGMSSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGSSTYYADSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDIDYFDYWGQGTLLTVSS

30

-VL [配列番号21]

【表 12】

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNFGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYENNKRPSSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1: DYGMSS [配列番号59]

CDRH2: AISGSGSSTYYADSVKG [配列番号60]

CDRH3: GDIDYFDY [配列番号61]

—
CDRL1: TGSSSNFGAGYDVH [配列番号62]

CDRL2: ENNKRPS [配列番号63]

CDRL3: AAWDDSLNGPV [配列番号64]

40

【0064】

クローン 7

50

-VH [配列番号9]

【表 1 3】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[SYGMH]WVRQAPGKGLEWVA[VISYDGSNKYYADSVKG]RFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR[ERRDAFDI]WGQGTLLTVSS

-VL [配列番号22]

【表 1 4】

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC[SGSSSNIGAGYDVH]WYQQLPGTAPKLLIY[SDNQRPS]GVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYC[ATWDS DTPV]FGGGTKLTVLG

10

C D R 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号65]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号66]

CDRH3: ERRDAFDI [配列番号67]

—

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号68]

CDRL2: SDNQRPS [配列番号69]

CDRL3: ATWDS DTPV [配列番号70]

20

【 0 0 6 5 】

クローン 8

-VH [配列番号10]

【表 1 5】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[SYGMH]WVRQAPGKGLEWVA[VISYDGSNKYYADSVKG]RFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAR[DHSAAGYFDY]WGQGTLLTVSS

30

-VL [配列番号23]

【表 1 6】

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC[SGSSSNIGSNTVN]WYQQLPGTAPKLLIY[GNSIRPS]GGPDRFSGSKSGTSASL
AISGLRSEDEADYYC[ASWDDSLSSPV]FGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号71]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号72]

CDRH3: DHSAAGYFDY [配列番号73]

—

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [配列番号74]

CDRL2: GNSIRPS [配列番号75]

CDRL3: ASWDDSLSSPV [配列番号76]

40

【 0 0 6 6 】

クローン 9

50

-VH [配列番号11]

【表 1 7】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDSAIIDYAGSVKGRFTISR
DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEAAAGAFDIWGQGTLVTVSS

-VL [配列番号24]

【表 1 8】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTDRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVVFGGGTKLTVLG

10

C D R 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号77]

CDRH2: GISWDSAIIDYAGSVKG [配列番号78]

CDRH3: DEAAAGAFDI [配列番号79]

—
CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号80]

20

CDRL2: GNTDRPS [配列番号81]

CDRL3: AAWDDSLSGPVV [配列番号82]

—
【 0 0 6 7 】

クローン 1 3

-VH [配列番号15]

【表 1 9】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSYGISWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGNTYYADSVKGRFTISR
NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASVGAYANDAFDIWGQGTLVTVSS

30

-VL [配列番号28]

【表 2 0】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDTNRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

—
C D R 領域

40

CDRH1: SYGIS [配列番号101]

CDRH2: GISGSGGNTYYADSVKG [配列番号102]

CDRH3: SVGAYANDAFDI [配列番号103]

—
CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号104]

CDRL2: GDTNRPS [配列番号105]

CDRL3: AAWDDSLNGPV [配列番号106]

【 0 0 6 8 】

クローン 1 0

50

-VH [配列番号12]

【表 2 1】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWMAVISYDGSNKYYADSVKGRFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARELYDAFDIWGQGTLTVSS

-VL [配列番号25]

【表 2 2】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYADHRPSGVPDRFSGSKSGTSA
SLAISGLRSEADYYCASWDDSQRAVIFGGGTKLTVLG

10

C D R 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号83]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号84]

CDRH3: ELYDAFDI [配列番号85]

—
CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号86]

20

CDRL2: ADHRPS [配列番号87]

CDRL3: ASWDDSQRAVI [配列番号88]

【 0 0 6 9 】

クローン 1 1

-VH [配列番号13]

【表 2 3】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWMAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISR
DNSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARFEGYIILDYWGQGTLTVSS

30

-VL [配列番号26]

【表 2 4】

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYRDYERPSGVPDRFSGSKSGTSASL
AISGLRSEADYYCMAWDDSLSGVVIFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号89]

CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号90]

CDRH3: EFGYIILDY [配列番号91]

—
CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [配列番号92]

CDRL2: RDYERPS [配列番号93]

CDRL3: MAWDDSLSGVV [配列番号94]

【 0 0 7 0 】

クローン 1 2

40

50

-VH [配列番号14]

【表 2 5】

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTNKYYADSVRG RFTIS
RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR ETWDAFDVWGQGTLVTVSS

-VL [配列番号27]

【表 2 6】

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSSSNIGSNANWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSAS
LAISGLRSEADYYCQAWDSSTVVFSGGTKLTVLG

10

-
C D R 領域

CDRH1: NHGMH [配列番号95]

CDRH2: VISYDGTNKYYADSVRG [配列番号96]

CDRH3: ETWDAFDV [配列番号97]

-
CDRL1: SGSSSNIGSNAN [配列番号98]

CDRL2: DNNKRPS [配列番号99]

CDRL3: QAWDSSTVV [配列番号100]

20

【 0 0 7 1 】

好ましい標的細胞表面抗原を下記から選択することができる：

CD20, Thy-1 (CD90, Cluster of Differentiation 90 (Biofactors. 2009 May-Jun;35(3):258-65)); Ly-6 (リンパ球抗原Lymphocyte Antigen 6 (Mol Biol Rep. 2009 Apr;36(4):697-703)); CD59 (補体調節タンパク質Complement regulatory protein (Mol Immunol. 2007 Jan;44(1-3):73-81)); Fas (FS7関連細胞表面抗原FS7-associated cell surface antigen, CD95, APO-1 or TNFRSF6 (Adv Exp Med Biol. 2009;647:64-93)); EGFR (上皮成長因子受容体Epidermal Growth Factor Receptor (FEBS J. 2010 Jan;277(2):301-8)); Her 2 (ヒト上皮成長因子受容体Human epidermal growth factor receptor 2 (Clin Breast Cancer. 2008 Oct;8(5):392-401)); CXCR4 (ケモカイン受容体 4 Chemokine Receptor 4 (Biochim Biophys Acta. 2007 Apr;1768(4):952-63)); CD19 (Cluster of Differentiation 19 (Cell Immunol. 1989 Feb;118(2):368-81)); CD40 (Cluster of Differentiation 40 (Basic Clin Pharmacol Toxicol. 2009 Feb;104(2):87-92)); HLA分子(ヒト白血球型抗原分子(Korean J Lab Med. 2010 Jun;30(3):203)); GM1 (ガングリオシドganglioside, monosialotetrahexosylganglioside (J Lipid Res. 2010 Sep;51(9):2731-8)); CD22 (Cheson (2008) NEJM 359(6): 613-26); CD23 (Cheson, 2008); CD80 (Cheson, 2008); CD74 (Cheson, 2008); DRD (Cheson, 2008).

30

40

【 0 0 7 2 】

好ましくは、本発明による組成物、使用または方法において、表面抗原は、C D 1 9、C D 2 0またはC D 4 0から選択され、より好ましくは、それらのヒト形態から選択される。C D 2 0、とりわけ、ヒトC D 2 0が最も好ましい。

【 0 0 7 3 】

好都合なことではあるが、細胞表面抗原と特異的に結合する抗体分子はモノクローナル抗体であり、好ましくは、標的細胞に結合したとき、細胞表面から除かれ、Fc R I I b 依存的様式で標的細胞内に内部移行されるモノクローナル抗体である。好ましくは、そのようなモノクローナル抗体は、抗C D 1 9抗体、抗C D 2 0抗体または抗C D 4 0抗体である。最も好ましくは、そのようなモノクローナル抗体は抗C D 2 0モノクローナル抗

50

体である。

【 0 0 7 4 】

好ましい実施形態実施において、細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子は I 型抗 C D 2 0 抗体である。別の好ましい実施形態実施において、細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子は I I 型抗 C D 2 0 抗体ではない。

【 0 0 7 5 】

1 つの実施形態において、細胞表面抗原は C D 2 0 であり、かつ、細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子は I 型抗体である。

【 0 0 7 6 】

上述のように、2 つのタイプの抗 C D 2 0 モノクローナル抗体 (m A b) が存在する。抗 C D 2 0 m A b は、最初、2 0 0 3 年に種々のグループ分けに分類されるとして本発明者らによって定義され (4 3 および 2 5)、その後、2 0 0 4 年に I 型 m A b および I I 型 m A b として定義された (2 6)。当初、このことについての根拠は、抗 C D 2 0 m A b が、リンパ腫の異種移植片を根絶するそれらの能力に基づく 2 つの異なったタイプの試薬に分類されることであつた：すなわち、I 型 (例えば、リツキシマブおよび 1 F 5) は補体を利用し、I I 型 (例えば、B 1) は補体を利用しない。両方のタイプの m A b は生存の優れた延長をもたらし、しかし、補体活性を枯渇させることは、C V F を投与することによる場合、リツキシマブおよび 1 F 5 の効力をかなり損なつたが、B 1 の活性に対する影響は何らなかつた。これらの結果から、種々の C D 2 0 m A b が、異なるエフェクター機構をインビボにおいて作動させることが明瞭に示された。そのうえ、これらの結果は、リツキシマブおよび 1 F 5 が、C D 2 0 を標的細胞膜における脂質ラフトに転位置させることの結果として、補体を効率的に活性化し得ることを示す以前の研究、すなわち、B 1 型 m A b は補体を活性化することができないことを示す何かの研究 (4 3) と完全に一致している。補体と会合し、かつ、C D 2 0 を脂質ラフト内に移動するように誘導する m A b の能力との優れた相関が認められる (4 3、2 6)。したがって、I 型および I I 型の性質は、C D 2 0 を脂質ラフト内に移動させるそれらの能力によって定義することができる。このことが、下記に示されるように決定され得る。I I 型 m A b はより強力なホモタイプ接着を誘発することができ、かつ、細胞死を導くことができることとの相関もまた認められる。しかし、これらは、(T x - 1 0 0 ラフトアッセイ (下記参照) とは異なり) I 型または I I 型の m A b を定義するために単独で使用するすることができなかつた。

【 0 0 7 7 】

したがって、様々な抗 C D 2 0 m A b が、C D 2 0 を原形質膜において再分布するそれらの能力および様々なエフェクターアッセイにおけるそれらの活性に従って I 型 (例えば、リツキシマブ、オフアツムマブ) または I I 型 (例えば、トシツモマブ (B 1)、G A 1 0 1、1 1 B 8) として分類され得る (2 5 ~ 2 7)。I 型 (例えば、リツキシマブ、オフアツムマブ) の抗 C D 2 0 モノクローナル抗体は、C D 2 0 を大きい界面活性剤抵抗性のミクロドメイン (ラフト) の中に再分布するように誘導し、これに対して、I I 型 (トシツモマブ様) の抗 C D 2 0 モノクローナル抗体は誘導しない (5 0)。

【 0 0 7 8 】

上記で議論されたように、抗 C D 2 0 m A b は、C D 2 0 を脂質ラフト内に再分布させるかどうかによって I 型または I I 型と呼ぶことができる。これは、T x - 1 0 0 不溶性アッセイによって、または、スクロース密度勾配分離およびウエスタンブロッティングによって行われる。両方の方法が、下記のように、C r a g g 他、B l o o d、2 0 0 3 (4 3) に記載される：

【 0 0 7 9 】

1 . T r i t o n X - 1 0 0 不溶性によるラフト会合抗原の評価

ラフトミクロドメインにおける抗原存在の迅速評価として、本発明者らは、低温における T r i t o n X - 1 0 0 不溶性に基づくフローサイトメトリー法を利用した。簡単に記載すると、細胞を R P M I / 1 % B S A において洗浄し、 2.5×10^6 個 / m l で再懸濁した。その後、細胞を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の F I T C コンジュゲート化 m A b と 3 7 で

10

20

30

40

50

15分間インキュベーションし、冷PBS/1%BSA/20mMアジ化ナトリウムにおいて洗浄し、その後、サンプルを二分した。一方を、100%の表面抗原レベルの計算を可能にするために氷上で維持し、一方で、もう一方を、不溶性ラフト画分に残留する抗原の割合を求めるために氷上で15分間、0.5%のTriton X-100により処理した。その後、細胞を、アッセイの残り部分を通して4で維持し、PBS/BSA/アジ化物において1回洗浄し、上記で詳述されるように再懸濁し、フローサイトメトリーによって評価した。類似した結果が、間接的な検出方法を使用して得られた。標的抗原のラフト会合の構成的レベルを求めるために、細胞を最初、FITC標識されたmAbの結合に先立って、氷上で15分間、0.5%のTriton X-100により処理し、PBS/BSA/アジ化物において洗浄した。より多くの抗原が、さらなる架橋によって、Triton X-100不溶性画分に移動し得るかを評価するために、細胞をFITC-mAbと以前のようにインキュベーションし、洗浄し、その後、4つに分けた。これらのサンプルのうちの2つをヤギ抗マウスIgF(ab')₂フラグメントと氷上で15分間インキュベーションした。洗浄後、架橋サンプルの1つと、非架橋サンプルの1つとを、フローサイトメトリーに先立って、上記で詳述されるようにTriton X-100において溶解し、洗浄した。

【0080】

2. スクロース密度勾配分離およびウエスタンブロッティング - 脂質ラフト画分の調製およびウエスタンブロッティング

モノクローナルAb (1 µg / 10⁶ 細胞) を37で細胞に加えた。20分間インキュベーションした後、細胞をペレット化し、MES緩衝化生理的食塩水 (25 mM MES (pH 6.5)、150 mM NaCl、1 mM フェニルメチルスルホニルフッ化物、5 µg / ml のアプロチニン、5 µg / ml のロイペプチン、10 mM EDTA) における氷冷1.0% Triton X-100において溶解した。その後、脂質ラフト画分をスクロース密度勾配遠心分離によって調製した。簡単に記載すると、溶解物を等体積の80%スクロース/溶解緩衝液と混合し、不連続な5%~30%のスクロース密度勾配を重層し、その後、遠心分離を200,000 x gで16時間行った。分画物 (0.5 ml) を集め、ウエスタンブロッティングによって分析した。それぞれの分画物の15 ml アリコートに2 x 負荷緩衝液において1:1で希釈し、95に5分間加熱し、15% SDS-PAGEゲルで分離し、その後、PVDフメンブランに転写し、一次抗体 (例えば、CD20を検出するためのマウス抗CD20であるクローン7D1、または、ラフト画分を特定するための抗Lynウサギポリ血清 (Serotec、英国)) とインキュベーションし、その後、HRPコンジュゲート化二次抗体とインキュベーションした (Amersham Biosciences UK株式会社)。プロットを、ECL+plus (Amersham Biosciences UK株式会社) を使用して可視化した。

【0081】

抗CD20 mAbはCD20のラージループにおけるA x Pモチーフを要求し得る (オフアットマブおよび他のGen mAb抗体は要求しない)。しかしながら、Niederfeiler他 (51) は、II型mAbが、I型と比較して、CD20ループのわずかに異なる領域に結合することを示す。

【0082】

好ましくは、本発明による組成物、使用または方法において、標的細胞はガン細胞である。より好ましくは、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マントル細胞リンパ腫または慢性リンパ性白血病 (これらに限定されない) を含む非ホジキンリンパ腫から選択されるガン。

【0083】

1つの実施形態において、本発明は、ガンを処置するための組成物、使用および方法を提供し、具体的には、リンパ腫、慢性リンパ性白血病、急性リンパ芽球性白血病、多発性骨髄腫、ホジキン病および非ホジキン病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の領域を伴う濾胞性リンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、マントル細

10

20

30

40

50

胞リンパ腫、ならびに、びまん性小切り込み型細胞リンパ腫、または、それらの組合せから好ましくは選択されるB細胞悪性腫瘍を処置するための組成物、使用および方法を提供する。ある特定の実施形態において、B細胞悪性腫瘍はリンパ腫であり、例えば、非ホジキンリンパ腫(NHL)などである。

【0084】

別の実施形態において、本発明は、炎症性疾患を処置するための組成物、使用および方法を提供する。これは自己免疫性疾患であってもよく、例えば、橋本甲状腺炎、悪性貧血、アジソン病、I型糖尿病、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、シェーグレン症候群、皮膚筋炎、エリテマトーデス、多発性硬化症、自己免疫性内耳疾患、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病、自己免疫性肝炎、家族性腺腫性ポリポーシスおよび潰瘍性大腸炎またはそれらの組合せなどであり得る。具体的な実施形態において、自己免疫性疾患は関節リウマチまたは全身性エリテマトーデスである。

10

【0085】

好ましい実施形態において、処置は、慢性リンパ球性白血病(CLL)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、B細胞悪性腫瘍、関節リウマチ、全身性エリテマトーデス、皮膚筋炎、全身性硬化症および自己免疫性水疱性疾患を含む疾患の処置である。

【0086】

好ましい実施形態において、本発明の使用によって強化される処置は、抗CD20mAb(例えば、リツキシマブなど)による処置である。

【0087】

20

定義

「上昇した」によって、問題としている細胞が、低いレベルまたは中程度のレベルのFcRIIbをその表面に発現するコントロール細胞または参照細胞よりも高いレベルのFcRIIbをその表面に発現するという意味が包含される。例えば、問題としている細胞がB細胞のタイプである場合、発現レベルが、同じ細胞タイプのB細胞によるFcRIIbの発現の正常なレベル(好ましくはメジアンレベル)よりも大きかったならば、FcRIIb発現の「上昇した」レベルが認識されるであろう。代替において、問題としている細胞が、FcRIIbを低いレベルまたは中程度のレベルで発現する異なる細胞タイプよりも高いレベルでFcRIIbを発現したならば、「上昇した」レベルが認識されるであろう。

30

【0088】

本発明によれば、標的細胞のFcRIIb発現における上昇の程度が大きいほど、標的細胞の表面抗原に特異的に結合する抗体分子で、FcRIIbと結合することができるFcドメインを有する抗体分子による処置に対するそのような細胞の予測された応答が悪くなる。したがって、FcRIIb発現における上昇が大きいほど、FcドメインのFcRIIbへの結合を妨げるか、または低減させる本発明による薬剤の使用から得られることになる利益が、図2Dおよび図3Aにおいて明らかにされるように大きくなる。FcRIIbレベルをIHCによって測定し(図10b)、MCLサンプルをFcRIIbについて陽性および陰性に分けた後において、応答における明確な臨床的差異が、リツキシマブに基づく治療の後で認められた(図10cおよび図10d)。

40

【0089】

当業者は、細胞表面におけるFcRIIbの発現レベルを、様々な知られている方法によって、例えば、添付された図面および実施例において記載されるフローサイトメトリー法および免疫組織化学的染色法などによって容易に求めることができる。

【0090】

当業者は、FcRIIbの「正常な」発現レベルおよび「上昇した」発現レベルが種々の細胞タイプの間および種々の疾患状態の間で変化するはずであることを理解するであろうし、また、所与の標的細胞または疾患状態についてのFcRIIbの「正常な」発現レベルおよび「上昇した」発現レベルを、この技術分野で広く知られている方法および本明細書中に記載される方法を使用して特定することができるであろう。ある種の細胞タ

50

イブにおける Fc RIIB 発現の「正常な」レベル（またはメジアンレベル）および「上昇した」レベルの例示的レベルが図 2 C に提供される。これらの特定の例において、濾胞性リンパ腫（FL）では、「正常な」レベルがおおよそ 50（イソタイプコントロールに対する Geo MFI Fc RIIB の比率）であり、「上昇した」レベルがおおよそ 125 または 400 またはそれ以上であり、一方で、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫（DLBCL）では、「正常な」レベルがおおよそ 20 であり、「上昇した」レベルがおおよそ 80 またはそれ以上であり、一方で、マントル細胞リンパ腫（MCL）では、「正常な」レベルがおおよそ 60 であり、「上昇した」レベルがおおよそ 110 または 190 またはそれ以上であり、慢性リンパ性白血病（CLL）では、「正常な」レベルがおおよそ 100 であり、「上昇した」レベルがおおよそ 300 またはそれ以上である。

10

【0091】

好ましくは、上昇した Fc RIIB 発現レベルは、同じ細胞タイプの細胞（または異なる細胞タイプの細胞）の正常な発現レベル（好ましくはメジアン発現レベル）と比較して少なくとも 1.1 倍増大するか、あるいは、同じ細胞タイプの細胞または異なる細胞タイプの細胞の正常な発現レベル（またはメジアン発現レベル）と比較して少なくとも 1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2.0 倍、2.1 倍、2.2 倍、2.3 倍、2.4 倍、2.5 倍、2.6 倍、2.7 倍、2.8 倍、2.9 倍、3.0 倍、3.1 倍、3.2 倍、3.3 倍、3.4 倍、3.5 倍、3.6 倍、3.7 倍、3.8 倍、3.9 倍、4.0 倍、4.1 倍、4.2 倍、4.3 倍、4.4 倍、4.5 倍、4.6 倍、4.7 倍、4.8 倍、4.9 倍、5.0 倍、5.1 倍、5.2 倍、5.3 倍、5.4 倍、5.5 倍、5.6 倍、5.7 倍、5.8 倍、5.9 倍、6.0 倍、6.1 倍、6.2 倍、6.3 倍、6.4 倍、6.5 倍、6.6 倍、6.7 倍、6.8 倍、6.9 倍、7.0 倍、7.1 倍、7.2 倍、7.3 倍、7.4 倍、7.5 倍、7.6 倍、7.7 倍、7.8 倍、7.9 倍、8.0 倍、8.1 倍、8.2 倍、8.3 倍、8.4 倍、8.5 倍、8.6 倍、8.7 倍、8.8 倍、8.9 倍、9.0 倍、9.1 倍、9.2 倍、9.3 倍、9.4 倍、9.5 倍、9.6 倍、9.7 倍、9.8 倍、9.9 倍、10.0 倍、10.5 倍、11.0 倍、11.5 倍、12.0 倍、12.5 倍、13.0 倍、13.5 倍、14.0 倍、14.5 倍、15.0 倍、15.5 倍、16.0 倍、16.5 倍、17.0 倍、17.5 倍、18.0 倍、18.5 倍、19.0 倍、19.5 倍、20.0 倍、21.0 倍、22.0 倍、23.0 倍、24.0 倍または 25.0 倍またはそれ以上増大する。好ましくは、上昇した Fc RIIB 発現レベルは、同じ細胞タイプの細胞または異なる細胞タイプの細胞の正常な発現レベル（またはメジアン発現レベル）と比較して少なくとも 1.8 倍増大する。

20

30

【0092】

添付された実施例において示されるように、本発明者らは、Fc RIIB 発現のレベルが細胞表面からの mAb の増大したモジュレーションと相関することを明らかにしている。Fc RIIB 発現の一層より高いレベルは一層より大きいモジュレーションを与える。すなわち、図 2 D および図 3 A に示されるような、発現の上昇の程度と、モジュレーションとの間における相関が認められる。図 2 D において、Fc RIIB の発現レベルが、観測されたモジュレーションのレベルに対してプロットされる。相関は、Fc RIIB の最も高いレベル（例えば、400 を超えるレベル）が表面の CD20 の最も低いレベル（20% 未満のレベル）をもたらす、すなわち、細胞表面からの mAb をモジュレートすることに対する最も大きい影響をもたらすような相関である。図 3 A においては、Fc RIIB の低いレベル（18）、中程度のレベル（70）および高いレベル（124）が Fc RIIB 陰性細胞株（Ramos）に導入され、このことが、Fc RIIB の発現に比例して細胞表面の CD20 の低下するレベルと直接に相関した（低、中程度および高について、60%、40%、30%）。Fc RIIB 発現レベルが、イソタイプコントロールに対する Fc RIIB の幾何平均蛍光強度（Geo MFI）の比率として与えられる。

40

【0093】

50

モジュレーションは、細胞表面に残るmAbの量を低下させる。mAbは、標的細胞を除去するための免疫エフェクター機構(ADCC、ADCP、CDC)と関わるためにFcを要求する。したがって、モジュレーションをFcRIIB阻止mAbにより低下させることは、Fc依存的なエフェクター機能を改善することになる。このことが、図8においてADCP(食作用)について示される。リツキシマブ単独による食作用は40%であったが、FcRIIBがAT10によって阻止されたときには55%に上がった。

【0094】

「抗体分子」によって、モノクローナル抗体、合成抗体、組換え産生された抗体、多特異性抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、ラクダ化抗体、単鎖Fv(scFv)、単鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント、ジスルフィド連結されたFv(sdFv)、細胞内抗体、または、上記のいずれかのエピトープ結合フラグメントが包含される。好ましくは、本発明の抗体はモノクローナル抗体であり、より好ましくはヒト化抗体またはヒト抗体である。

【0095】

本発明の組成物、使用および方法において有用である抗体分子の調製および特徴づけのための様々な方法が当業者には広く知られている。例えば、国際公開WO2008/002933は、5.3節~5.3.1節、74頁~91頁において、標的細胞表面抗原、例えば、CD20またはFcRIIBなどに特異的に結合するモノクローナル抗体の調製および特徴づけを記載する。FcRIIBおよびCD20と特異的に結合する有用な抗体がまた、ブダペスト条約に従って寄託されるハイブリドーマによって産生されるモノクローナル抗体を含めて、国際公開WO2008/002933の15頁~21頁に開示される(その開示は参照によって本明細書中に組み込まれる)。

【0096】

「特異的に結合する」によって、標的抗原に結合するが、他の抗原には結合(交差反応)しないか、または、そのような抗原とはより弱く、すなわち、標的抗原よりも低い親和性により結合する薬剤、例えば、抗体分子などが包含される。例えば、FcRIIBに特異的に結合する抗体は、他のペプチドまたはポリペプチドに対しては、例えば、この技術分野で知られている免疫アッセイ、BIACoreまたは他のアッセイによって求められる場合、より低い親和性により結合し得る。好ましくは、FcRIIBまたはそのフラグメントに特異的に結合する抗体は他の抗原と交差反応しない。FcRIIBに特異的に結合する抗体は、例えば、当業者に知られている免疫アッセイ、BIACoreまたは他の技術によって特定することができる。抗体またはそのフラグメントは、この抗体またはそのフラグメントが、様々な実験技術、例えば、ウエスタンブロット、放射免疫アッセイ(RIA)および酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)などを使用して求められるように、どのような交差反応性抗原に対するよりも大きい親和性によりFcRIIBに結合するとき、FcRIIBに特異的に結合し(抗体特異性に関する議論については、Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York 332-336頁(1989)を参照のこと)、また、前記抗体またはそのフラグメントがFcRIIA、具体的にはヒトFcRIIA、より具体的には天然型ヒトFcRIIAと結合するよりも大きい親和性によりFcRIIB、具体的にはヒトFcRIIB、より具体的には天然型ヒトFcRIIBと結合する。代表的な抗体が、米国特許出願公開第2004-0185045号、同第2005-0260213号および同第2006-0013810号に開示される(これらはすべてが、それらの全体において参照によって本明細書中に特に組み込まれる)。

【0097】

好ましくは、本発明の組成物および方法においてCD20抗体との組合せで使用されるある種のFcRIIB抗体は天然型ヒトFcRIIBの細胞外ドメインと結合する。いくつかの実施形態において、抗体またはそのフラグメントは、前記抗体またはそのフラグメントがFcRIIAと結合するよりも少なくとも2倍大きい親和性によりFcRIIBと結合する。

10

20

30

40

50

【0098】

別の実施形態において、前記抗体またはそのフラグメントは、前記抗体またはそのフラグメントがFcRIIAと結合するよりも少なくとも4倍、少なくとも6倍、少なくとも8倍、少なくとも10倍、少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも 10^4 倍、少なくとも 10^5 倍、少なくとも 10^6 倍、少なくとも 10^7 倍、少なくとも 10^8 倍大きい親和性によりFcRIIBと結合する。好ましい実施形態において、前記抗体またはそのフラグメントは、前記抗体またはそのフラグメントがFcRIIAと結合するよりも少なくとも100倍、少なくとも1000倍、少なくとも 10^4 倍、少なくとも 10^5 倍、少なくとも 10^6 倍、少なくとも 10^7 倍、少なくとも 10^8 倍大きい親和性によりFcRIIBと結合する。

10

【0099】

本発明の局面を具体化する実施例が次に、添付された図面を参照して記載される。

【図面の簡単な説明】

【0100】

【図1-1】I型mAbは正常なヒトB細胞および悪性のヒトB細胞の細胞表面から内部移行する。A) 原発性CLL細胞を、Tosit-488、GA101gly-488、Ritux-488またはOfatum-488とともに(すべてが $5\mu\text{g}/\text{ml}$ で)2時間または6時間培養した。その後、細胞を集め、2回洗浄し、その後、内部移行したmAbと、内部移行していないmAbとを識別するために、抗Alexa-488をサンプルの半分に4で30分間加えた。表面の利用可能CD20(%)を、下記の計算を使用して求めた：表面の利用可能CD20 + (クエンチ前のGeoMFI - クエンチ後のGeoMFI) / (クエンチ前のGeoMFI) $\times 100$ 。それぞれの点が、異なるCLL患者からのサンプルを表す。統計学的分析を、ウィルコクソン・ペアード検定を使用して行った(* * p値 < 0.001)。メジアンが示される。B) その後、様々な原発性B細胞腫瘍と、健康な志願者からの正常なB細胞とを、Tosit-488またはRitux-488を用いる同じアッセイで調べた。統計学的分析を、マン・ホイットニー検定を使用して行った。メジアンが示される。

20

【図1-2】CD20モジュレーションとCLL表現型/予後マーカーとの間には相関がない。a) モジュレーションと、知られているCLL予後因子との間における相関：CLL事例を、IgVH遺伝子の変異状態、Zap-70およびCD38の発現について表現型分類し、内部移行アッセイを、モジュレーションを図1a)のように評価するためにこれらのサンプルに対して行った。それぞれの予後特徴とCD20モジュレーションとの間における相関をスピアマンの相関分析によって行った。相関がそれぞれの予後因子に関して何ら認められなかった($p > 0.05$)。b) 同様に、sIg状態、カルシウム流束を誘発する細胞の能力、および、CLL細胞の生存性を評価し、CD20モジュレーションと比較した。再度ではあるが、相関が何ら認められなかった。

30

【図1-3】CD20モジュレーションとCLL表現型/予後マーカーとの間には相関がない。c) CLL細胞のCD20発現を、Ritux-488を使用してFACSによって評価し、CD20モジュレーションと比較した。弱い相関が認められた(-0.34のスピアマンr値、 $p = 0.038$)。CD20モジュレーションに対するCD20発現およびFcRIIb発現の多変量回帰を使用するその後の分析では、CD20との弱い相関が有意でなかったことが示された($p = 0.638$)。d) IgM陽性CLL事例のsIg発現をFACSによって求め、発現のレベルをCD20モジュレーションと比較した。相関が何ら見出されなかった($p > 0.05$)。e) CLL事例を、Rit m2a-488とともに2時間培養し、内部移行アッセイを図1a)のように行った。ただ1つのCLL事例の範囲において、CD38発現における変動が認められた。FACSプロットはクエンチ前のサンプル(左)およびクエンチ後のサンプル(右)を示す。対応するヒストグラムでは、ただ1つのサンプルに含まれるCD38⁺ve細胞およびCD38⁻ve細胞が同じ速度でモジュレートしたことが強調される。CD38⁺ve細胞およびCD38⁻ve細胞が黒塗りピークおよび白抜きピークによってそれぞれ表される。これらの

40

50

結果は3つの異なる事例を表す。

【図2】モジュレーションはFc依存のプロセスである。A) 1a)に記載される内部移行アッセイを、CLL細胞をリツキシマブのAlexa-488標識フラグメント(Fab', F(ab')₂およびIgG)とともに6時間培養した後で繰り返した。データは、3つの異なるCLLサンプルについて、モジュレーションの平均レベル+/-SDを表す。B) CLL細胞を、1a)の場合のようにTosit-488、Ritux-488+/-AT10、および、Ritm2a-488とともに2時間および6時間培養した。平均+/-モジュレーションが6つの異なるCLLサンプルから示される。抗FcRII mAbであるAT10のリツキシマブへの添加は、CD20モジュレーションを、Ritm2aと同様なレベルにまで低下させ、これに対して、Ritm2aへのAT10の添加は、モジュレーションに対する有意な差を何らもたらさなかった。C) 様々な正常なB細胞サンプルおよび悪性のB細胞サンプルをAT10-PEによりFcRIIb発現について染色した。ヒストグラムは3つの異なるCLL事例におけるFcRIIb発現の多様性を示し、これらの事例により、名目上の高い発現(黒色線)、中程度の発現(暗灰色線)および低い発現(明灰色線)が表される。散布図は、健康なB細胞、CLL、SLL、MCL、FLおよびSLBCLにわたるFcRIIb発現における差を示す。FcRIIb発現を、実験間の変動に起因する小さい差を抑制するために、FcRIIb:イソタイプコントロールGeo MFIの比率として表した。メジアン値が示される。D) FcRIIb発現を、(Ritux-488とともに6時間共培養されたすべてのNHLサブタイプおよび正常なB細胞にわたる(1A)に記載される内部移行アッセイから得られる)CD20モジュレーションに対してプロットした。分析を、ノンパラメトリック分布を仮定してスピアマンの相関を使用して行った。強い相関が明らかにされた。スピアマンr値=-0.74、95%信頼区間:-0.83~-0.61、および、p<0.0001。

【図3】FcRIIb発現はCD20モジュレーションの主要な決定要因である。A) FcRIIbによりトランスフェクションされたRamos細胞を、FcRIIbの低いレベル、中程度のレベルおよび高いレベルを表すために分取し、模擬トランスフェクションされた細胞と一緒に、Tosit-488およびRitux-488を使用する内部移行アッセイで6時間の時点で評価した。棒は、独立した実験からの平均値+/-SDを表す。分取された細胞のFcRIIb発現についてのGeo MFI値が右側に列挙される。B) 内部移行アッセイを、6時間のインキュベーションの後、正常なRamos細胞、R×3細胞(これはBCR発現を有しない)、模擬トランスフェクションされたR×3細胞、および、FcRIIbによりトランスフェクションされたR×3細胞に対して、Tosit-488およびRitux-488を使用して繰り返した。5つの独立した実験からのデータ点がメジアン値とともに示される。

【図4】CD20およびFcRIIbの共結合が主としてシス様式で生じ、FcRIIbの活性化を引き起こす。A) Raji細胞を、指定のmAb(10μg/ml)とともに37℃で2時間培養し、その後、集め、溶解し、続いて、免疫プロットングをリン酸化FcRIIbについて行った。B) 左側パネル; PKH26標識されたRamos細胞(FcRIIb^{-VE}, R1)を、(図3Aに記載される)分取された高FcRIIb発現のRamosトランスフェクタント(R2)と1:1で混合した。右側パネル; Ritux-488との6時間の培養の後でのFcRIIb^{+VE}細胞およびFcRIIb^{-VE}細胞におけるCD20のモジュレーション。コントロールとして、両方の集団は単独でもまた培養された。データは、3つの独立した実験からのモジュレーションの平均レベル+/-SDを表す。C) 類似した実験において、低FcRIIb発現のCLLをPKH26標識し、その後、より高いFcRIIb発現のCLLと1:1で混合した。実験を3回行った(それぞれで、異なる高FcRIIb発現のCLLを用いた)。FcRIIbレベル(Geo MFI)が42(低)であり、これらの高発現体については275、306および165であった。その後、内部移行アッセイを4Bの場合のように行った。データはモジュレーションの平均レベル+/-SDを表す。D) 種々のCL

Lサンプルを、 2.0×10^5 細胞 / ml、 4×10^5 細胞 / ml および 1×10^5 細胞 / ml で6時間、Ritux-488とともに培養し、内部移行アッセイを以前のように6時間において行った。E) Raji細胞を、 2.0×10^5 細胞 / ml、 4×10^5 細胞 / ml および 1×10^5 細胞 / ml で、指定のmAb ($10 \mu\text{g} / \text{ml}$) とともに37 で2時間培養した。画像を、細胞近傍における差を明らかにするために明視野顕微鏡を使用して取り込んだ。その後、細胞を集め、4Aに記載されるようなリン酸化Fc RIIbについての免疫プロットングによって評価した。

【図5】リツキシマブ、CD20およびFc RIIbがリソソーム内に一緒に内部移行する。A) CLL細胞をTosit-488またはRitux-488のどちらかと2時間インキュベーションし、その後、抗CD19-APCおよびAT10-PEにより染色した。データは、非処理物 (n+6のCLLサンプル) の%としてFc RIIb発現についての平均+ / 1SDを示す。Ritux-488後のFc RIIb発現がTosit-488後よりも有意に低かった (* p < 0.05)。CLL細胞を洗浄し、固定処理および透過処理に供し、その後、AT10-647により染色し (青色)、洗浄し、共焦点顕微鏡法により分析した。この画像は非刺激細胞におけるFc RIIb染色パターンを表す。C) 同じCLLサンプルをRitux-488とともに30分間培養し、その後、5b)に記載されるように処理した。この時点での細胞は、AT10-647 (青色) を伴うRitux-488 (緑色) の間における明白な共局在化を呈した。D) CLL細胞を、5Bでのような顕微鏡法のための調製の前にTosit-488と6時間インキュベーションした。加えて、細胞はまた、リソソームについて染色するためにビオチン化LAMP-1およびストレプトアビジン-546 (赤色) により染色された。Tosit-488は表面に均一に留まったままであり、AT10-647染色は、5Bにおいて認められるベースラインから変化していなかった。LAMP-1との共局在化が何ら認められなかった。E) CLL細胞を5D) のようにRitux-488により6時間処理し、評価した。2つの代表的な細胞がここに示される。上側の細胞は、Ritux-488と、AT10-647との間における疑いのない共局在化を示し、しかし、LAMP-1との共局在化を何ら示していない。下側の細胞は、3つすべての蛍光団の共局在化を示す。それぞれの場合において、明視野 (BF) 像が同じ細胞から示される。スケールバーは5 μm を表す。

【図6】阻害性受容体の欠如は抗CD20mAbの枯渇化能を増強する。hCD20Tgマウス (WT)、または、CD32を欠くhCD20Tgマウス (CD32KO) を、マウスIgG1を有するリツキシマブ変化体 (m1) またはマウスIgG2aを有するリツキシマブ変化体 (m2a) により処理し (250 mg i.v.)、その後、b細胞の枯渇を、マウスの連続した採血により90日間にわたるローサイトメトリー、ならびに、B220mAbおよびCD19mAbによる染色によってモニターした。

【図7】阻害性受容体CD32b (Fc RIIb) を阻止することはヒト異種移植片システムにおける抗CD20mAbの効力を増強する。CD20陽性のヒト腫瘍細胞 (DauidiまたはRaji) をSCIDマウスに接種し、その後、リツキシマブ、AT10または両者のいずれかにより処理し、マウスの生存または腫瘍成長をモニターした。使用されたmAbの用量が図の凡例に示される。A) では、Dauidi細胞が皮下に接種され、腫瘍が305日毎にカリパス測定によってモニターされた。B) およびC) では、Raji細胞が静脈内に接種された。

【図8】Fc RIIb阻止mAbとの共インキュベーションによる、リツキシマブにより処理されたCLL細胞の高まった食作用。単球を健康な志願者から得て、使用前の少なくとも7日の期間、6ウエルプレートにおいてM-CSFによりマクロファージに分化させた。その後、マクロファージを集め、CFSE標識されたCLL細胞を加える前の少なくとも2時間にわたって 5×10^5 細胞 / ウエルで96ウエルプレートにおいて接着させた。CFSE標識されたCLL細胞は非処理であったか、あるいは、2回の洗浄およびマクロファージへの少なくとも30分間の添加 (1:1の比率) を行う前の15分間または6時間のどちらかで $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のリツキシマブ (ritux) およびFc RIIb阻

10

20

30

40

50

止mAb AT10 (fab')₂によりオプソニン化された。その後、抗CD16f (fab')₂-APC (5 µg/ml)を室温(RT)で15分間、それぞれのウェルに加えて、マクロファージを染色し、その後、ウェルをRTでFacs洗浄液(PBS/BSA/アジ化物)により1回洗浄した。さらに、氷冷FACS洗浄液を加え、プレートを、Facsによる分析のために集める前の10分間、氷上でインキュベーションした。%二重陽性マクロファージは、%CD16+細胞の合計として表されるCD16+CFSE+陽性細胞の%を表す。N=3の反復、線は平均を表す。データは、リツキシマブがほんの15分間加えられたとき、6時間と比較して、CLL細胞の食作用がより大きいことを明瞭に示す。効力におけるこの低下は細胞表面からのリツキシマブのモジュレーションを伴い、FcRIIb阻止mAbのAT10による処理によって取り消され得る。重要なことに、FcRIIbmAbはCLL細胞に加えられただけであり、したがって、マクロファージ自身に対する影響は何ら有していない。そのうえ、AT10のFab2フラグメントのみが使用され、したがって、増大した食作用が、より多くのmAbがCLL細胞表面に結合することの結果として生じる可能性はない。この結論はまた、食作用における増大がほんの15分間(ほんの少しのリツキシマブのモジュレーションが生じていたであろう時間)のインキュベーションの後では全く認められないという観測結果によって裏付けられる。

【図9】IHCによるFcRIIb発現。パラフィン包埋組織を、抗CD32b特異的mAbのEP888Yを使用してFcRIIb発現について染色した。4名の異なるFL患者からの画像が示される(40倍の総合倍率および150倍の拡大挿入図)。FcRIIb発現はまた、一致する生細胞をAT10-PEにより染色することによるフローサイトメトリーによって調べられた。フローサイトメトリーによって得られるFcRIIb発現がそれぞれの画像の左上隅に示される。

【図10】FcRIIbレベルはリツキシマブ処置のMCL患者における臨床結果を予測する。本発明者らのインビトロ知見の概念実証として、本発明者らは、リツキシマブを受けていたMCL患者のコホートのFcRIIb発現を遡及的に調べた。診断用のパラフィン包埋組織を、FcRIIb特異的mAbを使用して免疫組織化学によって染色した(図11)。強い膜染色がFcRIIb+veのリンパ腫サンプルにおいて認められたが、FcRIIb-veのリンパ腫サンプルでは認められなかった。IHCによって図10aおよび図10bに示されるFcRIIb染色は、図2Dに示されるようなフローサイトメトリーによって示されるFcRIIb発現と相関した(2Dにおけるフローサイトメトリーによって求められる値が図10aおよび図10bにおいて数字の挿入として示される)。これらの結果は、フローサイトメトリーによって得られる対応するDMSO凍結サンプルのFcRIIb発現(図2C、挿入値)と相関した。16名のMCL患者からなるほんの小さいコホートを研究したにもかかわらず、FcRIIb-veのリンパ腫の患者は、FcRIIb+veの細胞を有する患者よりも有意に良好なメジアン無進行生存を有した(メジアンがそれぞれ、852日および189日であった)。図10cは、FcRIIb+サブセットおよびFcRIIb-サブセットにおける生存差を示す。これらの群は臨床的特徴の点で同程度であり(MCL国際予後指標、データは示されず)、しかし、使用された化学療法タイプにおいて不均一性があった。このことを検討するために、本発明者らは、最初の治療についてリツキシマブまたはフルダラビンのどちらかの単剤、シクロホスファミドおよびリツキシマブ(FCR)により処置されたそのような患者における結果を調べ、類似した結果が得られた。図10dは、患者コホートが議論されるようにさらに管理された後のFcRIIb+サブセットおよびFcRIIb-サブセットにおける生存差を示す。

【図11】免疫組織化学で使用された抗FcRIIbmAbの特異性の確認。FcRIIaトランスフェクションおよびFcRIIbトランスフェクションのRamoss細胞を遠心分離により集め、パラフィン包埋した。ヒトFcRIIbに対するmAbを使用する免疫組織化学では、FcRIIbによりトランスフェクションされたRamoss細胞における強い膜染色が明らかにされ、FcRIIaによりトランスフェクショ

10

20

30

40

50

ンされた細胞では染色が全く認められなかった。

【図12】CD32B特異的クローンはリツキシマブの内部移行を阻害する。抗CD32b mAbはリツキシマブのモジュレーションを阻止することができる。Y軸は表面の利用可能CD20(%)を示す。リツキシマブ-alexa488を、異なるCD32b阻止mAb(WTまたは297Q(nq)変異型)の存在下または非存在下、CD32BによりトランスフェクションされたRamos細胞に加え、モジュレーションを、1時間後、2時間後、6時間後および24時間後に評価した。CD32mAbの阻止能についてのコントロールとして、本発明者らはまた、二重CD32a/b特異性mAbのAT10(IgGフラグメントおよびFab2フラグメント(Fab))を陰性コントロール(イソタイプが一致した無関係なmAb(iso wtまたはnq))とともに含めた。最後に、ALEXa488標識されたB1が、迅速にモジュレートしないコントロールmAbとして含められた。データは、3つすべてのnCDeR(C)mAb(C1、C11およびC13)がwt形式または297q形式のどちらにおいてもリツキシマブのモジュレーションを阻止し得ることを明瞭に示している。特に、C11mAbが極めて効果的であった。

10

【図13】抗CD32b mAbはリツキシマブのモジュレーションを阻止することができる。13すべてのmAb(nq)、および、wtとしてのC11 リツキシマブ-alexa488を、異なるCD32b阻止mAb(WTまたは297Q変異型)の存在下または非存在下、CD32BによりトランスフェクションされたRamos細胞に加え、モジュレーションを、1時間後、2時間後、6時間後および24時間後に評価した。Y軸は表面の利用可能CD20(%)を示す。CD32mAbの阻止能についてのコントロールとして、本発明者らはまた、二重CD32a/b特異性mAbのAT10(IgGフラグメントおよびFab2フラグメント(Fab))を陰性コントロール(イソタイプが一致した無関係なmAb(iso wtまたはnq))とともに含めた。最後に、ALEXa488標識されたB1が、迅速にモジュレートしないコントロールmAbとして含められた。加えて、コントロールのCD32陰性Ramos細胞が、CD32阻止mAbの最大影響を推定することを可能にするために含められた。データは、nCDeR(C)mAbの大部分のすべてがリツキシマブのモジュレーションを阻止できたことを明瞭に示している。特に、C10mAbおよびC11mAbが極めて効果的であり、これらは、モジュレーションを、24時間においてさえ、ほぼ完全に阻止するようであった。

20

30

【図14A】抗CD32b阻止mAbの親和性と、リツキシマブ結合後においてCD32bのリン酸化を妨げる能力との相関。mAbの相対的親和性を、CD32BによりトランスフェクションされたCHO細胞に対するmAb結合を測定する用量滴定実験によって求めた。簡単に記載すると、CD32Bによりトランスフェクションされた接着性CHO K1細胞をFMA Tプレートに播種した。IgGを30nMからおよそ0.015nMまで1:2の希釈で力価測定し、室温で1時間にわたって結合させた。洗浄後、結合したIgGを抗ヒトIgG-APCにより検出した。最後に、プレートを洗浄し、FMA T(Applied Biosystems)で読み取った。これは、標的発現細胞に対するmAb結合についてのEC50値を与え、相対的親和性に変換することができる。その後、この相対的親和性を、リツキシマブ結合後のCD32bのリン酸化を妨げる抗CD32b阻止mAbの能力と相関させた。これを、細胞を抗CD32b mAbの存在下または非存在下においてリツキシマブにより刺激し、その後、ウエスタンブロッティングをホスホCD32bについて行うことによって求めた。その後、CD32b mAbを、CD32のリン酸化を阻止するその能力に従ってランク付けした(1が最も効果的である)。密接な相関が、mAbの親和性と、CD32bのリン酸化を阻止する能力との間において明白に認められた。

40

【図14B】抗CD32b阻止mAbの親和性と、リツキシマブのモジュレーションを妨げる能力との相関。抗CD32b阻止mAbの親和性と、リツキシマブのモジュレーションを妨げるそれらの能力との相関。mAbの相対的親和性を、CD32BによりトランスフェクションされたCHO細胞に対するmAb結合を測定する用量滴定実験によって求

50

めた。簡単に記載すると、C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた接着性C H O K 1細胞をF M A Tプレートに播種した。I g Gを3 0 n Mからおよそ0 . 0 1 5 n Mまで1 : 2の希釈で力価測定し、室温で1時間にわたって結合させた。洗浄後、結合したI g Gを抗ヒトI g G - A P Cにより検出した。最後に、プレートを洗浄し、F M A T (A p p l i e d B i o s y s t e m s) で読み取った。これは、標的発現細胞に対するm A b結合についてのE C 5 0値を与え、相対的親和性に変換することができる。その後、この相対的親和性を、(前図に示される)C D 3 2 bトランスフェクションされたR a m o s細胞におけるリツキシマブのモジュレーションを妨げる抗C D 3 2 b阻止m A bの能力と関連させた。強い相関が、m A bの親和性と、リツキシマブのモジュレーションを阻止する能力との間において明白に認められた。このデータから、標的細胞表面からのリツキシマブのモジュレーションを促進させることにおけるC D 3 2 Bの中心的役割が確認される。

【図15】クローン1によって媒介されるように、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。(円、サークル)は、h C D 3 2 AによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示す。x(クロス)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン1によって媒介される通りである。細胞をF M A Tプレートに播種した。免疫複合体を、F I T CをB S Aにコーティングし、その後、これをF I T C特異的h I g G 1抗体と1 0 : 1のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体(I C)またはm A bのいずれかである。

【図16】クローン2によって媒介されるように、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。(円、サークル)は、h C D 3 2 AによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示す。x(クロス)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン2によって媒介される通りである。細胞をF M A Tプレートに播種した。免疫複合体を、F I T CをB S Aにコーティングし、その後、これをF I T C特異的h I g G 1抗体と1 0 : 1のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体(I C)またはm A bのいずれかである。

【図17】クローン3によって媒介されるように、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。(円、サークル)は、h C D 3 2 AによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示す。x(クロス)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン3によって媒介される通りである。細胞をF M A Tプレートに播種した。免疫複合体を、F I T CをB S Aにコーティングし、その後、これをF I T C特異的h I g G 1抗体と1 0 : 1のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体(I C)またはm A bのいずれかである。

【図18】クローン4によって媒介されるように、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。(円、サーク

ル)は、h C D 3 2 AによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示す。×(クロス)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン4によって媒介される通りである。細胞をF M A Tプレートに播種した。免疫複合体を、F I T CをB S Aにコーティングし、その後、これをF I T C特異的h I g G 1抗体と10:1のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体(I C)またはm A bのいずれかである。

【図19】クローン5によって媒介されるように、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。(円、サークル)は、h C D 3 2 AによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示す。×(クロス)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン5によって媒介される通りである。細胞をF M A Tプレートに播種した。免疫複合体を、F I T CをB S Aにコーティングし、その後、これをF I T C特異的h I g G 1抗体と10:1のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体(I C)またはm A bのいずれかである。

【図20】クローン6によって媒介されるように、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。(円、サークル)は、h C D 3 2 AによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示す。×(クロス)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン6によって媒介される通りである。細胞をF M A Tプレートに播種した。免疫複合体を、F I T CをB S Aにコーティングし、その後、これをF I T C特異的h I g G 1抗体と10:1のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体(I C)またはm A bのいずれかである。

【図21】クローン7によって媒介されるように、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。(円、サークル)は、h C D 3 2 AによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示す。×(クロス)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン7によって媒介される通りである。細胞をF M A Tプレートに播種した。免疫複合体を、F I T CをB S Aにコーティングし、その後、これをF I T C特異的h I g G 1抗体と10:1のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体(I C)またはm A bのいずれかである。

【図22】クローン8によって媒介されるように、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 Bによりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。(円、サークル)は、h C D 3 2 AによりトランスフェクションされたC H O K 1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、h C D 3 2 BによりトランスフェクションされたC

10

20

30

40

50

H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示す。× (クロス) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン 8 によって媒介される通りである。細胞を F M A T プレートに播種した。免疫複合体を、F I T C を B S A にコーティングし、その後、これを F I T C 特異的 h I g G 1 抗体と 1 0 : 1 のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体 (I C) または m A b のいずれかである。

【図 2 3】クローン 9 によって媒介されるように。h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。 (円、サークル) は、h C D 3 2 A によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示し、 (黒菱形) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示す。× (クロス) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン 9 によって媒介される通りである。細胞を F M A T プレートに播種した。免疫複合体を、F I T C を B S A にコーティングし、その後、これを F I T C 特異的 h I g G 1 抗体と 1 0 : 1 のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体 (I C) または m A b のいずれかである。

10

【図 2 4】クローン 1 0 によって媒介されるように。h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。 (円、サークル) は、h C D 3 2 A によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示し、 (黒菱形) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示す。× (クロス) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン 1 0 によって媒介される通りである。細胞を F M A T プレートに播種した。免疫複合体を、F I T C を B S A にコーティングし、その後、これを F I T C 特異的 h I g G 1 抗体と 1 0 : 1 のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体 (I C) または m A b のいずれかである。

20

30

【図 2 5】クローン 1 1 によって媒介されるように。h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。 (円、サークル) は、h C D 3 2 A によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示し、 (黒菱形) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示す。× (クロス) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン 1 1 によって媒介される通りである。細胞を F M A T プレートに播種した。免疫複合体を、F I T C を B S A にコーティングし、その後、これを F I T C 特異的 h I g G 1 抗体と 1 0 : 1 のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体 (I C) または m A b のいずれかである。

40

【図 2 6】クローン 1 2 によって媒介されるように。h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。 (円、サークル) は、h C D 3 2 A によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示し、 (黒菱形) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示す。× (クロス) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示

50

す。クローン 12 によって媒介される通りである。細胞を F M A T プレートに播種した。免疫複合体を、F I T C を B S A にコーティングし、その後、これを F I T C 特異的 h I g G 1 抗体と 10 : 1 のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体 (I C) または m A b のいずれかである。

【図 27】クローン 13 によって媒介されるように、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する用量依存的結合、ならびに、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。 (円、サークル) は、h C D 3 2 A によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示し、 (黒菱形) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する用量依存的結合を示す。x (クロス) は、h C D 3 2 B によりトランスフェクションされた C H O K 1 細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。クローン 13 によって媒介される通りである。細胞を F M A T プレートに播種した。免疫複合体を、F I T C を B S A にコーティングし、その後、これを F I T C 特異的 h I g G 1 抗体と 10 : 1 のモル比で混合することによって調製した。総強度が結合を反映し、強度が大きいほど、結合が大きい。結合は免疫複合体 (I C) または m A b のいずれかである。

【図 28】抗 C D 3 2 B 抗体の細胞特異性を示す。 抹消血から単離された P B M C を、F i c o l l 密度勾配を使用して調製した。細胞を細胞特異的マーカーにより染色し、C D 3 2 B 特異的抗体の結合について評価した。図に示されるように、B 細胞 (C D 1 9 + 細胞) のみがクローン 1 ~ 13 により陽性に染まった。

【図 29】クローン 1 ~ 13 による B 細胞の用量依存的染色。 抹消血から単離された P B M C を、F i c o l l 密度勾配を使用して調製した。細胞を C D 1 9 により染色し、その後で、10 mg / ml、1 mg / ml または 0.1 mg / ml の示されるような C D 3 2 B 特異的抗体により染色した。この図では、B 細胞 (これは、C D 3 2 B を発現することが知られている) が、C D 1 9 特異的 m A b を使用してゲートアウトされている。このゲートは「M1」と呼ばれる。C D 3 2 B m A b の濃度が低下するとき、染色された B 細胞の数が、ほぼ 100 % から、はるかに低い値にまで低下する。このことは、C D 3 2 B 特異的 m A b から予想されるように、B 細胞の特異的かつ用量依存的な染色を示す。

【図 30】F c 媒介の C D 3 2 B リン酸化を阻害するそれぞれの m A b の能力。R a j i 細胞 (C D 3 2 B 陽性) をリツキシマブ (R i t) により処理し、これにより、C D 3 2 B のリン酸化を生じさせた。これを C D 3 2 B 特異的 m A b (1 ~ 13) の非存在下または存在下で行った。図は、F c 媒介の C D 3 2 B リン酸化を阻害するそれぞれの m A b の能力を明らかにする。「TUB」= チューブリンコントロール。

【図 31】I 型抗 C D 2 0 m A b のモジュレーションの速度に対する C D 3 2 b の影響。C D 3 2 b は他の I 型抗 C D 2 0 m A b の内部移行に関与することができる。それぞれの m A b の A l e x a - 4 8 8 標識されたものを p C D N A 3 トランスフェクション R a m o s 細胞または C D 3 2 B トランスフェクション R a m o s 細胞と 1 時間または 6 時間インキュベーションし、モジュレーションの程度を以前のように求めた。使用された m A b は、リツキシマブ (R T X)、研究室で作製されたオファツムマブ (O F A) およびトシツムモマブ (T o s) であった。データは、O F A の内部移行速度が R T X の内部移行速度と類似しており、C D 3 2 b の存在によって促進されることを明瞭に示す。

【図 32】抗 C D 1 9 m A b もまた、部分的には C D 3 2 B に依存する様式で、悪性のヒト B 細胞の細胞表面から内部移行する。R a m o s h u C D 3 2 b トランスフェクタント。他の表面抗原との内部移行もまた C D 3 2 b 発現によって達成され得る。モジュレーションアッセイを、A T 1 0 による C D 3 2 阻止の存在下 (+) または非存在下 (-)、異なる m A b を用いて以前のように行った。R a m o s C D 3 2 B トランスフェクタントをこの 6 時間アッセイにおいて使用した。* p < 0.05. f 3.3 = M H C クラス I I ; R F B 9 = C D 1 9 ; R T X = リツキシマブ。m A b が細胞表面に留まるならば、

10

20

30

40

50

m A b をクエンチすることができる。m A b が内部移行されるならば、m A b をクエンチすることができない。クエンチされた % が低いほど、内部移行のレベルが高くなる。データは、C D 3 2 阻止とのインキュベーションの後で、R T X および R F B 9 の m A b については表面モジュレーションにおける有意な低下を、また、F 3 . 3 m A b については低下がほとんどないことを明瞭に示す。これらのデータは、標的抗原、例えば、C D 1 9 などをもまた、部分的には C D 3 2 B に依存し、かつ、抗 C D 3 2 b m A b によって阻止され得る様式で、悪性のヒト B 細胞の細胞表面から内部移行し得ることを示している。

【図 3 3】他の表面抗原との内部移行もまた C D 3 2 b 発現によって達成され得る。それぞれの m A b の A l e x a - 4 8 8 標識されたものを p C D N A 3 トランスフェクション R a m o s 細胞または C D 3 2 B トランスフェクション R a m o s 細胞と 2 4 時間インキュベーションし、モジュレーションの程度を以前のように求めた。* = $p < 0.05$ 。y 軸はモジュレーション / 内部移行または表面の利用可能な抗原 (%) を示す。図は、内部移行 / モジュレーションの量が h u C D 3 2 b の存在下で増大するので、このことを示す。抗 C D 1 9 m A b および抗 C D 4 0 m A b の両方については、C D 3 2 b の存在下での細胞表面抗原における統計学的に有意な (*、 $p < 0.05$) 低下が認められることに留意すること。

【図 3 4】I g G 1 - 形式におけるヒト C D 3 2 B に対する 1 4 個の抗体クローンの定常領域のアミノ酸配列。I g G 1 - C H 領域および - C L 領域のアミノ酸配列が示される。

【図 3 5】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 1 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 3 6】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 2 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 3 7】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 3 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 3 8】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 4 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 3 9】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 5 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 4 0】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 6 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 4 1】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 7 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 4 2】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 8 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 4 3】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 9 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 4 4】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 1 0 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列が V H 領域および V L 領域について示される。標識された C D R 配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図 4 5】ヒト C D 3 2 B に対する抗体クローン 1 1 の可変領域のアミノ酸配列。アミノ

10

20

30

40

50

酸配列がV H領域およびV L領域について示される。標識されたC D R配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図46】ヒトC D 3 2 Bに対する抗体クローン12の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列がV H領域およびV L領域について示される。標識されたC D R配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【図47】ヒトC D 3 2 Bに対する抗体クローン13の可変領域のアミノ酸配列。アミノ酸配列がV H領域およびV L領域について示される。標識されたC D R配列が、標識されたフレームワーク領域によって隔てられる四角で囲まれた配列として示される。

【実施例】

【0101】

実施例1：原発性C L Lサンプルおよび他のN H LサンプルにおけるC D 2 0モジュレーション。

本発明者らは以前に、C L Lサンプルのコホートにおけるリツキシマブのモジュレーションの速度および程度における不均一性を認めた(28)。これらの発見を立証し、拡張するために、本発明者らはこのコホートを合計で48例のC L Lサンプルに増やしている(図1A)。以前のように、本発明者らは、表面の利用可能なC D 2 0の量を低下させるリツキシマブおよびトシツモマブ(それぞれ、I型m A bおよびI I型m A bの臨床的に関連のあるプロトタイプ)の能力を、2時間、6時間および24時間にわたって比較した(図1A、および、データは示されず)。加えて、本発明者らはまた、再発したC L Lにおける使用について先ごろF D A承認されている研究室作製のオフアツムマブ(o f a t u m ; I型)、および、様々なN H Lのために現在、臨床開発中であるG A 1 0 1の糖非改変体(G A 1 0 1_{g l y} ; I I型)(19)を試験した。本発明者らの以前の観測結果と一致して、かなりの不均一性が、I I型m A bよりも有意に多いモジュレーションをもたらすI型m A bとの場合を除くサンプル間に認められた。6時間において、リツキシマブの存在下におけるモジュレーションは最大に近く、m A bの18%~65%(メジアンで37%)がクエンチングアッセイにおいて利用可能なままであった(図1A)。そのI型性質と一致して、オフアツムマブもまた、大きい程度のモジュレーションをもたらした(6時間において26%メジアン利用可能)。対照的に、トシツモマブおよびG A 1 0 1_{g l y} ははるかに少ないモジュレーションを示し、メジアンで、結合したm A bの80%(61%~89%の範囲)および70%(57%~81%の範囲)がそれぞれ6時間において利用可能であった。

【0102】

このC L Lコホートの範囲内において、本発明者らは、C L Lの予後において重要であることが知られているいくつかの要因を調べた。そのような要因には、Z A P - 7 0発現(29、30)、C D 3 8陽性(31、32)およびI g V H遺伝子の変異状態(31、33、34)が含まれた。結果(追加の図1A)は、これらの疾患マーカーのいずれとも相関がないことを示した。

【0103】

本発明者らは以前に、異なったモジュレーションパターンを有するそれぞれのN H Lサブタイプにもかかわらず、それらがかなりのC D 2 0モジュレーション不均一性を呈したことを明らかにした(28)。このことをさらに詳しく調べるために、本発明者らは、分析される原発性サンプルの数を、8名の健康な志願者を含むように拡大した(7例のS L L、7例のM C L、11例のF Lおよび7例のD L B C L)(図1B)。I型およびI I型のm A bがモジュレーションを誘導し得ることにおける差が、すべての組織学的サブタイプにわたって持続した。本発明者らはまた、健康な志願者に由来するB細胞におけるC D 2 0がリツキシマブの存在下で迅速にモジュレートし、しかも、悪性B細胞の場合よりも均一にモジュレートしたことを認めた。このことは、悪性に関連する要因が、認められた不均一性の一因であることを示唆する。S L L細胞およびM C L細胞に関するリツキシマブ誘導モジュレーションの速度はC L Lの場合と類似し(図1A)、一方で、D L B C LおよびF Lについては、速度が幾分か遅くなっていた(図1AからのC L Lと比較した

10

20

30

40

50

とき、それぞれ、 $p < 0.0001$ および 0.0027)。しかしながら、FLにおいて、本発明者らは、11例中2例の患者サンプルがリツキシマブを非常に迅速にモジュレートし、これにより、かろうじて検出可能なレベルのmAbまたはCD20が6時間の培養の後で残ったことを認めた。

【0104】

実施例2：B-NHLにおけるCD20のモジュレーションはFc依存のプロセスである。

本発明者らおよび他の研究者は、インビボにおける抗CD20 mAbの効力がFc依存的事であることを以前に示している(28)。本発明者らは、モジュレーションが、エフェクター細胞の非存在下でさえ、同様にFc依存的事であるかもしれないと仮定し、このことを、リツキシマブのFab'フラグメントおよびF(ab')₂フラグメントを用いた内部移行アッセイを繰り返すことによって検証した(図2A)。リツキシマブFab'は、細胞結合アッセイ(データは示されず)によって確認されるように、CD20の二価架橋を必要とすることによって、または、その低親和性の一価結合によって、そのどちらかで説明され得るであろうほんの低いレベルのモジュレーションを示した。対照的に、F(ab')₂およびIgGは類似した結合プロファイルを示し(結果は示されず)、しかし、6時間の培養の後において、F(ab')₂フラグメントは、無傷のIgG(20%の表面利用可能CD20)よりも有意に少ないモジュレーションを有していた(40%の表面利用可能CD20)。アッセイが、高度に濃縮されたB細胞(95%超の純度)を用いて行われたので、多量に存在する唯一のFcRは阻害性FcRIIbであろう。阻止する抗FcRIImAbであるAT10の存在下では、リツキシマブによるモジュレーションが低下し、ヒトIgG1を有するリツキシマブよりも低い親和性によりFcRIIbに結合するリツキシマブF(ab')₂フラグメントまたはRit m2aと同程度であった(図2B)。予想されるように、AT10との共インキュベーションは、Rit m2aのモジュレーションに対する影響をほとんどもたらさなかった。

【0105】

実施例3：正常なB細胞およびB細胞腫瘍におけるFcRIIbの発現。

FcRIIb：Fcの相互作用がCD20モジュレーションの速度に影響を与え得るであろうという可能性を仮定して、本発明者らは、正常なB細胞および本発明者らの一群の原発性B細胞腫瘍におけるFcRIIbの発現を調べた。図2Cに示されるように、FcRIIb発現の顕著な不均一性がそれぞれの群の中において認められた。CLL細胞における発現は比較的高く、イソタイプコントロールと比較して20倍から300倍に及んだ。DLBCLと、FLの大部分とは、低いFcRIIb発現を呈した。2つのFL事例は非常に高いFcRIIb発現を呈し、驚くべきことに、これらは、極めて迅速にモジュレートすることを本発明者らが以前に認めていた同じ2つの事例であった。MCLおよびSLLは、不均一にもかかわらず、中間レベルのFcRIIbを発現した(図2C)。再度ではあるが、これは以前の発見(21)と一致している。

【0106】

実施例4：FcRIIb発現はCD20モジュレーションを調節する。

まとめると、これらの発見により、FcRIIb発現が、B細胞標的からのCD20モジュレーションの主要な決定要因であるかもしれないことが示唆された。この仮説を検証するために、本発明者らは、本発明者らの利用可能な健康なB細胞サンプルおよび原発性NHLサンプルのすべてのFcRIIb発現およびCD20モジュレーション速度を比較した(図2D)。スピアマンの相関分析により、これらのパラメーターの間における強い関係が明らかにされた(スピアマンr値： -0.74 、95%信頼区間： $-0.83 \sim -0.61$ 、および、 $p < 0.0001$)。データは、FLおよびDLBCLの事例の大部分が、広範な分布を示すCLLサンプルおよびMCLサンプルとともに上部に位置する逆指数関数的な曲線を示した。このグラフはまた、低い発現レベルでは、FcRIIb発現における小さい差がCD20モジュレーションにおける比較的大きい変化の原因であり得るであろうことを明らかにしており、それにより、抗CD20：CD20複合体の

細胞表面からのクリアランスを調節することにおけるこの受容体の能力を強調する。

【0107】

CD20モジュレーションにおけるFcRIIbの役割を直接に検討するために、FcRIIb^{-ve}のRamos細胞を、FcRIIbをコードするプラスミドによりトランスフェクションした。得られたFcRIIb^{+ve}細胞は一定しないFcRIIb発現レベルを呈したので、続いて、これらのFcRIIb^{+ve}細胞を、低いFcRIIb、中程度のFcRIIbおよび高いFcRIIbを発現する各サブクローンに分けた。その後、元のFcRIIb⁻のRamos細胞と一緒に、これらの細胞を内部移行アッセイにおいて評価した。リツキシマブの存在下において、6時間でのCD20モジュレーション速度がFcRIIb発現と相関し、モジュレーションが下記の順で増大した：FcRIIb^{-ve} > FcRIIb^{+ve} 低 > FcRIIb^{+ve} 中程度 > FcRIIb^{+ve} 高（図3A）。同様に、野生型マウス、および、遺伝子組換えヒトCD20を発現するFcRIIノックアウト（KO）マウスから得られるB細胞を使用した場合、FcRIIb^{-/-}のマウスの細胞におけるモジュレーションが野生型対応体よりも少なかった（データは示されず）。だが、感知できるほどのモジュレーションがFcRIIの非存在下において認められたことには留意しなければならない。このことは、この遺伝子組換えモデルでは、FcRII以外の要因もまた、CD20モジュレーションを調節することに関与することを示している。

【0108】

FcRIIbはB細胞上のBCR活性化の負の調節因子であり（これは（35）において総説される）、また、CD20はCD20mAbによる会合の後でBCRと物理的に会合する（36、37）ので、本発明者らは、BCRの発現またはシグナル伝達活性がモジュレーションに影響し得るであろうと仮定した。したがって、これらの発見の原因としてのBCR発現における差を除外するために、BCR欠損Ramos細胞（R×3）をFcRIIbによりトランスフェクションし、CD20のモジュレーションを非操作のRamos細胞および模擬のR×3トランスフェクション細胞と比較した（図3B）。これらのデータは、BCR発現を欠くR×3細胞がRamos細胞よりも遅くモジュレートすること、しかし、この欠陥が、高レベルのFcRIIbを発現すること（FcRIIb^{+ve}のR×3細胞）によって克服され得ることを明瞭に示している。CD20モジュレーションを調節することにおけるBCRに対するFcRIIbのこの支配的役割が下記によって裏付けられる：1）本発明者らは、高いレベルのモジュレーションを、低いレベルのBCRを特徴的に発現するCLL細胞において認めていること（38）；および2）本発明者らは、何らかの相関を、CLL細胞における表面免疫グロブリン（sIg）発現と、CD20モジュレーションとの間において示すことができなかったこと（追加図1）。

【0109】

実施例5：CD20およびFcRIIbのモジュレーションに先立って、FcRIIbの活性化が生じる。

抗CD20mAbと、FcRIIbとの間における相互作用をさらに探るために、本発明者らは、細胞内ITIMモチーフにおけるチロシン-293のリン酸化によって示されるようなFcRIIbの抗体媒介される刺激を調べた。Raji細胞を、リン酸化FcRIIbについての免疫プロットングの前に、抗FcRIIb阻止mAb（AT10）の存在下または非存在下においてトシツモマブまたはリツキシマブとともに培養した。リン酸化FcRIIbを、トシツモマブではなく、リツキシマブによって刺激された細胞において評価し、リン酸化FcRIIbがAT10の添加によって阻害された（図4A）。類似した結果がDauidi細胞に関して認められた（データは示されず）。

【0110】

実施例6：CD20およびFcRIIbの架橋が主にシス様式で生じる。

リツキシマブは、同じ細胞（シス）または隣接細胞（トランス）のどちらかの表面においてCD20およびFcRIIbによって共結合され得る。このことを調べるために、

本発明者らは、P H K 2 6 標識された F c R I I b⁺ の R a m o s 細胞を高 F c R I I b 発現 R a m o s トランスフェクタント (図 4 B) とともに共培養し、その後、それぞれの細胞タイプにおけるモジュレーションのレベルを比較した (単独で培養された両方の細胞タイプをコントロールとした) 。以前に示されたように、単独で培養されたとき、F c R I I b⁺ 細胞は、F c R I I b を欠く細胞よりも大きいモジュレーションを示した (図 4 B) 。共培養では、F c R I I b⁺ におけるモジュレーションのレベルがわずかに増大し、しかし、F c R I I b⁺ 細胞において見られるレベルには達しなかった。この結果は、トランス相互作用が生じているかもしれないが、F c R I I b による C D 2 0 m A b のモジュレーションが主にシス様式で行われることを示唆する。

【 0 1 1 1 】

この発見が R a m o s 細胞株に特異的でなかったことを明らかにするために、本発明者らは、低い F c R I I b を発現する C L L サンプル (これは、P K H 2 6 標識することによって区別される) を、高レベルの F c R I I b を発現する 3 つの異なる C L L 事例に由来する細胞とともに共培養した (図 4 C) 。R a m o s 細胞を用いた以前のアッセイにおいて認められるように、混合集団において、F c R I I b が低い B 細胞におけるモジュレーションは、F c R I I b が高い集団において見られるモジュレーションに達しなかった。このことは、再度ではあるが、F c R I I b による C D 2 0 m A b のモジュレーションが主にシス様式で行われることを示唆する。しかしながら、最も早くモジュレートする C L L 細胞との共培養が、低 F c R I I b 発現 C L L のモジュレーションにおける最も大きい増大をもたらし、しかし、その増大はほどほどにすぎなかった (およそ 1 8 % ; データは示されず) ことに留意することは興味深いことである。

【 0 1 1 2 】

このタイプのさらなる実験において、C L L 細胞を、細胞 : 細胞相互作用の可能性を低下させるために、低下する濃度で培養し、その結果、細胞濃度を低下させることにより、モジュレーションが少なくなるという弱い傾向が得られた (図 4 D) 。同じ実験を、種々の濃度の R a j i 細胞を用いて繰り返した。再度ではあるが、モジュレーションの程度または範囲における変化がほとんど認められなかった (データは示されず) 。重要なことに、この実験の期間中に撮影された明視野顕微鏡法画像は、細胞間 (トランス) 相互作用の可能性が、 2×10^6 細胞 / m l と比較して、 1×10^5 細胞 / m l でははるかに少なかったことを明らかにする。そのうえ、本発明者らは、リン酸化 F c R I I b のレベルにおける顕著な差が種々の細胞密度で全く存在しなかったことを認めた (図 4 E) 。まとめると、これらのデータは、F c R I I b が、C D 2 0 m A b のモジュレーションに対するその影響を、隣り合う F c R I I b 発現細胞からのほんの小さい寄与を伴って、主には同じ細胞上での事象を介して媒介することを示している。

【 0 1 1 3 】

実施例 7 : F c R I I b はエンドサイトーシスによりリボソームに C D 2 0 とともに取り込まれる。

細胞表面でのリツキシマブの会合の後における F c R I I b の運命を突き止めるために、本発明者らはその発現および場所をフローサイトメトリーおよび共焦点顕微鏡法によってモニターした。フローサイトメトリーを使用して、本発明者らは、C L L の 6 つの異なる事例に由来する B 細胞における F c R I I b の表面発現を評価し、F c R I I b の表面発現が、トシツモマブではなく、リツキシマブとの 2 時間のインキュベーションのうちに低下したことを見出した (図 5 A) 。これらの発見は、F c R I I b が三成分複合体の一部として C D 2 0 およびリツキシマブ (トシツモマブではない) と一緒に内部移行されるかもしれないことを示唆する。

【 0 1 1 4 】

本発明者らおよび他の研究者は、初期エンドソームへのその輸送をもたらすリツキシマブのエンドサイトーシスと、リソソームにおけるその後の分解とを以前に報告している (9、28) 。同じプロセスが C L L 細胞において抗 C D 2 0 : C D 2 0 : F c R I I b 複合体の一部としての F c R I I b に関して生じたかどうかを検討するために、本発明

10

20

30

40

50

者らはC L L細胞をT o s i t - 4 8 8またはR i t u x - 4 8 8とともに培養し、その後、固定処理し、(A T 1 0に由来するA l e x a 6 4 7標識のF (a b ')₂を使用する) F c R I I bについての染色およびリソソームマーカーL A M P - 1についての染色を行った。m A bによる刺激の前では、F c R I I b染色が原形質膜において拡散しており、非局在化していた(図5 B)。抗C D 2 0 m A bとの3 0分間のインキュベーションの後において、本発明者らは、染色における明確な差を、R i t u x - 4 8 8と、T o s i t - 4 8 8との間において認めた。それによれば、T o s i t - 4 8 8は表面にもっぱら留まり、R i t u x - 4 8 8は細胞内の点状染色を明らかにし、このことは本発明者らの以前の観測結果と一致していた(図5 C、データは示されず。および(2 8))。6時間の刺激の後では、T o s i t - 4 8 8は細胞表面全域にわたって一様に分布したままであり、一方、A T 1 0 - 6 4 7は3 0分においてそのベースライン外観から変化しておらず、L A M P - 1との共局在化が全く認められなかった(図5 D)。対照的に、同じ時間経過にわたって、R i t u x - 4 8 8は異なった点状パターンを示し、細胞の大部分(5 8 %)がA T 1 0 - 6 4 7およびR i t u x - 4 8 8の間での共局在化を明らかにした(図5 E)。L A M P 1およびA T 1 0 - 6 4 7の両方とのR i t u x - 4 8 8の共局在化もまた、3 3 %の細胞において認められた。推定では、3つすべての染色の間において認められたこのより低い程度の共局在化は、R i t u x - 4 8 8およびF c R I I bと一緒に内部移行し、そして、リソソームにおけるそれらの出現の前に、おそらくは他の細胞内区画を占めるという事実を反映する。

【 0 1 1 5 】

実施例 8 : F c R I I bはI型抗C D 2 0 m A bをインビボにおいて阻害する。

F c R I I bがI型抗C D 2 0 m A bの効力をインビボにおいて阻害しているかもしれないかどうかを検討するために、本発明者らは、B細胞枯渇化実験を、h C D 2 0 T g野生型マウスにおいて、また、F c R I I bを欠くh C D 2 0 T gマウス(C D 3 2 K O)においても行った。これらの実験において、マウスを、マウスI g G 1を有するリツキシマブ変化体(m 1)またはマウスI g G 2 aを有するリツキシマブ変化体(m 2 a)により処理し(2 5 0 μ g、i v)、その後、B細胞の枯渇を、マウスの連続した採血により9 0日間にわたるフローサイトメトリー、ならびに、B 2 2 0 m A bおよびC D 1 9 m A bによる染色によってモニターした(図6)。これらの変化体はC D 3 2 bに強く結合し(m 1)、または、弱く結合する(m 2 a)。データは、m 1 イソタイプが使用されたとき、枯渇が(m 2 aと比較して)最適でないこと、および、C D 3 2の喪失が枯渇効力における実質的な改善をもたらすことを明瞭に示す。対照的に、m 2 aはC D 3 2の存在下または非存在下において概ね類似している。

【 0 1 1 6 】

実施例 9 : F c R I I bはヒト腫瘍に対する抗C D 2 0 m A bの活性をインビボにおいて高め、増強する。

ヒト腫瘍細胞に対するC D 3 2の影響、および、現行の治療用m A b、例えば、リツキシマブなどを増強する可能性を調べるために、本発明者らは異種移植片システムを用いた。このシステムでは、ヒト腫瘍細胞のみがh C D 3 2を発現し、したがって、どのような治療効果であれ、治療効果は、宿主エフェクター細胞に対する何らかの影響を介してではなく、モジュレーションを阻止することによってであると最も考えられる腫瘍細胞に対する影響に由来する。これらの実験において、C D 2 0陽性かつC D 3 2陽性のヒト腫瘍細胞(D a u d iまたはR a j i)をS C I Dマウスに接種し、その後、リツキシマブ、A T 1 0または両方のいずれかにより処理し、マウスの生存または腫瘍成長をモニターした(図7)。使用されたm A bの用量が図の凡例に示される。A)では、D a u d i細胞が皮下に接種され、腫瘍が3日~5日毎にカリパス測定によってモニターされた。BおよびCでは、R a j i腫瘍細胞が静脈内に注入され、動物が生存についてモニターされた。両方のモデルにおいて、A T 1 0は、リツキシマブの活性を高め、増強することが示された。このことはインビボにおけるこの組合せの可能性を明らかにする。

【 0 1 1 7 】

実施例 10 : F c R I I b レベルはリツキシマブ処置の M C L 患者における臨床結果を予測する。

本発明者らのインビトロ知見の概念実証として、本発明者らは、リツキシマブを受けていた M C L のコホートの F c R I I b 発現を遡及的に調べた。診断用のパラフィン包埋組織を、F c R I I b 特異的 m A b を使用して免疫組織化学によって染色した (図 1 1)。強い膜染色が F c R I I b + v e のリンパ腫サンプルにおいて認められたが、F c R I I b - v e のリンパ腫サンプルでは認められなかった。これらの結果は、フローサイトメトリーによって得られる対応する D M S O 凍結サンプルの F c R I I b 発現と関連した。I H C によって図 1 0 a および図 1 0 b に示される F c R I I b 染色は、図 2 D に示されるようなフローサイトメトリーによって示される F c R I I b 発現と関連した (2 D におけるフローサイトメトリーによって求められる値が図 1 0 a および図 1 0 b において数字の挿入として示される)。16 名の M C L 患者からなるほんの小さいコホートを研究したにもかかわらず、F c R I I b - v e のリンパ腫の患者は、F c R I I b + v e の細胞を有する患者よりも有意に良好なメジアン無進行生存を有した (メジアンがそれぞれ、852 日および 189 日であった)。図 1 0 c は、F c R I I b + サブセットおよび F c R I I b - サブセットにおける生存差を示す。これらの群は臨床的特徴の点で同程度であり (M C L 国際予後指標、データは示されず)、しかし、使用された化学療法タイプにおいて不均一性があった。このことを検討するために、本発明者らは、最初の治療についてリツキシマブまたはフルダラビンのどちらかの単剤、シクロホスファミドおよびリツキシマブ (F C R) により処置されたそのような患者における結果を調べ、類似した結果が認められた。図 1 0 d は、患者コホートが議論されるようにさらに管理された後の F c R I I b + サブセットおよび F c R I I b - サブセットにおける生存差を示す。

【 0 1 1 8 】

実施例 10 および実施例 11 における実験のための理論的根拠は下記の通りである。細胞が高レベルの C D 3 2 b (F c R I I b) を発現するならば、そのような細胞はリツキシマブをより迅速に内部移行することになる (これは、低下した % 表面利用可能 C D 2 0 として示される)。リツキシマブが細胞表面にほとんど存在しないならば、F c 依存的なエフェクター活性 (例えば、食作用または A D C C など) がより少なくなることになり、したがって、腫瘍細胞殺傷がより小さくなり、したがって、それほど広範囲でない治療結果が生じることになる。したがって、本発明者らは、M C L を有する処置患者のコホートにおける F c R I I b 発現を調べ、患者が C D 3 2 b の高発現者または低発現者であったかどうかを求めた。臨床データがこのコホートについては既に入手可能であり、したがって、その後、臨床結果を、患者が高 F c R I I b 発現腫瘍または低 F c R I I b 発現腫瘍であったかどうかに従って階層化した。仮説は、低レベルの F c R I I b を発現する腫瘍がリツキシマブにより首尾よく処置されると考えられ、高レベルの F c R I I b を発現する腫瘍はそれほど十分には処置されないと考えられるということであった。このことはまさに、臨床データにおいて示されたことである。図 1 1 は、F c R I I b 染色のために使用された m A b の特異性を示す。使用された m A b は、近縁の F c R I I a ではなく、F c R I I b を発現する細胞のみを染色する。

【 0 1 1 9 】

F c R I I b レベルを I H C によって測定し (図 1 0 b)、M C L サンプルを F c R I I b について陽性および陰性に分けた後、本発明者らは、リツキシマブに基づく治療の後での応答における明確な臨床差を認めた (図 1 0 c および図 1 0 d)。

【 0 1 2 0 】

実施例 11 - 抗 C D 3 2 b モノクローナル抗体の選択。

14 個の抗体クローンの可変領域 (V H および V L) のアミノ酸配列ならびに C D R 領域のアミノ酸配列が図 3 7 ~ 図 5 0 に示される。それぞれの場合において、定常領域 (C H および C L) は同じである。定常領域が図 3 6 に示される。

【 0 1 2 1 】

CD32B (Fc RIIb) に対する選択を、n - CoDeR (登録商標) scFv ファージディスプレイライブラリーを使用して行った。ヒトCD32Aを非標的として使用した。mIgG₃ - Fc に融合されたCD32AおよびCD32Bの細胞外ドメインをHEK293Eにおいて産生させ、プロテインAで精製した。3回の連続するタンパク質選択を行った。非標的をすべての選択において競合剤として使用した。得られたファージを個々のクローンのスクリーニングのためにscFv / Fab産生形式に変換し、E. coli Top10細菌に形質転換した。スクリーニングでは、ヒトのCD32BおよびCD32Aに対する特異性が決定され、また、スクリーニングを、コーティングされたタンパク質をELISAで使用して分析し、同様にまた、トランスフェクションされたCHO細胞によりFMATで分析した。IC阻害特性を求めるために、IgGをCD32BトランスフェクションCHO細胞と結合させ、その後、ICをIgG1コーティングのウシ血清アルブミンの形態で加えた。その後、結合したICを検出した。IgGの阻害特性が評価され得るであろう。

10

【0122】

実施例12 - 抗CD32b mAbはリツキシマブのモジュレーションを阻止することができる。

リツキシマブ - alexa488を、異なるCD32b阻止mAb (WTまたは297Q変異型) の存在下または非存在下、CD32BによりトランスフェクションされたRamos細胞に加え、モジュレーションを、1時間後、2時間後、6時間後および24時間後に評価した。CD32 mAbの阻止能についてのコントロールとして、本発明者らはまた、二重CD32a / b特異性mAbのAT10 (IgGフラグメントおよびFab2フラグメント (Fab)) を陰性コントロール (イソタイプが一致した無関係なmAb (isowtまたはnq)) とともに含めた。図12におけるデータは、3つすべてのnCoDer mAb (C1、C11およびC13) がwt形式または297q形式のどちらにおいてでもリツキシマブのモジュレーションを阻止し得ることを明瞭に示している。

20

【0123】

図13は、抗CD32b mAbがリツキシマブのモジュレーションを阻止し得ることを、13個すべてのmAbを使用して示す。加えて、コントロールのCD32陰性Ramos細胞が、CD32阻止mAbの最大影響を推定することを可能にするために含まれた。図12におけるデータは、nCoDer mAbのすべてがリツキシマブのモジュレーションを阻止できたことを明瞭に示している。

30

【0124】

前記一組の実験は、Fc RIIbがリツキシマブの内部移行を調節することを明らかにしていた。したがって、これらの実験は、抗Fc RIIb mAbによりFc RIIbを阻止することによって、リツキシマブが内部移行される量が低下するであろうかどうかを調べようとするものであった。

【0125】

実施例13。抗CD32阻止mAbの親和性と、リツキシマブ結合後のCD32bのリン酸化を妨げる能力、および、リツキシマブのモジュレーションを妨げる能力との間における相関。

40

mAbの相対的親和性を、CD32BによりトランスフェクションされたCHO細胞に対するmAb結合を測定する用量滴定実験によって求めた。簡単に記載すると、CD32Bによりトランスフェクションされた接着性CHO K1細胞をFMATプレートに播種した。IgGを30nMからおよそ0.015nMまで1:2の希釈で力価測定し、室温で1時間にわたって結合させた。洗浄後、結合したIgGを抗ヒトIgG - APCにより検出した。最後に、プレートを洗浄し、FMAT (Applied Biosystems) で読み取った。これは、標的発現細胞に対するmAb結合についてのEC50値を与え、相対的親和性に変換することができる。その後、この相対的親和性を、リツキシマブ結合後のCD32bのリン酸化を妨げる抗CD32b阻止mAbの能力と相関させた。これを、細胞を、抗CD32b mAbの存在下または非存在下においてリツキシマブによ

50

り刺激し、その後、ウエスタンブロッティングをホスホCD32bについて行うことによって求めた。その後、CD32b mAbを、CD32のリン酸化を阻止するその能力に従ってランク付けした(1が最も効果的である)。図14Aは、密接な相関が、mAbの親和性と、CD32bのリン酸化を阻止する能力との間において明白に認められたことを示す。図14Bは、強い相関が、mAbの親和性と、リツキシマブのモジュレーションを阻止する能力との間において明白に認められたことを示す。このデータから、標的細胞表面からのリツキシマブのモジュレーションを促進させることにおけるCD32Bの中心的役割が確認される。

【0126】

理論的根拠が、mAbのより大きい親和性により、FcRIIbがより良好に阻止されるであろうということであった。続いて、mAbがFcRIIbをより良好に阻止するほど、mAbはリツキシマブのモジュレーション/内部移行をより良好に阻止するであろう。このことはまさに、図14に示されたことである。親和性が大きいほど、mAbは、リツキシマブが結合することによって誘導されるFcRIIb活性化(これは、ウエスタンブロッティングによるホスホFcRIIb染色の量に測定された)をより良好に阻止し、また、同様に、モジュレーションをより良好に阻止した。

【0127】

実施例14。hCD32Bトランスフェクション細胞に対する用量依存的結合、ならびに、hCD32Bトランスフェクション細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害。

細胞をFMA Tプレートに播種した。免疫複合体を、FITCをBSAにコーティングし、その後、これをFITC特異的hIgG1抗体と10:1のモル比で混合することによって調製した。図15~図27は、hCD32Bトランスフェクション細胞に対する用量依存的結合、ならびに、クローン1~13によってそれぞれ媒介されるhCD32Bトランスフェクション細胞に対する免疫複合体の用量依存的な結合および阻害を示す。(円、サークル)は、hCD32AによりトランスフェクションされたCHO K1細胞に対する用量依存的結合を示し、(黒菱形)は、hCD32BによりトランスフェクションされたCHO K1細胞に対する依存的結合を示す。×(クロス)は、hCD32BによりトランスフェクションされたCHO K1細胞に対する免疫複合体の用量依存的阻害を示す。

【0128】

これらの実験は、1)mAbの特異性を求めるために設計される。CD32BおよびCD32Aは非常に近縁の分子である。しかしながら、CD32Bは阻害シグナルを伝えるが、CD32Aは正のシグナルを伝え、したがって、所望される効果のためには、抗体がCD32Bと結合するだけであることが不可欠である。2)さらには、CD32Bを介するシグナルを効果的に阻止するために、抗体はCD32Bと結合しなければならないだけでなく、その天然リガンドの結合、すなわち、免疫複合体(IC)を阻止しなければならない。したがって、図は、CD32A、CD32Bに対する結合、および、IC結合の阻害を示す。図は、すべてのmAbがCD32について特異的であり、かつ、CD32Aと結合しないこと、および、すべてのmAbがIC結合を阻害することを明らかにする。

【0129】

実施例15。抗CD32B抗体の細胞特異性。

抹消血から単離されたPBMCを、Ficoll密度勾配を使用して調製した。細胞を細胞特異的マーカーにより染色し、CD32B特異的抗体の結合について評価した。図28に示されるように、B細胞(CD19+細胞)のみがクローン1~13により陽性に染まった。

【0130】

休止PBMCでは、CD32BがB細胞の表面に発現されるだけであり、一方、密接に関連するCD32Aが単球および好中球の表面に発現される。前図は、トランスフェクションされたCHO細胞における特異性を示す。図28は、抗体がまた、CD32BをB細胞

10

20

30

40

50

胞上にその真に天然型の形態で発現するB細胞と結合し、一方で、抗体は、CD32Aを発現する好中球または単球を染色しないことを示す。したがって、この図は、正常な非トランスフェクションPBMCにおいて抗原が発現されるときに抗体特異性を明らかにするものである。

【0131】

実施例16。抗FcRIIbmAbクローン1~13によるB細胞の用量依存的染色。

抹消血から単離されたPBMCを、Ficoll密度勾配を使用して調製した。細胞をCD19により染色し、その後で、10mg/ml、1mg/mlまたは0.1mg/mlの示されるようなCD32B特異的抗体により染色した。図29は、それぞれのクローンによるB細胞の細胞染色がどのように用量依存的であるかを示す。

10

【0132】

図29では、B細胞（これは、CD32Bを発現することが知られている）が、CD19特異的mAbを使用してゲートアウトされている。このゲートは「M1」と呼ばれる。CD32B mAbの濃度が低下するとき、染色されたB細胞の数が、ほぼ100%から、はるかに低い値にまで低下する。このことは、CD32B特異的mAbから予想されるように、B細胞の特異的かつ用量依存的な染色を示す。

【0133】

このことは、再度ではあるが、抗体の特異性を明らかにするものである。既に述べられたように、CD32AおよびCD32Bは極めて近い関係にあり、特異的な抗体を得ることは些末なことではない。特異的な抗体はどれも用量依存的な結合を示すはずであり、このことが、図29において明らかにされることであり、すなわち、抗体用量を減らすと、染色されたB細胞の量が、最大用量において認められるようなほぼ100%から低下する。したがって、この図は、正常な非トランスフェクションB細胞において抗原が発現されるときに抗体特異性を明らかにするもうひとつのものである。

20

【0134】

実施例17。Fc媒介のCD32Bリン酸化を阻害するそれぞれのmAbの能力。

Raji細胞（CD32B陽性）をリツキシマブにより処理し、これにより、CD32Bのリン酸化を生じさせた。これをCD32B特異的mAb（1~13）の非存在下または存在下で行った。図30は、Fc媒介のCD32Bリン酸化を阻害するそれぞれのmAbの能力を明らかにする。

30

【0135】

実施例17および実施例18の背後にある仮説は、リツキシマブのFc領域がFcRIIbと結合すること、および、これにより、FcRIIbの活性化が引き起こされることである。このことがFcRIIbのITIM領域のリン酸化によって測定される。この反応を抗FcRIIbmAbにより阻止することは、リン酸化の阻止（図30）およびモジュレーションの阻止（図31および図32）を生じさせるにちがいない。wt型FcRIIb IgG1は、そのFc領域を介してFcRIIbと結合することもできるので、本発明者らは、N297Q変異体（これは、FcRIIbと結合しないFcを有する）もまた、類似する活性を有したかどうかを調べた。N297Q変異体は同一の活性を有した。

40

【0136】

実施例18。I型抗CD20mAbのモジュレーションの速度に対するCD32bの影響。

CD32bが他のI型抗CD20mAbの内部移行に関与し得ることが図31に示される。それぞれのmAbのAlexa-488標識されたものをpCDNA3によりトランスフェクションされたRamos細胞またはCD32BによりトランスフェクションされたRamos細胞と1時間または6時間インキュベーションし、モジュレーションの程度を以前のように求めた。使用されたmAbは、リツキシマブ（RTX）、研究室で作製されたオフアツムマブ（OFA）およびトシツムモマブ（Tos）であった。データは、O

50

F A の内部移行速度が R T X の内部移行速度と類似しており、C D 3 2 b の存在によって促進されることを明瞭に示す。

【 0 1 3 7 】

これらのモジュレーション影響がリツキシマブ (I 型抗 C D 2 0) に関して認められ、しかし、トシツモマブ (I I 型抗 C D 2 0 m A b) に関してはそれほど明白でなかった。したがって、本発明者らは、このことが他の抗 C D 2 0 m A b にまで及んだかどうかを検討することを望み、そこで、オフアツムマブ、すなわち、別の臨床的に関連のある I 型 m A b (T e e l i n g 、 2 0 0 4 (5 2)) を調べた。オフアツムマブは、リツキシマブと同様に、予想された通り迅速に内部移行された。

【 0 1 3 8 】

実施例 1 9 。抗 C D 1 9 m A b もまた、部分的には C D 3 2 B に依存する様式で、悪性のヒト B 細胞の細胞表面から内部移行する。

R a m o s h u C D 3 2 b トランスフェクタント。他の表面抗原との内部移行もまた C D 3 2 b 発現によって達成され得る。モジュレーションアッセイを、A T 1 0 による C D 3 2 阻止の存在下 (+) または非存在下 (-) 、異なる m A b を用いて以前のように行った。R a m o s C D 3 2 B トランスフェクタントをこの 6 時間アッセイにおいて使用した。* $p < 0.05$ 。f 3 . 3 = M H C クラス I I ; R F B P = C D 1 9 ; R T X = リツキシマブ。図 3 2 は、C D 3 2 阻止とのインキュベーションの後、R T X および R F B 9 の m A b については表面モジュレーションにおける有意な低下を、また、F 3 . 3 については低下がほとんどないことを明瞭に示す。これらのデータは、標的抗原、例えば、C D 1 9 などをもまた、部分的には C D 3 2 B に依存し、かつ、抗 C D 3 2 b m A b によって阻止され得る様式で、悪性のヒト B 細胞の細胞表面から内部移行し得ることを示している。

【 0 1 3 9 】

本発明者らは、C D 2 0 以外の標的抗原もまた F c R I I b 発現によって影響されるかどうかを明らかにすることを望んだ。したがって、本発明者らは、他の標的抗原 (C D 1 9 および M H C I I) に向けられた m A b を調べ、また、F c R I I b を阻止する m A b がそれらの内部移行を低下させるであろうかどうかを調べた。データは、C D 1 9 m A b のモジュレーションもまた、F c R I I b を阻止することによって低下することを示す。

【 0 1 4 0 】

実施例 2 0 。他の表面抗原との内部移行もまた C D 3 2 b 発現によって達成され得る。

R a m o s 細胞は C D 3 2 b を全く有しておらず、したがって、C D 3 2 B の非存在下における内部移行のレベルを明らかにする。抗原が C D 3 2 b によって内部移行され得るならば、(R a m o s - C D 3 2 B 細胞上での) その発現は内部移行のレベルを増大させることになる。

【 0 1 4 1 】

それぞれの m A b の A l e x a - 4 8 8 標識されたものを p C D N A 3 によりトランスフェクションされた R a m o s 細胞または C D 3 2 B によりトランスフェクションされた R a m o s 細胞と 2 4 時間インキュベーションし、モジュレーションの程度を以前のように求めた。* $p < 0.05$ 。図 3 3 は、他の抗原との内部移行もまた C D 3 2 b 発現によって達成されることを示す。

【 0 1 4 2 】

材料および方法

細胞

ヒト細胞株 (D a u d i 、 R a j i 、 R a m o s) を E C A C C から得て、1 0 % ウシ胎児血清 (F C S) (L o n z a 、 英国) ならびにグルタミンおよびビルビン酸塩 (とともに I n v i t r o g e n) が補充された R P M I (I n v i t r o g e n 、 英国) において維持し、3 7 、 5 % C O ₂ で培養した。B C R 発現を欠く R x 3 R a m o s 細胞は以前に作製されたものである (3 6) 。R a m o s F c R I I b トランスフェクタン

10

20

30

40

50

ト、および、空のベクターによりトランスフェクションされたコントロール細胞 (Fc R I I b 陰性) は、以前に記載されたものであり (36)、ジェネテシン (Invitrogen、英国) を添加した上記のような補充された R P M I において維持された。Fc R I I b および空のベクターによりトランスフェクションされた R x 3 細胞が同じように作製され、維持された。Fc R I I b の表面発現を、(下記に記載される) P E 標識された A T 1 0 を使用してフローサイトメトリーによって求めた。低いレベル、中程度のレベルまたは高いレベルの Fc R I I b を発現する R a m o s Fc R I I b トランスフェクタントを、F A C S A r i a フローサイトメーター (B D B i o s c i e n c e s、米国) を使用して分取した。

【0143】

血液提供者

正常なヒト B 細胞をインフォームドコンセントとともに健康な志願者から得た。抹消血を K₂E または L i H のいずれかで採取し、リンパ球を、L y m p h o p r e p (A x i s - S h i e l d、英国) を製造者のプロトコルに従って使用して分離し、B 細胞をヒト B 細胞単離キット I I (M i l t e n y i B i o t e c、ドイツ) による負の選択によって単離した。

【0144】

臨床サンプル

C L L / S L L、F L、D L B C L および M C L の各サンプルをヘルシンキ宣言に従ってインフォームドコンセントとともに得た。血液サンプルを L y m p h o p r e p により K₂E または L i H で集め、固体組織を無菌のストレーナーに通してばらばらにし、遠心分離した。細胞を、50% ヒト A B 血清および 10% D M S O が補充された R P M I において凍結保存し、ヒト組織局の許諾のもと、サウサンプトン大学ガン科学部門腫瘍バンクにおいて保存した。臨床サンプルの使用のための倫理承認をサウサンプトン・サウスウエストハンプシャー研究倫理委員会からのサウサンプトン大学病院 N H S T r u s t によって得た。C L L 細胞については、I g V H 遺伝子の変異状態 (33) および C D 3 8 の陽性 (44) を以前に詳述されるように求めた。簡単に記載すると、I g V H 分析のために、V H リーダープライマーミックスおよび C μ 1 0 0 プライマーを使用して、重鎖遺伝子を c D N A から増幅した。すべてのヌクレオチド配列を V 塩基ディレクトリーに対してアラインメントし、変異状態を、98% カットオフを使用して求めた。C D 3 8 分析のために、抗 C D 3 8 P E (クローン H B 7 ; B D B i o s c i e n c e s) を使用した。Z A P - 7 0 状態の決定を C r e s p o 他 (30) によって記載されるように行った。C L L 細胞の表面 I g 発現を以前の記載 (45、46) ようにフローサイトメトリーによって求めた。

【0145】

生存性アッセイ

細胞を、以前に詳述されるように (25)、F I T C 標識 アネキシン V および P I により染色した後、フローサイトメトリーによって生存性について評価した。

【0146】

抗体および試薬

リツキシマブは、サウサンプトン総合病院、腫瘍薬学科によって譲渡されたものである。R i t m 2 a (マウス I g G 2 a の F c 領域を有するリツキシマブ) および W R 1 7 (抗 C D 3 7) (すべてがマウス I g G 2 a) を以前の記載 (18) のように作製した。抗 Fc R I I m A b (A T 1 0) は、実験室で作製されたものであり、以前に記載されている (47)。トシツモマブは、T i m I l l i d g e 教授 (M a n c h e s t e r、英国) によって譲渡されたものである。オフアツムマブおよび G A 1 0 1 g l y (Fc 領域が改変されていないグリコシル化 G A 1 0 1) を、特許公開された配列から実験室で作製した。これらの m A b は、C H O 細胞または 2 9 3 F 細胞において作製されたものであり、したがって、臨床使用のために製造される m A b とは (例えば、それらの炭水化物構造において) 異なるかもしれないことに留意すること。A l e x a - 4 8 8 および抗

10

20

30

40

50

Alexa488試薬をInvitrogenから購入した。F(ab')₂フラグメントの製造は以前に記載されている(48)。Fab'フラグメントを、20mMの2-メルカプトエタノールとのインキュベーションを25℃で30分間行い、その後、過剰のヨードアセトアミドを添加することによって作製した。使用されたウエスタンブロッティング抗体は抗アクチン(AC74、Sigma、英国)および抗ホスホFcRIIb(Cell Signaling Technology、英国)であった。

【0147】

フローサイトメトリー

蛍光団により標識されたmAbをBD Biosciencesから得たか、または、実験室で作製した。mAbを製造者のプロトコルに従ってAlexa488(Invitrogen)とコンジュゲートした。フローサイトメトリーは以前に記載されている(49)。サンプルをFACScanまたはFACSCaliburのどちらかで評価し、データを、CellQuest Pro(すべてが、BD Biosciences)により、または、FCS Express(DeNovo Software、米国)により分析した。B細胞をAPC標識された抗ヒトCD19(実験室)により特定し、FcRIIb発現を、PE標識されたAT10(実験室)を使用して求めた。実験間の変動を考慮するために、FcRIIb発現をFcRIIb:イソタイプコントロールのGeo平均蛍光強度(MFI)の比率として表した。

【0148】

内部移行アッセイ

内部移行アッセイを以前に詳述されるように行った(28)。簡単に記載すると、2~4×10⁵細胞/ウェルを5μg/mlの最終濃度でのAlexa-488標識されたmAbとインキュベーションした。サンプルを、1時間後、2時間後、6時間後および/または24時間後に集め、2回洗浄し、再懸濁し、クエンチング抗体の抗Alexa-488(Invitrogen)の存在下または非存在下、APC標識された抗CD19と4℃で30分間インキュベーションした。その後、サンプルを1回洗浄し、フローサイトメーターで分析した。

【0149】

細胞と結合した抗CD20mAbのFc領域の、隣接細胞上のFcRIIbとの相互作用を調べるために、Ramos細胞(これはFcRIIb⁺である)を製造者の説明書に従ってPHK26(Sigma Aldrich)により標識した。その後、PKH26標識された細胞を、FcRIIbによりトランスフェクションされたRamos細胞の等しい数(2.5×10⁵細胞)とともに共培養した。両方の細胞タイプをコントロールとして単独で培養した。その後、内部移行アッセイを上記のように行い、モジュレーションをPKH26標識集団およびPKH26非標識集団で比較した。この共培養アッセイのさらなる変形が図の凡例に記載される。

【0150】

ウエスタンブロッティング

プロトコルは以前に記載されている(36)。簡単に記載すると、約2×10⁶細胞/ウェルをmAb(5~10μg/ml)とインキュベーションした。その後、サンプルをSDS-PAGEによって分離し、タンパク質を直ちにPVDFメンブラン転写した。メンブランを5%(w/v)脱脂乾燥乳によりブロッキング処理し、適切に希釈された一次抗体とインキュベーションし、洗浄し、その後、西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートされた抗ウサギIgGまたは抗マウスIgG(Sigma Aldrich)とインキュベーションし、強化化学発光(ECL、GE Healthcare、英国、または、Pierce Biotechnology、英国)、および、感光性フィルム(Hyperfilm ECL、GE Healthcare、英国)またはBiospectrum AC Imaging System(UVP、英国)への露光によって可視化した。

【0151】

光学顕微鏡観察および共焦点顕微鏡観察

抗CD20mAbおよびFc RIIbの細胞内輸送を明らかにするために、CLL細胞を、図の凡例に記載されるような様々な時間にわたって、適切なAlexa488標識されたmAbとインキュベーションし、その後、集め、洗浄し、2%パラホルムアルデヒドにより固定処理した。Fc RIIbおよびLAMP-1をそれぞれ検出するために、その後、細胞を0.3%サポニンにより透過処理し、Alexa-647標識されたAT10 F(ab')₂ (標識化が、Alexa Fluor-467標識キット(Invitrogen)を製造者のプロトコルに従って用いて行われた)、および/または、ビオチンコンジュゲート化抗ヒトCD107a(LAMP-1)(eBioscience、英国)とインキュベーションした。その後、細胞を洗浄し、ストレプトアビジン-Alexa Fluor-547(Invitrogen)を加え、その後、さらに洗浄した。その後、細胞をスライドの上に移し、画像を、TCS-SP5レーザー走査共焦点顕微鏡(Leica Microsystems、英国)(10xの接眼レンズ、10xの対物レンズ)においてLAS-AF v2ソフトウェアを使用して取り込んだ。

10

【0152】

種々の細胞希釈度での細胞近傍を明らかにするために、細胞を1~20×10⁵個/mlで播種し、様々なmAbにより2時間および/または6時間刺激し、その後、それらの比較的近傍を光学顕微鏡観察によって評価した。細胞を、10xまたは20x/0.25のPHレンズを使用するOlympus CKX21倒立型顕微鏡(Olympus、英国)により調べた。画像を、CCL2デジタル冷却カメラ(Olympus)を使用して取得し、Cell Bソフトウェア(Olympus Soft imaging solutions)およびAdobe Photoshop(バージョンCS2)ソフトウェア(Adobe、San Jose、CA)により処理した。

20

【0153】

統計学的分析

統計学的分析を、GraphPad Prism(GraphPad Software、米国)を使用して行った。対になったノンパラメトリックデータを、ウィルコクソンのペアード検定を使用して分析し、一方で、対になっていないデータはマン・ホイットニー検定を使用して分析した。

30

【0154】

例示的な組成物、配合物および投与様式

本発明は、疾患、障害または感染に伴う1つまたは複数の症状を、効果的な量の本発明の医薬組成物を対象または患者に投与することによって処置、予防または改善する方法を提供する。

【0155】

具体的な実施形態において、対象または患者は動物であり、好ましくは哺乳動物であり、例えば、非霊長類(例えば、ウシ、ブタ、ウマ、ネコ、イヌ、ラットなど)および霊長類(例えば、サル(例えば、カニクイサルなど)およびヒト)である。好ましい実施形態において、対象はヒトである。

40

【0156】

様々な送達システムが知られており、それらを、本発明の組成物を投与するために使用することができる(例えば、リポソームにおける封入、マイクロ粒子、マイクロカプセル、抗体を発現することができる組換え細胞など)。

【0157】

いくつかの実施形態において、本発明の組成物は、本発明の抗体の標的化された送達のためにリポソームに配合される。リポソームは、水相を包み込む同心状に整列したリン脂質二重層から構成される小胞である。リポソームは典型的には、様々なタイプの脂質、リン脂質および/または表面活性剤を含む。リポソームの構成成分が、生物学的膜の脂質配置と類似する二重層形態で配置される。リポソームは、部分的にはその生体適合性、低い免疫原性および低い毒性のために特に好ましい送達ビヒクルである。リポソームを調製す

50

るための様々な方法がこの技術分野では知られており、本発明において包含される。例えば、E p s t e i n他、1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688; Hwang et al, 1980 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030-4; 米国特許第4, 485, 045号および同第4, 544, 545号を参照のこと（これらのすべてがそれらの全体において参照によって本明細書中に組み込まれる）。

【0158】

本発明の組成物を投与する方法には、非経口投与（例えば、皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内および皮下）、硬膜外投与および粘膜投与（例えば、鼻腔内経路および経口経路）が含まれるが、これらに限定されない。具体的な実施形態において、本発明の組成物は、筋肉内、静脈内または皮下に投与される。組成物は、どのような経路であれ、好都合な経路によって投与することができ、例えば、注入またはボラス注射によって、あるいは、上皮または粘膜皮膚の内張り（例えば、口腔粘膜、直腸粘膜および腸粘膜など）を介した吸収によって投与することができ、また、他の生物学的に活性な薬剤と一緒に投与することができる。投与は全身的または局所的であることが可能である。加えて、肺投与もまた、例えば、吸入器またはネブライザーの使用およびエアロゾル化剤との配合によって用いることができる。米国特許第6, 019, 968号；同第5, 985, 309号；同第5, 934, 272号；同第5, 874, 064号；同第5, 855, 913号；同第5, 290, 540号；および同第4, 880, 078号；およびPCT公開番号WO92/19244号；同WO97/32572号；同WO97/44013号；同WO98/31346号；および同WO99/66903号を参照のこと（これらのそれぞれがその全体において参照によって本明細書中に組み込まれる）。

【0159】

障害に伴う1つまたは複数の症状の処置、予防または改善において効果的であろう本発明の組成物の量は、標準的な臨床技術によって決定することができる。配合において用いられるための正確な用量はまた、投与経路および状態の重症度に依存することになり、医師の判断および各患者の状況に従って決定されなければならない。効果的な用量は、インビトロ試験システムまたは動物モデル試験システムに由来する用量応答曲線から推定される場合がある。

【0160】

本発明によって包含される抗体について、患者に投与される投薬量は典型的には、組合せにおけるそれぞれの抗体について独立して0.0001mg/kg患者体重～100mg/kg患者体重である。好ましくは、患者に投与されるそれぞれの抗体の投薬量は、0.0001mg/kg患者体重～20mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～10mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～5mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～2mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～1mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～0.75mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～0.5mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～0.25mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～0.15mg/kg患者体重、0.0001mg/kg患者体重～0.10mg/kg患者体重、0.001mg/kg患者体重～0.5mg/kg患者体重～0.25mg/kg患者体重、または、0.01mg/kg患者体重～0.10mg/kg患者体重である。一般に、ヒト抗体は、異物ポリペプチドに対する免疫応答のために、他の生物種に由来する抗体よりも長いヒト体内における半減期を有する。したがって、ヒト抗体のより少ない投薬量およびより少ない投与頻度が多くの場合、可能である。さらに、本発明の抗体またはそのフラグメントの投薬量および投与頻度は、抗体の取り込みおよび組織浸透を修飾（例えば、脂質化など）により高めることによって減らすことができる。

【0161】

1つの実施形態において、患者に投与される本発明の組成物の抗体のそれぞれの投薬量が0.01mg/日～1000mg/日である。

【0162】

本発明の組成物は、予防的または治療的に効果的な量の本明細書中に開示されるような薬剤および抗体と、医薬的に許容されるキャリアとを含む。

【0163】

具体的な実施形態において、用語「医薬的に許容される」は、規制当局によって承認されていること、あるいは、動物における使用、より具体的にはヒトにおける使用のために米国薬局方または他の一般に承認された薬局方に収載されていることを意味する。用語「キャリア」は、治療剤と一緒に投与される希釈剤、アジュバント（例えば、フロイントアジュバント（完全および不完全））、賦形剤またはビヒクルを示す。そのような医薬用キャリアは無菌の液体が可能であり、例えば、水およびオイルなどが可能であり、オイルには、石油起源、動物起源、植物起源または合成起源のものが含まれ、例えば、ピーナツ油、ダイズ油、鉱油およびゴマ油などが含まれる。医薬組成物が静脈内投与されるときには、水が、好ましいキャリアである。生理的食塩水溶液ならびにデキストロース水溶液およびグリセロール水溶液はまた、特に注射可能な溶液のための液体キャリアとして用いることができる。好適な医薬用賦形剤には、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、グリセロールモノステアラート、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水およびエタノールなどが含まれる。組成物はまた、所望されるならば、少量の湿潤化剤または乳化剤、あるいは、pH緩衝化剤を含有することができる。それらの組成物は、溶液、懸濁物、乳化物、錠剤、ビル、カプセル、粉末および持続放出配合物などの形態を取ることができる。

【0164】

様々な実施形態において、抗体および薬剤は同時に投与することができ、あるいは、1時間未満の間隔を置いて、約1時間の間隔を置いて、約1時間～約2時間の間隔を置いて、約2時間～約3時間の間隔を置いて、約3時間～約4時間の間隔を置いて、約4時間～約5時間の間隔を置いて、約5時間～約6時間の間隔を置いて、約6時間～約7時間の間隔を置いて、約7時間～約8時間の間隔を置いて、約8時間～約9時間の間隔を置いて、約9時間～約10時間の間隔を置いて、約10時間～約100時間の間隔を置いて、約11時間～約12時間の間隔を置いて、24時間を超えない間隔を置いて、または、48時間を超えない間隔を置いて投与することができる。好ましい実施形態において、2つ以上の成分が、同一の患者診療の際に投与される。

【0165】

本明細書中に示される投薬量および投与頻度は、治療効果的および予防効果的の用語によって包含される。投薬量および頻度はさらに、典型的には、投与される具体的な治療剤または予防剤、疾患の重篤度およびタイプ、投与経路、同様にまた、患者の年齢、体重、応答および過去の病歴に依存して、それぞれの患者について特異的な要因に従って変化するであろう。好適な療法が、そのような要因を考慮することによって、また、例えば、文献に報告される投薬量、および、Physicians' s Desk Reference（第56版、2002）において推奨される投薬量に従うことによって当業者により選択され得る。

【0166】

概要

近年、本発明者らは、リツキシマブのようなI型mAbが、ヒトCD20 TgマウスのB細胞の表面から（インビトロおよびインビボで）、また、NHL患者に由来するある種の原発性腫瘍細胞からモジュレートし、それにより、エフェクターを動員し、標的細胞を枯渇させるそれらの能力を制約することを見出した（28）。本発明者らは、リツキシマブおよび他のI型CD20 mAbの治療活性の制約を説明するための、また、重要なことであるが、このプロセスの阻止または回避のための可能性を提供し、それにより、より強力な試薬を開発するための起こり得る機構を検討している。本研究は、リツキシマブおよびオフアツムマブによって誘導されるCD20モジュレーションについての分子的根拠を提供する。Fc RIIb発現が、I型抗CD20 mAbに対する応答についての重要な

予後マーカーを提供するにちがいない。原発性CLL/SLL細胞がI型抗CD20mAbとともに培養されたとき、CD20の有意な、しかし、不均一なモジュレーションが認められたが、この不均一性はCLLにおける知られている予後因子に関連づけることができないであろう。他のB-NHLサブタイプの分析では、MCLが、CLLと類似する不均一なモジュレーションを呈したことが示された。これらの結果に基づいて、本発明者らは今回、これらの悪性腫瘍におけるFcRIIb発現のレベルと、これらの悪性腫瘍が6時間の培養においてモジュレートする程度との間における密接な相関を報告する。そのうえ、本発明者らは、このモジュレーションにより、これらの疾患において見られるリツキシマブに対する応答における不均一性のいくらかが説明され得ることを示唆する。リツキシマブは、化学療法との併用でDLBCLおよびFL（これらにおいて、リツキシマブが第一選択の治療として確立している）において最も有効であることが証明されているものである。それに反して、リツキシマブによるCLLにおけるOSでの改善を実証することはより困難であることが判明しており（39）、MCLにおけるその利益は一層ほどほどである（5）。したがって、一般的な知見として、FcRIIbを発現するB細胞悪性腫瘍は、CD20をモジュレートし、かつ、リツキシマブ処置からの利益をそれほど受けない可能性がより大きいと考えられた。しかしながら、DLBCLおよびFLの範囲内でさえ、一部の事例はリツキシマブに対して応答しない。一例として、形質転換したFL事例は一般に、治療に対する応答が不良であり、かつ、FcRIIbを発現する（21）。これは、高FcRIIb発現サンプルの1つ（図2C）がFLとして特定され、それに対応してモジュレーションの大きい速度を明らかにしたという本発明者ら自身の発見と一致する観察結果である。ただ1つだけの事例に基づくが、本発明者らは、このことが潜在的には、リツキシマブに対する抵抗性の重要な手段をもたらし得るであろうと思っている。

【0167】

CD20モジュレーションは、B-NHL疾患サブタイプにもかわらず、FcRIIb発現レベルとの強い相関を示した。FcRIIbが、エフェクター細胞上の活性化Fc受容体と競合し、それにより、細胞毒性のシグナル伝達を阻害することによって治療でのmAbの効力を阻害している可能性があることが以前に示唆された（40）。本発明者らのインビトロ研究では、リツキシマブが、主に同じ細胞においてCD20およびFcRIIbを共架橋し、それにより、FcRIIbの活性化、および、分解のためのリソソーム内への、結合したmAbと一緒に両方の表面抗原の迅速な対になった内部移行を生じさせることが示唆される。FcRIIbの発現は、低下したエフェクター細胞動員を、標的細胞上のmAbの表面発現をダウンレギュレーションするその能力を介して生じさせるようである。

【0168】

本発明者らはまた、阻止する抗FcRIIb mAbとの共インキュベーションにより、FcRIIbの活性化およびリツキシマブの迅速な内部移行の両方を妨げることが可能であったことを示した。まとめると、これらのデータから、FcRIIbの活性化と、細胞表面からのmAbの迅速な内部移行との間における直接的な連係が確認される。

【0169】

種々のB-NHLサブタイプにわたるI型抗CD20mAbによって誘導されるCD20モジュレーションと、FcRIIb発現との間における強い相関は、本発明者らのトランスフェクション研究と同様に、FcRIIbがCD20モジュレーションの重要な調節因子であることを示唆する。

【0170】

他のグループがリンパ腫におけるFcRIIbの役割を調べている。Camilleri-Broët他（20）は、R-CHOPに対する応答と、FcRIIb発現との間における有意な関係をDLBCLにおいて何ら示すことができず、しかしながら、18%（234事例中42）のみが、より早期の系列において免疫組織化学によってFcRIIb陽性であると思われた（21）。陽性の頻度が比較的低いことを考慮すると、陽性

事例の数が、差を検出するためには不十分であったかもしれないことが考えられる。過剰発現の代わりに、WengおよびLevy(24)は、FcRIIbの2つの対立因子(232I対立因子、これは自己免疫疾患において232T対立因子よりもBCR媒介のカルシウム調節において効率的である(22、23))がリツキシマブの効力と関連づけられるかどうかを調べたが、この多型と、単剤リツキシマブ治療に対する応答との間における相関をFL患者において何ら明らかにすることができなかった。主な関心事は、著者ら自身によって提起されたものであるが、17名の患者のみが232T対立因子を有したということであった(再度ではあるが、このことが研究の検出力を制限している)。加えて、研究された多型は、自己免疫疾患におけるBCR阻害の効率を反映したものであり、これらの多型がリンパ腫において関連があること、または、ヒトIgG1のFc結合に影響することを示す観測結果は何ら発表されていない。FcRIIb発現は、内部移行の速度を調節するその能力により、I型mAb(リツキシマブおよびオファツムマブを含む)による免疫治療の成功に関する重要な予後指標となるであろう。FcRIIb発現はII型mAb治療に対してはそれほど顕著な影響を有しないかもしれない。

【0171】

そのうえ、2つの異なるインビボモデルにおいて、本発明者らは、CD32がmAbの効力を制約し得ること、および、抗CD32b mAbはこの制約を克服し、かつ、リツキシマブ治療を増強し得ることを明らかにしている。

【0172】

参考文献

1. Feugier, P., Van Hoof, A., Sebban, C., Solal-Celigny, P., Bouabdallah, R., Ferme, C., Christian, B., Lepage, E., Tilly, H., Morschhauser, F., et al. 2005. Long-term results of the R-CHOP study in the treatment of elderly patients with diffuse large B-cell lymphoma: a study by the Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *J Clin Oncol* 23:4117-4126.
2. Sehn, L.H., Donaldson, J., Chhanabhai, M., Fitzgerald, C., Gill, K., Kisa, R., MacPherson, N., O'Reilly, S., Spinelli, J.J., Sutherland, J., et al. 2005. Introduction of combined CHOP plus rituximab therapy dramatically improved outcome of diffuse large B-cell lymphoma in British Columbia. *J Clin Oncol* 23:5027-5033.
3. Marcus, R., Imrie, K., Belch, A., Cunningham, D., Flores, E., Catalano, J., Solal-Celigny, P., Offner, F., Walewski, J., Raposo, J., et al. 2005. CVP chemotherapy plus rituximab compared with CVP as first-line treatment for advanced follicular lymphoma. *Blood* 105:1417-1423.
4. Marcus, R., Imrie, K., Solal-Celigny, P., Catalano, J.V., Dmoszynska, A., Raposo, J.C., Offner, F.C., Gomez-Codina, J., Belch, A., Cunningham, D., et al. 2008. Phase III study of R-CVP compared with cyclophosphamide, vincristine, and prednisone alone in patients with previously untreated advanced follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 26:4579-4586.
5. Lenz, G., Dreyling, M., Hoster, E., Wormann, B., Duhrsen, U., Metzner, B., Eimermacher, H., Neubauer, A., Wandt, H., Steinhauer, H., et al. 2005. Immunochemotherapy with rituximab and cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone significantly improves response and time to treatment failure, but not long-term outcome in patients with previously untreated mantle cell lymphoma: results of a prospective randomized trial of the German Low Grade Lymphoma Study Group (GLSG). *J Clin Oncol* 23:1984-1992.
6. Kharfan-Dabaja, M.A., Fahed, R., Hussein, M., and Santos, E.S. 2007. Evolving role of monoclonal antibodies in the treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Investig Drugs* 16:1799-1815.
7. Stolz, C., and Schuler, M. 2009. Molecular mechanisms of resistance to

10

20

30

40

50

Rituximab and pharmacologic strategies for its circumvention. *Leuk Lymphoma* 50:873-885.

8. Davis, T.A., Czerwinski, D.K., and Levy, R. 1999. Therapy of B-cell lymphoma with anti-CD20 antibodies can result in the loss of CD20 antigen expression. *Clin Cancer Res* 5:611-615.

9. Michel, R.B., and Mattes, M.J. 2002. Intracellular accumulation of the anti-CD20 antibody 1F5 in B-lymphoma cells. *Clin Cancer Res* 8:2701-2713.

10. Hiraga, J., Tomita, A., Sugimoto, T., Shimada, K., Ito, M., Nakamura, S., Kiyoi, H., Kinoshita, T., and Naoe, T. 2009. Down-regulation of CD20 expression in B-cell lymphoma cells after treatment with rituximab-containing combination chemotherapies: its prevalence and clinical significance. *Blood* 113:4885-4893.

11. Treon, S.P., Mitsiades, C., Mitsiades, N., Young, G., Doss, D., Schlossman, R., and Anderson, K.C. 2001. Tumor Cell Expression of CD59 Is Associated With Resistance to CD20 Serotherapy in Patients With B-Cell Malignancies. *J Immunother* (1991) 24:263-271.

12. Golay, J., Lazzari, M., Facchinetti, V., Bernasconi, S., Borleri, G., Barbui, T., Rambaldi, A., and Introna, M. 2001. CD20 levels determine the *in vitro* susceptibility to rituximab and complement of B-cell chronic lymphocytic leukemia: further regulation by CD55 and CD59. *Blood* 98:3383-3389.

13. Jazirehi, A.R., Vega, M.I., and Bonavida, B. 2007. Development of rituximab-resistant lymphoma clones with altered cell signaling and cross-resistance to chemotherapy. *Cancer Res* 67:1270-1281.

14. Weng, W.K., and Levy, R. 2003. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21:3940-3947.

15. Clynes, R.A., Towers, T.L., Presta, L.G., and Ravetch, J.V. 2000. Inhibitory Fc receptors modulate *in vivo* cytotoxicity against tumor targets. *Nat Med* 6:443-446.

16. Uchida, J., Hamaguchi, Y., Oliver, J.A., Ravetch, J.V., Poe, J.C., Haas, K.M., and Tedder, T.F. 2004. The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20 antibody immunotherapy. *J Exp Med* 199:1659-1669.

17. Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. 2007. Antibodies, Fc receptors and cancer. *Curr Opin Immunol* 19:239-245.

18. Beers, S.A., Chan, C.H., James, S., French, R.R., Attfield, K.E., Brennan, C.M., Ahuja, A., Shlomchik, M.J., Cragg, M.S., and Glennie, M.J. 2008. Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood* 112:4170-4177.

19. Mossner, E., Brunker, P., Moser, S., Puntener, U., Schmidt, C., Herter, S., Grau, R., Gerdes, C., Nopora, A., van Puijenbroek, E., et al. Increasing the efficacy of CD20 antibody therapy through the engineering of a new type II anti-CD20 antibody with enhanced direct- and immune effector cell-mediated B-cell cytotoxicity. *Blood*.

20. Camilleri-Broet, S., Mounier, N., Delmer, A., Briere, J., Casasnovas, O., Cassard, L., Gaulard, P., Christian, B., Coiffier, B., and Sautes-Fridman, C. 2004. FcγRIIB expression in diffuse large B-cell lymphomas does not alter the response to CHOP+rituximab (R-CHOP). *Leukemia* 18:2038-2040.

21. Camilleri-Broet, S., Cassard, L., Broet, P., Delmer, A., Le Touneau, A., Diebold, J., Fridman, W.H., Molina, T.J., and Sautes-Fridman, C. 2004. Fcγ

10

20

30

40

50

RIIB is differentially expressed during B cell maturation and in B-cell lymphoma s. *Br J Haematol* 124:55-62.

22. Li, X., Wu, J., Carter, R.H., Edberg, J.C., Su, K., Cooper, G.S., and Kimberlly, R.P. 2003. A novel polymorphism in the Fcγ receptor IIB (CD32B) transmembrane region alters receptor signaling. *Arthritis Rheum* 48:3242-3252.

23. Kono, H., Kyogoku, C., Suzuki, T., Tsuchiya, N., Honda, H., Yamamoto, K., Tokunaga, K., and Honda, Z. 2005. FcγRIIB Ile232Thr transmembrane polymorphism associated with human systemic lupus erythematosus decreases affinity to lipid rafts and attenuates inhibitory effects on B cell receptor signaling. *Hum Mol Genet* 14:2881-2892.

24. Weng, W.K., and Levy, R. 2009. Genetic polymorphism of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIb is not associated with clinical outcome in patients with follicular lymphoma treated with rituximab. *Leuk Lymphoma* 50:723-727.

25. Chan, H.T., Hughes, D., French, R.R., Tutt, A.L., Walshe, C.A., Teeling, J.L., Glennie, M.J., and Cragg, M.S. 2003. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. *Cancer Res* 63:5480-5489.

26. Cragg, M.S., and Glennie, M.J. 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. *Blood* 103:2738-2743.

27. Ivanov, A., Beers, S.A., Walshe, C.A., Honeychurch, J., Alduaij, W., Cox, K.L., Potter, K.N., Murray, S., Chan, C.H., Klymenko, T., et al. 2009. Monoclonal antibodies directed to CD20 and HLA-DR can elicit homotypic adhesion followed by lysosome-mediated cell death in human lymphoma and leukemia cells. *J Clin Invest* 119:2143-2159.

28. Beers, S.A., French, R.R., Chan, H.T., Lim, S.H., Jarrett, J.C., Vidal, R.M., Wijayaweera, S.S., Dixon, S.V., Kim, H.J., Cox, K.L., et al. 2010. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies. *Blood*:In press.

29. Wiestner, A., Rosenwald, A., Barry, T.S., Wright, G., Davis, R.E., Henrickson, S.E., Zhao, H., Ibbotson, R.E., Orchard, J.A., Davis, Z., et al. 2003. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 101:4944-4951.

30. Crespo, M., Bosch, F., Villamor, N., Bellosillo, B., Colomer, D., Rozman, M., Marce, S., Lopez-Guillermo, A., Campo, E., and Montserrat, E. 2003. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 348:1764-1775.

31. Damle, R.N., Wasil, T., Fais, F., Ghiotto, F., Valetto, A., Allen, S.L., Buchbinder, A., Budman, D., Dittmar, K., Kolitz, J., et al. 1999. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1840-1847.

32. Ibrahim, S., Keating, M., Do, K.A., O'Brien, S., Huh, Y.O., Jilani, I., Lerner, S., Kantarjian, H.M., and Albitar, M. 2001. CD38 expression as an important prognostic factor in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 98:181-186.

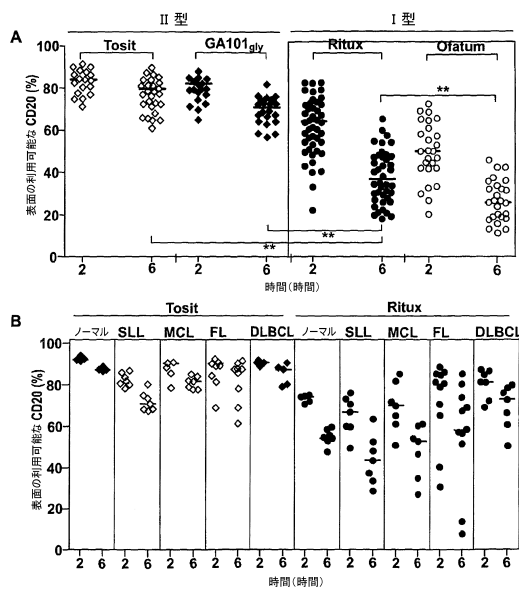
33. Hamblin, T.J., Davis, Z., Gardiner, A., Oscier, D.G., and Stevenson, F.K. 1999. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 94:1848-1854.

34. Krober, A., Seiler, T., Benner, A., Bullinger, L., Bruckle, E., Lichter, P., Dohner, H., and Stilgenbauer, S. 2002. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 100:1410-1416.

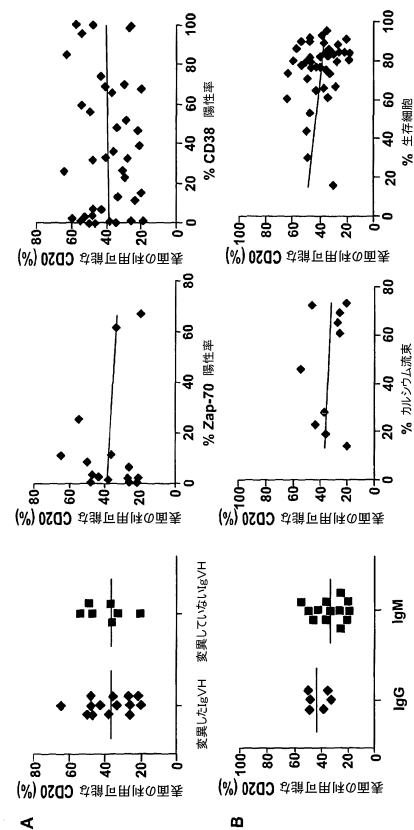
35. Ravetch, J.V., and Bolland, S. 2001. IgG Fc receptors. *Annu Rev Immunol* 19:275-290.
36. Walshe, C.A., Beers, S.A., French, R.R., Chan, C.H., Johnson, P.W., Packham, G.K., Glennie, M.J., and Cragg, M.S. 2008. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *J Biol Chem* 283:16971-16984.
37. Polyak, M.J., Li, H., Shariat, N., and Deans, J.P. 2008. CD20 homo-oligomers physically associate with the B cell antigen receptor. Dissociation upon receptor engagement and recruitment of phosphoproteins and calmodulin-binding proteins. *J Biol Chem* 283:18545-18552. 10
38. Ternynck, T., Dighiero, G., Follezu, J., and Binet, J.L. 1974. Comparison of normal and CLL lymphocyte surface Ig determinants using peroxidase-labeled antibodies. I. Detection and quantitation of light chain determinants. *Blood* 43:789-795.
39. Robak, T., Dmoszynska, A., Solal-Celigny, P., Warzocha, K., Loscertales, J., Catalano, J., Afanasiev, B.V., Larratt, L., Geisler, C.H., Montillo, M., et al. Rituximab Plus Fludarabine and Cyclophosphamide Prolongs Progression-Free Survival Compared With Fludarabine and Cyclophosphamide Alone in Previously Treated Chronic Lymphocytic Leukemia. *J Clin Oncol*.
40. Fridman, W.H., Teillaud, J.L., Bouchard, C., Teillaud, C., Astier, A., Tartour, E., Galon, J., Mathiot, C., and Sautes, C. 1993. Soluble Fc gamma receptors. *J Leukoc Biol* 54:504-512. 20
41. Nimmerjahn, F., and Ravetch, J.V. 2008. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. *Nat Rev Immunol* 8:34-47.
42. Aman, M.J., Tosello-Tramont, A.C., and Ravichandran, K. 2001. Fc gamma RIIB1/SHIP-mediated inhibitory signaling in B cells involves lipid rafts. *J Biol Chem* 276:46371-46378.
43. Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W., French, R.R., and Glennie, M.J. 2003. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101:1045-1052. 30
44. Hamblin, T.J., Orchard, J.A., Ibbotson, R.E., Davis, Z., Thomas, P.W., Stevenson, F.K., and Oscier, D.G. 2002. CD38 expression and immunoglobulin variable region mutations are independent prognostic variables in chronic lymphocytic leukemia, but CD38 expression may vary during the course of the disease. *Blood* 99:1023-1029.
45. Mockridge, C.I., Potter, K.N., Wheatley, I., Neville, L.A., Packham, G., and Stevenson, F.K. 2007. Reversible anergy of sIgM-mediated signaling in the two subsets of CLL defined by VH-gene mutational status. *Blood* 109:4424-4431.
46. Potter, K.N., Mockridge, C.I., Neville, L., Wheatley, I., Schenk, M., Orchard, J., Duncombe, A.S., Packham, G., and Stevenson, F.K. 2006. Structural and functional features of the B-cell receptor in IgG-positive chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 12:1672-1679. 40
47. Greenman, J., Tutt, A.L., George, A.J., Pulford, K.A., Stevenson, G.T., and Glennie, M.J. 1991. Characterization of a new monoclonal anti-Fc gamma RII antibody, AT10, and its incorporation into a bispecific F(ab')₂ derivative for recruitment of cytotoxic effectors. *Mol Immunol* 28:1243-1254.
48. Glennie, M.J., McBride, H.M., Worth, A.T., and Stevenson, G.T. 1987. Preparation and performance of bispecific F(ab' gamma)₂ antibody containing thioether-linked Fab' gamma fragments. *J Immunol* 139:2367-2375.
49. Tutt, A.L., French, R.R., Illidge, T.M., Honeychurch, J., McBride, H.M. 50

- , Penfold, C.A., Fearon, D.T., Parkhouse, R.M., Klaus, G.G., and Glennie, M.J. 1998. Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma: signaling activity on tumor cells appears more important than recruitment of effectors. *J Immunol* 161:3176-3185.
50. Beer, S.A. et al. 2010. *Seminars in Haematology* 47(2):pp107-114
51. Niederfellner, G et al. 2011. *Blood* 118, 358-367.
52. Teeling, J.L. 2004. *Blood* 104, 1793-1800.

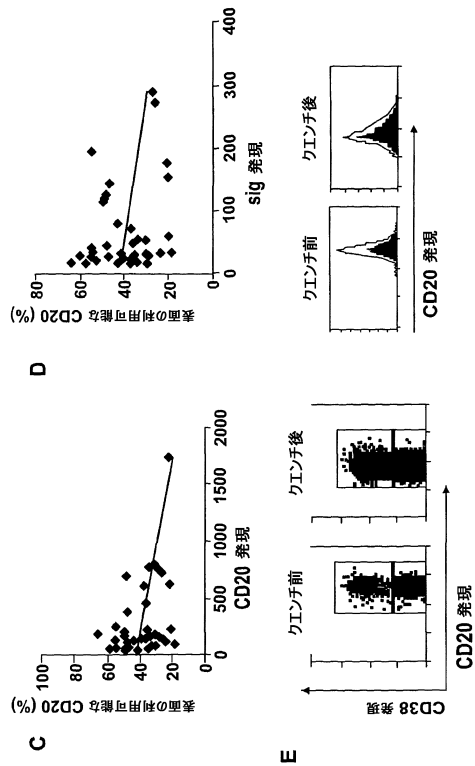
【図 1 - 1】



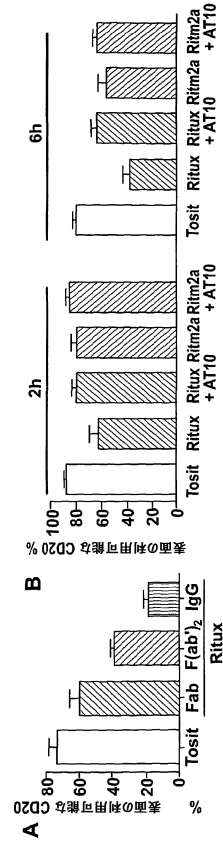
【図 1 - 2】



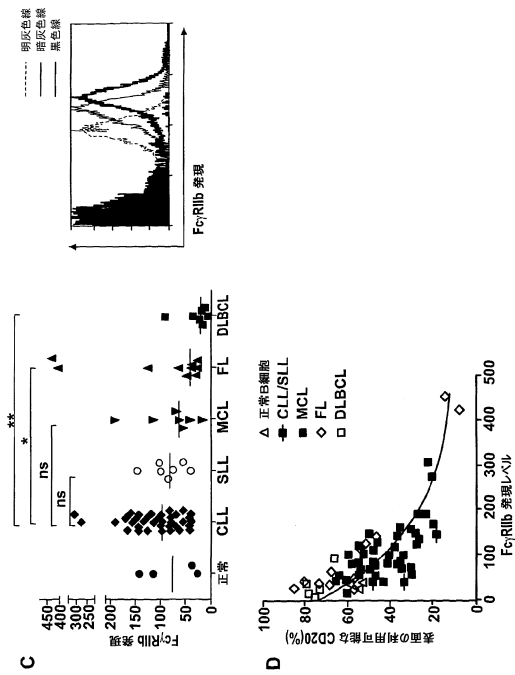
【図 1 - 3】



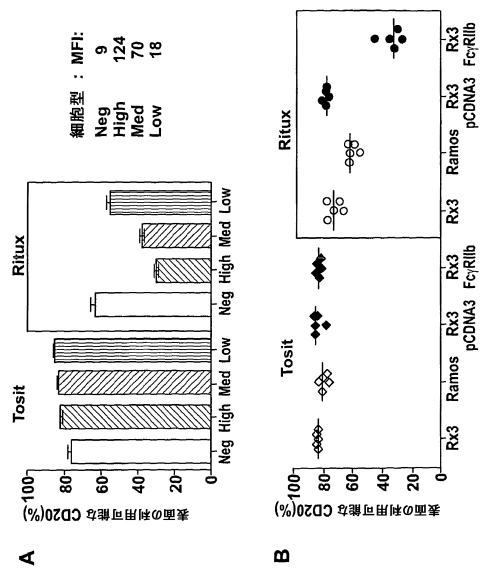
【図 2 - 1】



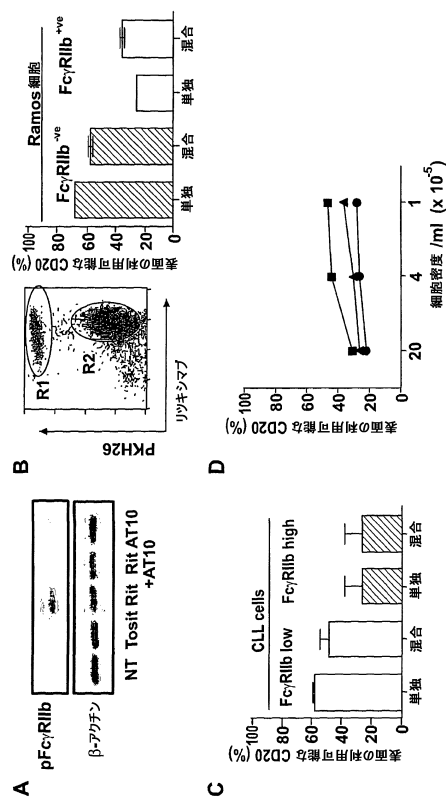
【図 2 - 2】



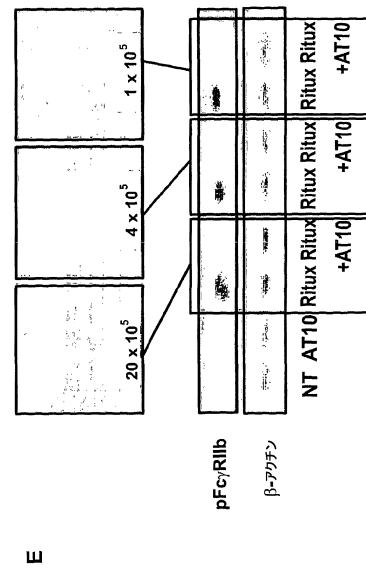
【図 3】



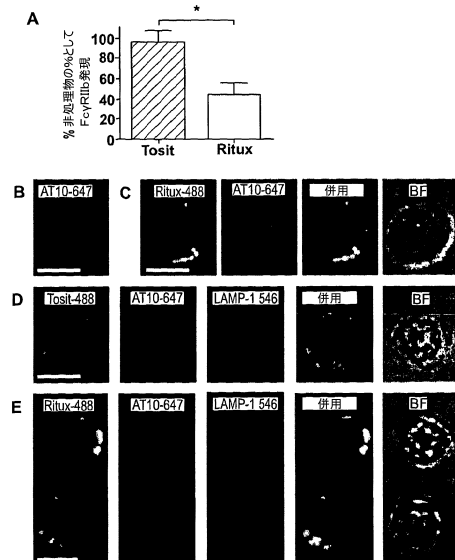
【図 4 - 1】



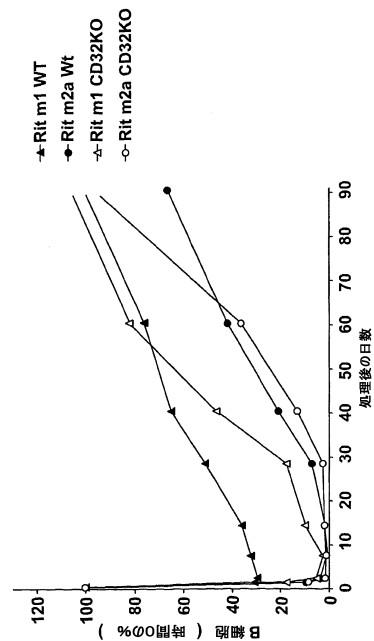
【図 4 - 2】



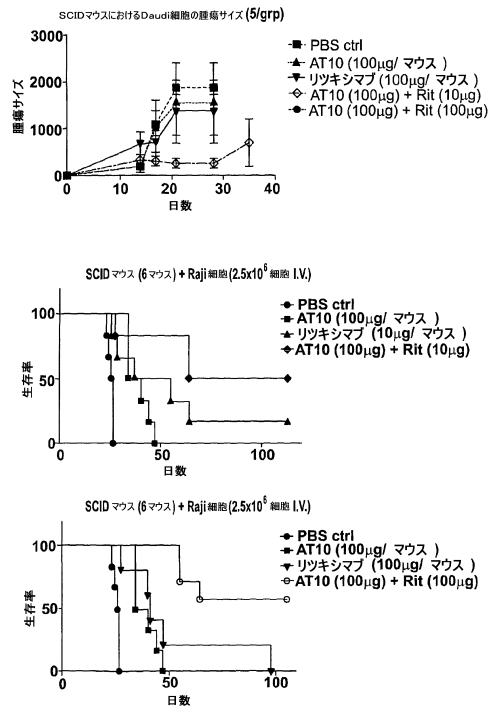
【図 5】



【図 6】

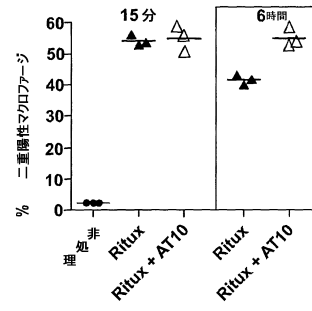


【図 7】



【図 8】

FcγRIIとAT10-F(ab')₂との抑制は、リツキシマブによる食作用を増加させる



【図 9】

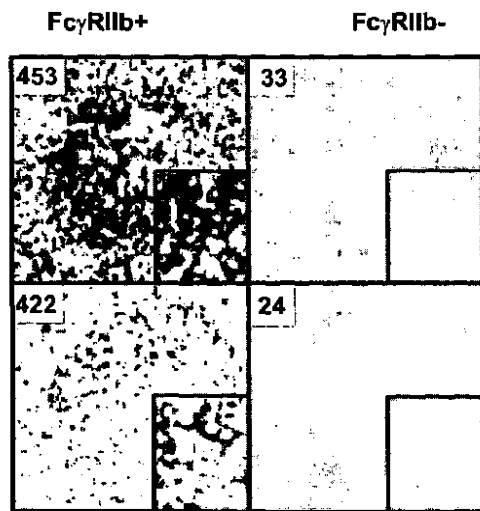
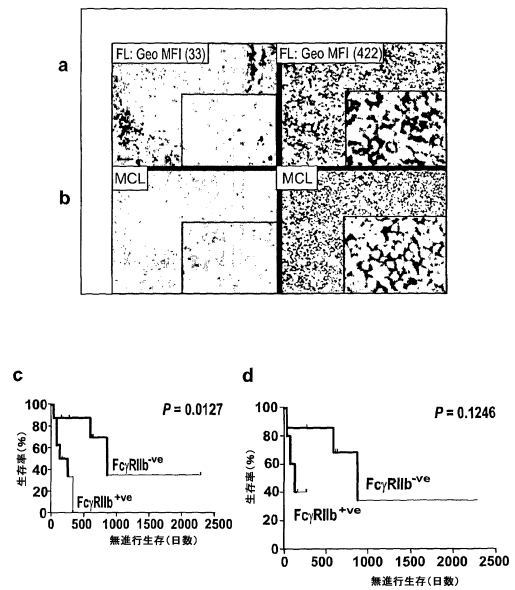
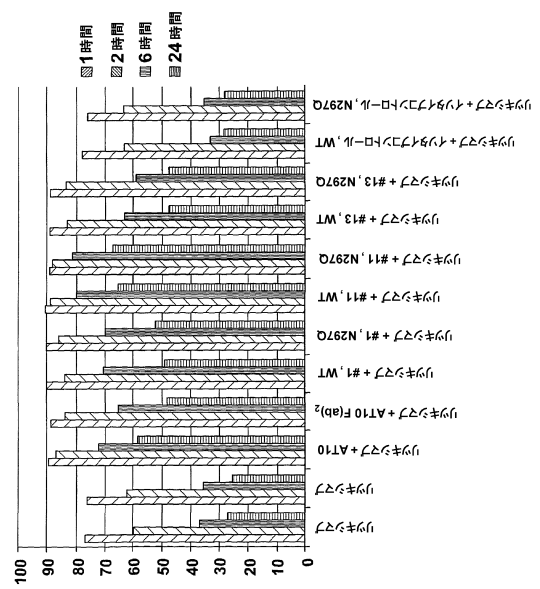


Fig. 9

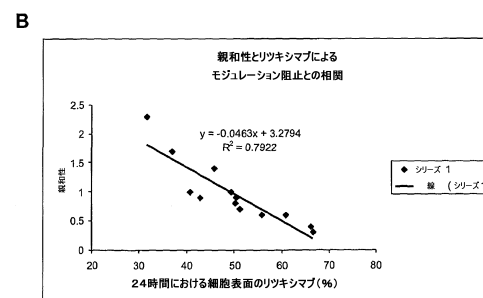
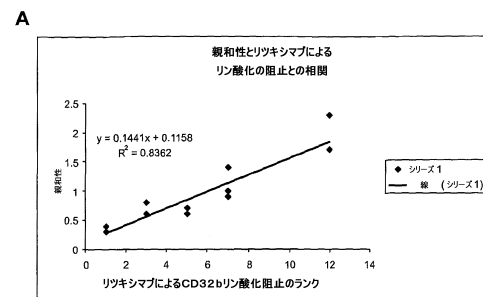
【図 10】



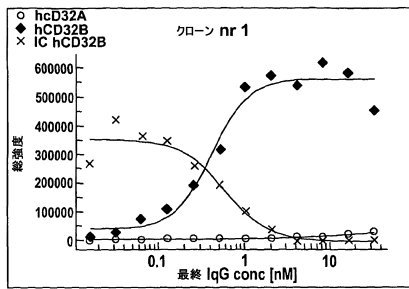
【 図 1 2 】



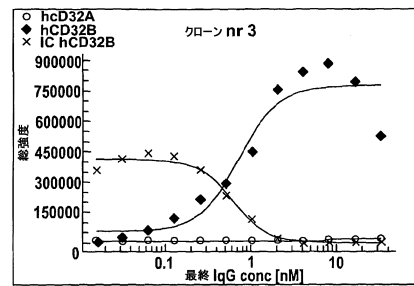
【 図 1 4 】



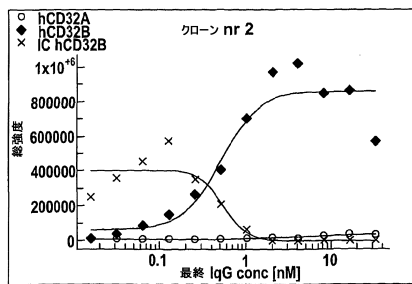
【図 15】



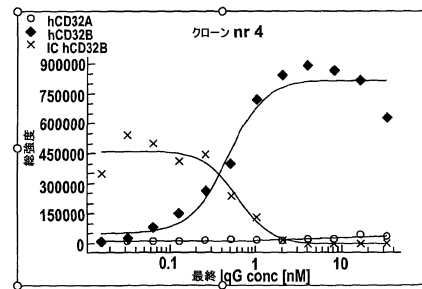
【図 17】



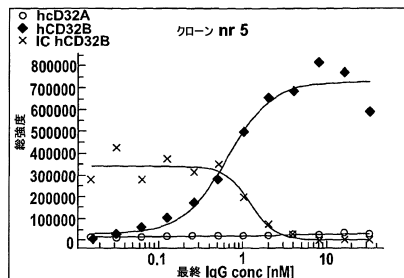
【図 16】



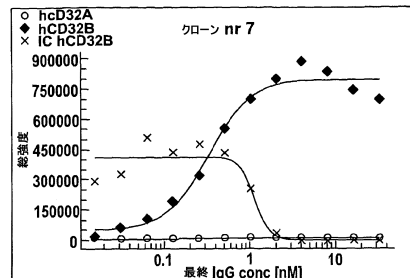
【図 18】



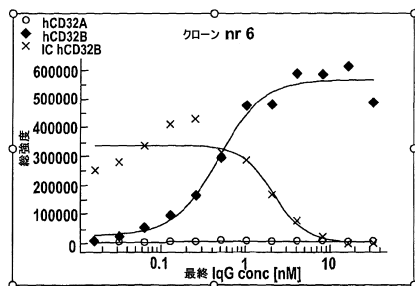
【図 19】



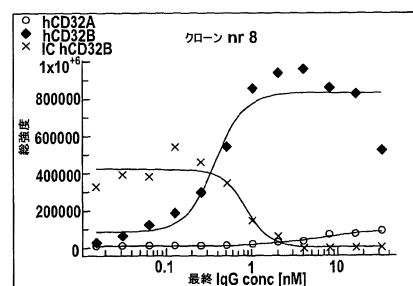
【図 21】



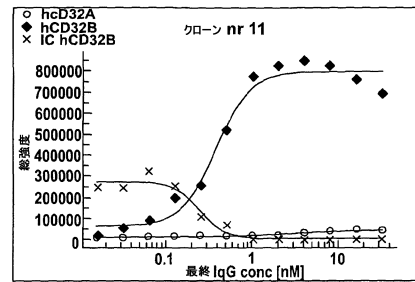
【図 20】



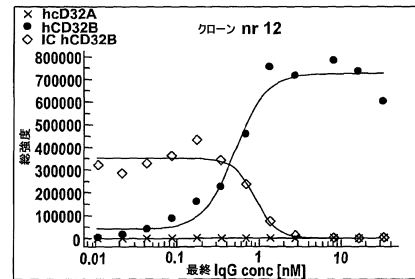
【図 22】



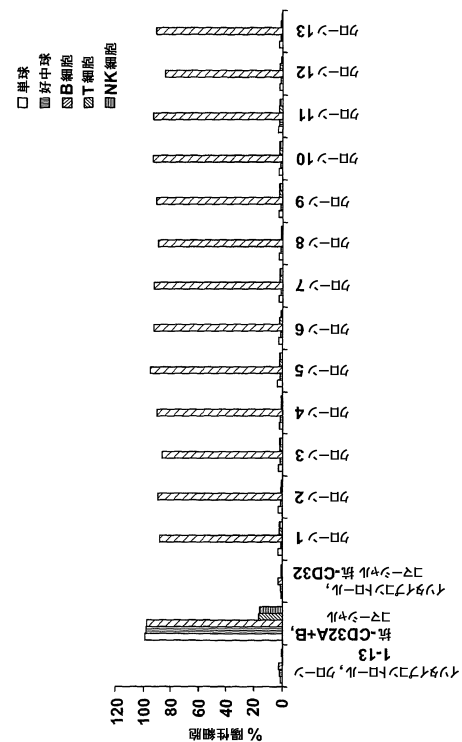
【 図 2 5 】



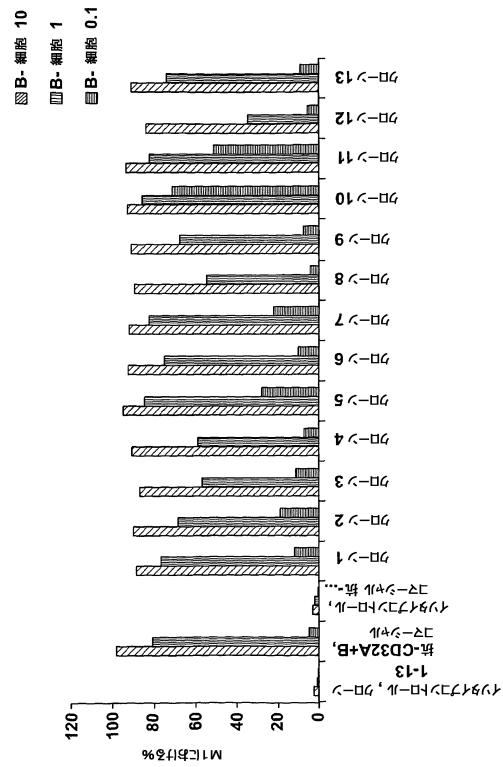
【 図 2 6 】



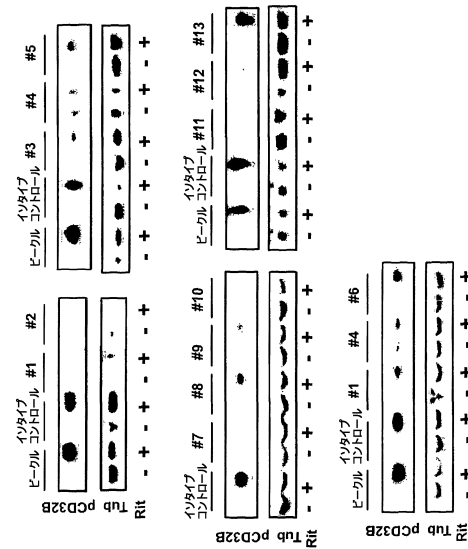
【 図 2 8 】



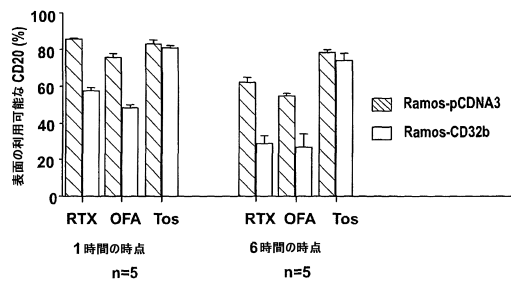
【図 29】



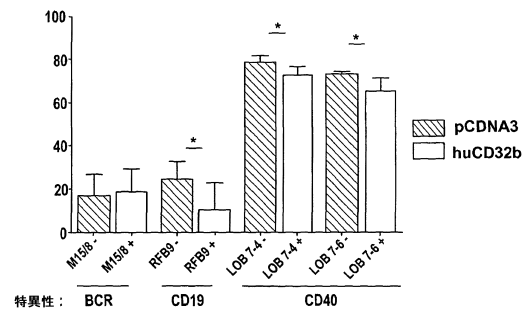
【図 30】



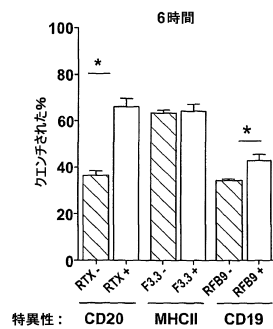
【図 31】



【図 33】



【図 32】



【図 34】

IgG1-CH [配列番号 : 1]
 ASTKGPSVEPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHFT
 PAVLQSSGLYSLSSVTVFPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKT
 HTCPPCPAPELLGQPSVLEFPKPKDGLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
 KALPAPIEKTIKAKGQPREPQVYVYLPSPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV
 EWESNGQPENNYKITPPVLDSDGGSFLLYSLKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHE
 ALHNHYTQKSLSLSPGK

λ-CL [配列番号 : 2]
 QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGV
 ETTTPSKQSNKYYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

【図 3 5】

クローン1

-VH [配列番号 : 3]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKGRF**
Frl1 CDRH1 Frl2 CDRH2
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR**EWRDAFDI**WGQGLTLTVSS
Frl Frl4 CDRH3

-VL [配列番号 : 16]

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLL**VDNQRP**SGVPDRFSGSKSG
Frl1 CDRL1 Frl2 CDRL2 Frl3
TSASLAISGLRSEDEADYY**CAAWDDSLSGSWV**FGGGTKLTVLG
CDRL3 Frl4

CDR 領域

CDRH1: NYGMH [配列番号 : 29]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 : 30]
CDRH3: EWRDAFDI [配列番号 : 31]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 : 32]
CDRL2: SDNQRPS [配列番号 : 33]
CDRL3: AAWDDSLSGSW [配列番号 : 34]

【図 3 6】

クローン2

-VH [配列番号 : 4]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VIAYDGSKKDYADSVKGRF**
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR**EYRDAFDI**WGQGLTLTVSS

-VL [配列番号 : 17]

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLL**VGNSNRPS**GVDPDRFSGSKSG
TTASLAISGLRSEDEADYY**CAAWDDSVSGWM**FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: TYGMH [配列番号 : 35]
CDRH2: VIAYDGSKKDYADSVKG [配列番号 : 36]
CDRH3: EYRDAFDI [配列番号 : 37]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 : 38]
CDRL2: GNSNRPS [配列番号 : 39]
CDRL3: AAWDDSVSGWM [配列番号 : 40]

【図 3 9】

クローン5

-VH [配列番号 : 7]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKGRF**
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR**DQLGEAFDI**WGQGLTLTVSS

-VL [配列番号 : 20]

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLL**VDNNKRPS**GVDPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYY**ATWDDSLSGPV**FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: NYGMH [配列番号 : 53]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 : 54]
CDRH3: DQLGEAFDI [配列番号 : 55]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 : 56]
CDRL2: DNNKRPS [配列番号 : 57]
CDRL3: ATWDDSLSGPV [配列番号 : 58]

【図 4 0】

クローン6

-VH [配列番号 : 8]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**DYGM**WVRQAPGKGLEWVA**AISGSGSTYYADSVKGRF**
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR**GDIDYFDY**WGQGLTLTVSS

-VL [配列番号 : 21]

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CGSSNFGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLL**ENNKRP**SGVPDRFSGSKSG
GTSASLAISGLRSEDEADYY**CAAWDDSLNGPV**FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: DYGMS [配列番号 : 59]
CDRH2: AISGSGSTYYADSVKG [配列番号 : 60]
CDRH3: GDIDYFDY [配列番号 : 61]

CDRL1: TGSSNFGAGYDVH [配列番号 : 62]
CDRL2: ENNKRPS [配列番号 : 63]
CDRL3: AAWDDSLNGPV [配列番号 : 64]

【図 3 7】

クローン3

-VH [配列番号 : 5]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**NYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKGR**
FTMSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR**DRWNGMDV**WGQGLTLTVSS

-VL [配列番号 : 18]

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLL**ANNQRPS**GVDPDRFSGSKSG
GTSASLAISGLRSEDEADYY**CAAWDDSLNGPV**FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: NYGMH [配列番号 : 41]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 : 42]
CDRH3: DRWNGMDV [配列番号 : 43]

CDRL1: SGSSSNIGAGYDVH [配列番号 : 44]
CDRL2: ANNQRPS [配列番号 : 45]
CDRL3: AAWDDSLNGPV [配列番号 : 46]

【図 3 8】

クローン4

-VH [配列番号 : 6]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGSNTAYADSVKGRF**
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR**DHSVIGAFDI**WGQGLTLTVSS

-VL [配列番号 : 19]

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CGSSSNIGSNTVN**WYQQLPGTAPKLL**DNNKRPS**GVDPDRFSGSKSGT
SASLAISGLRSEDEADYY**SSYAGSNNV**FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号 : 47]
CDRH2: VISYDGSNTAYADSVKG [配列番号 : 48]
CDRH3: DHSVIGAFDI [配列番号 : 49]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [配列番号 : 50]
CDRL2: DNNKRPS [配列番号 : 51]
CDRL3: SSYAGSNNV [配列番号 : 52]

【図 4 1】

クローン7

-VH [配列番号 : 9]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKGRF**
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR**ERRDAFDI**WGQGLTLTVSS

-VL [配列番号 : 22]

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLL**VDNQRP**SGVPDRFSGSKSG
TSASLAISGLRSEDEADYY**ATWDDSDTPV**FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号 : 65]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 : 66]
CDRH3: ERRDAFDI [配列番号 : 67]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 : 68]
CDRL2: SDNQRPS [配列番号 : 69]
CDRL3: ATWDDSDTPV [配列番号 : 70]

【図 4 2】

クローン8

-VH [配列番号 : 10]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTF**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGSNKYYADSVKGRF**
TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYCAR**DHSAAGYFDY**WGQGLTLTVSS

-VL [配列番号 : 23]

QSVLTQPPSASGTPGQQRVTIS**CGSSSNIGSNTVN**WYQQLPGTAPKLL**GNSIRPS**GGPDRFSGSKSGTS
ASLAISGLRSEDEADYY**ASWDDSLSPV**FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号 : 71]
CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 : 72]
CDRH3: DHSAAGYFDY [配列番号 : 73]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [配列番号 : 74]
CDRL2: GNSIRPS [配列番号 : 75]
CDRL3: ASWDDSLSPV [配列番号 : 76]

【図 4 3】

クローン9

-VH [配列番号 : 11]

EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDSAIIDYAGSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEAAAGAFDIWGQGTLLTVSS

-VL [配列番号 : 24]

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCIGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLVGNTRDPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCAAWDDSLSGPVVFGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号 : 77]
 CDRH2: GISWDSAIIDYAGSVKG [配列番号 : 78]
 CDRH3: DEAAAGAFDI [配列番号 : 79]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 : 80]
 CDRL2: GNTDRPS [配列番号 : 81]
 CDRL3: AAWDDSLSGPVV [配列番号 : 82]

【図 4 5】

クローン11

-VH [配列番号 : 13]

EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAFEFGYIILDYWGQGTLLTVSS

-VL [配列番号 : 26]

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCIGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLVVDYERPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCMAWDDSLSGVVFGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号 : 89]
 CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 : 90]
 CDRH3: EFGYIILDY [配列番号 : 91]

CDRL1: SGSSSNIGSNTVN [配列番号 : 92]
 CDRL2: RDIYERPS [配列番号 : 93]
 CDRL3: MAWDDSLSGVV [配列番号 : 94]

【図 4 4】

クローン10

-VH [配列番号 : 12]

EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWMAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEELYDAFDIWGQGTLLTVSS

-VL [配列番号 : 25]

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCIGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLVADHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCAAWDDSQRAVIFGGGTLLTVLG

CDR 領域

CDRH1: SYGMH [配列番号 : 83]
 CDRH2: VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 : 84]
 CDRH3: EELYDAFDI [配列番号 : 85]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 : 86]
 CDRL2: ADDHRPS [配列番号 : 87]
 CDRL3: ASWDDSQRAVI [配列番号 : 88]

【図 4 6】

クローン12

-VH [配列番号 : 14]

EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTNKYYADSVRGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAEETWDAFDVWGQGTLLTVSS

-VL [配列番号 : 27]

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCIGSSSNIGSNNANWYQQLPGTAPKLLVDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCAAWDSSTVVFGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: NHGMH [配列番号 : 95]
 CDRH2: VISYDGTNKYYADSVRG [配列番号 : 96]
 CDRH3: ETWDAFDV [配列番号 : 97]

CDRL1: SGSSSNIGSNNAN [配列番号 : 98]
 CDRL2: DNNKRPS [配列番号 : 99]
 CDRL3: QAWDSSTVV [配列番号 : 100]

【図 4 7】

クローン13

-VH [配列番号 : 15]

EVQLLES GGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSYGISWVRQAPGKGLEWVSGISGSGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASVGYANDAFDIWGQGTLLTVSS

-VL [配列番号 : 28]

QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCIGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLVSDTNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1: SYGIS [配列番号 : 101]
 CDRH2: GISGSGGNTYYADSVKG [配列番号 : 102]
 CDRH3: SVGYANDAFDI [配列番号 : 103]

CDRL1: TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 : 104]
 CDRL2: GDTNRPS [配列番号 : 105]
 CDRL3: AAWDDSLNGPV [配列番号 : 106]

フロントページの続き

(51)Int.Cl.

F I

C 0 7 K 16/28 Z N A

(72)発明者 グレニー、マーティン

イギリス国 サウサンプトン ジェネラル ホスピタル エスオー１６ ６ワイディー、ファカル
ティ オブ メディシン、ユニバーシティ オブ サウサンプトン、キャンサー サイエンス
ユニット

(72)発明者 ロガニアン、アリ

イギリス国 サウサンプトン ジェネラル ホスピタル エスオー１６ ６ワイディー、ファカル
ティ オブ メディシン、ユニバーシティ オブ サウサンプトン、キャンサー サイエンス
ユニット

(72)発明者 ピアーズ、ステファン

イギリス国 サウサンプトン ジェネラル ホスピタル エスオー１６ ６ワイディー、ファカル
ティ オブ メディシン、ユニバーシティ オブ サウサンプトン、キャンサー サイエンス
ユニット

(72)発明者 ジョンソン、ピーター

イギリス国 サウサンプトン ジェネラル ホスピタル エスオー１６ ６ワイディー、ファカル
ティ オブ メディシン、ユニバーシティ オブ サウサンプトン、キャンサー サイエンス
ユニット

(72)発明者 リム、ショーン

イギリス国 サウサンプトン ジェネラル ホスピタル エスオー１６ ６ワイディー、ファカル
ティ オブ メディシン、ユニバーシティ オブ サウサンプトン、キャンサー サイエンス
ユニット

(72)発明者 フレンデウス、ビョルン

スウェーデン国 ランツクローナ エス ２ ６ １ ６ １、キリドグランデン ３

(72)発明者 タイゲ、イングリッド

スウェーデン国 ルンド エスイー ２ ２ ４ ５ ７、ラケットガタン ６

合議体

審判長 關 政立

審判官 清野 千秋

審判官 田村 聖子

(56)参考文献 国際公開第２００８／００２９３３(WO, A1)

国際公開第２００９／０８３００９(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

A61K39/395

C A p l u s / M E D L I N E / B I O S I S / E M B A S E / R E G I S T R Y (S T N)