

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5911813号  
(P5911813)

(45) 発行日 平成28年4月27日(2016.4.27)

(24) 登録日 平成28年4月8日(2016.4.8)

(51) Int.Cl.	F 1			
C 12 N 15/09	(2006.01)	C 12 N	15/00	Z N A A
C 07 K 16/28	(2006.01)	C 07 K	16/28	
A 61 K 39/395	(2006.01)	A 61 K	39/395	T
A 61 K 45/00	(2006.01)	A 61 K	39/395	N
A 61 P 19/02	(2006.01)	A 61 K	45/00	

請求項の数 20 (全 38 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2012-556068 (P2012-556068)
(86) (22) 出願日	平成23年3月4日(2011.3.4)
(65) 公表番号	特表2013-520990 (P2013-520990A)
(43) 公表日	平成25年6月10日(2013.6.10)
(86) 国際出願番号	PCT/US2011/000415
(87) 国際公開番号	W02011/109108
(87) 国際公開日	平成23年9月9日(2011.9.9)
審査請求日	平成26年2月27日(2014.2.27)
(31) 優先権主張番号	61/310,440
(32) 優先日	平成22年3月4日(2010.3.4)
(33) 優先権主張国	米国(US)

(73) 特許権者	512228657 ベット・セラピューティクス・インコーポ レイテッド V E T T H E R A P E U T I C S I N C. アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア 州デル・マー、ビア・デ・ラ・バリエ 2 6 8 3 番、スウィート・ジー-3 3 5
(74) 代理人	100081422 弁理士 田中 光雄
(74) 代理人	100084146 弁理士 山崎 宏
(74) 代理人	100122301 弁理士 富田 憲史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CD20に対するモノクローナル抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

イヌまたはネコ CD20 を認識し、可変ドメインをそれぞれ含む軽鎖および重鎖を含む抗体または抗体フラグメントであって、  
 該可変ドメインはそれぞれ超可変ドメインを含み、  
 軽鎖における超可変ドメインは配列番号 2 4、 2 5 および 3 9 から選択される配列からの 3 つの C D R 領域を含み、 C D R 領域は Kabat により定義され；  
 重鎖における超可変ドメインは配列番号 2 3 および 3 8 から選択される配列からの 3 つの C D R 領域を含み、 C D R 領域は Kabat により定義される  
 抗体または抗体フラグメント。

10

## 【請求項 2】

軽鎖および重鎖を含む抗体または抗体フラグメントであって、  
 軽鎖が配列番号 2 4、 2 5 および 3 9 から選択される配列を含み；  
 重鎖が配列番号 2 3 および 3 8 から選択される配列を含む  
 請求項 1 に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 3】

イヌまたはネコ CD20 を認識し、配列番号 2 3 を含む、請求項 2 に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 4】

イヌまたはネコ CD20 を認識し、配列番号 2 4 を含む、請求項 2 に記載の抗体または

20

抗体フラグメント。

【請求項 5】

イヌまたはネコ C D 2 0 を認識し、配列番号 2 5 を含む、請求項 2 に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 6】

イヌまたはネコ C D 2 0 を認識し、配列番号 3 8 を含む、請求項 2 に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 7】

イヌまたはネコ C D 2 0 を認識し、配列番号 3 9 を含む、請求項 2 に記載の抗体または抗体フラグメント。

10

【請求項 8】

イヌまたはネコ C D 2 0 を認識し、配列番号 : 3 8 および配列番号 : 3 9 を含む、請求項 2 に記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 9】

A V D - 1 から A V D - 1 3 までから選択される可変ドメイン構造を含む、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 10】

ヘテロキメラ抗体である、請求項 1 から 9 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 11】

イヌ C D 2 0 に結合し、定常領域がイヌ起源であるか、またはネコ C D 2 0 に結合し、定常領域がネコ起源である、請求項 1 および 9 から 1 0 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメント。

20

【請求項 12】

定常ドメインが、増強された A D C C および / または C D C を提供するために選択された配列を含む、請求項 1 から 1 1 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメント。

【請求項 13】

m A b C D 2 0 - 1 、 m A b C D 2 0 - 2 、 m A b C D 2 0 - 5 および m A b C D 2 0 - 6 からなる群から選択される抗体と同じエピトープに結合する、請求項 1 から 1 2 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメント。

30

【請求項 14】

請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメントをコードする核酸。

【請求項 15】

C D 2 0 を発現する細胞の過剰増殖により特徴付けられる疾患または状態に罹患している動物を処置するための医薬の製造のための、請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメントまたは請求項 1 4 に記載の核酸の使用。

【請求項 16】

動物が C D 2 0 を発現する細胞の過剰増殖により特徴付けられる疾患または状態に罹患していると診断するための組成物の製造のための、請求項 1 から 1 3 のいずれかに記載の抗体または抗体フラグメントまたは請求項 1 4 に記載の核酸の使用。

40

【請求項 17】

疾患または状態が癌または炎症性疾患である、請求項 1 5 または 1 6 に記載の使用。

【請求項 18】

癌がリンパ腫であり、炎症性疾患が関節炎またはアトピー性皮膚炎である、請求項 1 7 に記載の使用。

【請求項 19】

化学療法薬または第 2 のモノクローナル抗体である第 2 の薬物を共に使用する、請求項 1 5 から 1 8 のいずれかに記載の使用。

【請求項 2 0】

第 2 のモノクローナル抗体が C D 5 2 に対するモノクローナル抗体である、請求項 1 9

50

に記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本出願は、35 U S C § 119下に、2010年3月4日に出願された米国仮出願番号第61/310,440号（この内容は出典明示により本明細書に包含させる）の優先権の利益を主張する。

【0002】

発明の分野

10

本発明は、一般的に、例えば、哺乳動物における、および特にペット、例えば、イヌ、ネコおよびウマにおける、疾患の処置のためのCD20に対する部分または変異体を含むモノクローナル抗体に関する。さらに特に、本発明は、CD20と反応し、標的的検出、疾患の診断およびペットの処置のために有用である抗体構築物、および該構築物によってコードされる抗体を提供する。さらに、ペットにおけるB細胞障害の処置のための方法を本明細書に記載している。これら的方法は、B-リンパ球の調節のための標的動物のCD20を標的とする抗CD20抗体の投与に基づく。

【背景技術】

【0003】

発明の背景

20

免疫グロブリンは、安全、かつ有効な治療剤であることが示されているため、種々の疾患および障害のための治療処置としての免疫グロブリンの使用が、急速に増加している。ヒト使用のために承認された治療モノクローナル抗体は、トラスツマブ（抗原：180kD、HER2/neu）、セツキシマブ（抗原：150kDおよび170kD、EGF受容体）、アレムツズマブ（抗原：21-28kD、CD52）およびリツキシマブ（抗原：35kD、CD20）を含む。さらなる治療タンパク質は、その多数が種々の形態の癌および炎症性関連疾患を標的とする種々の疾患に関して、ヒトにおける使用のための臨床開発の種々のフェーズにある。

【0004】

抗体は、いくつかの哺乳動物種、例えば、ヒトおよびマウスにおいて試験され、開発されているが、それらは、ペット、例えば、イヌ、ネコおよびウマ哺乳動物においてあまり試験されていない。獣医的免疫および炎症状態に対する処置は、ヒトに対して開発された薬物から取り入れられ、しばしば不完全な結果であり、一般的に非ステロイド系抗炎症剤、鎮痛剤、ステロイド剤、免疫抑制剤または抗代謝産物、および化学療法剤を含む小分子に分類される薬物からなる。したがって、免疫状態および癌に関しては、獣医医薬の蓄積は限定される。これらの処置のさらなる欠点は、それらが一般的に症状のみに対処していること、および累積効果で長期間、繰り返し大量に投与されなければならないため、しばしばその疾患自体よりも悪くなる傾向にある深刻な副作用を付随することである。したがって、動物、例えば、ペットにおける使用のための、改良された、さらに特異的な処置および生物学的薬剤の必要性が存在する。ペットの処置における使用のための増強されたエフェクター領域を有するヘテロキメラ抗体は、一般的に、出願人自身の国際公開：U S 2010/0061988 A1およびU S 2010/110838 A2（それぞれの内容を出典明示により本明細書に包含させる）に記載されている。ペットにおいて免疫原性ではなく、ペットにおけるCD20-陽性細胞の過剰増殖により特徴付けられる疾患を処置するために有効である高度に特異的な抗体に対する必要性が、未だ存在する。

30

【発明の概要】

【0005】

発明の概要

40

本発明は、獣医適用に有用な治療抗体、特にイヌまたはネコまたはウマCD20、例えばイヌCD20に対する抗体、最適化された免疫原性構築物を使用するこのような抗体を

50

作製する方法、およびこのような抗体を使用する処置方法を提供する。

【発明を実施するための形態】

【0006】

発明の詳細な説明

前記の概要および以下の詳細な説明はいずれも、単なる例示および説明であって、請求される本発明を限定しないことと理解されるべきである。本明細書および特許請求の範囲において使用されるとき、単数形は複数形を含み；「または」の使用は、他に記載のない限り、「および／または」を意味することに注意するべきである。したがって、例えば、単数の「対象ポリペプチド」への言及は、複数のこのようなポリペプチドを含み、単数の「薬剤」への言及は、1つ以上の薬剤および当業者に知られているそれらの同等物などへの言及を含む。さらに、本発明は、記載されている特定の態様に限定されず、もちろんそれ自体変化し得ると理解されるべきである。さらに、本発明の範囲は、特許請求の範囲のみによって限定されるため、特定の態様を記載するために使用される用語に限定されることを意図しない。

10

【0007】

本明細書において使用されるセクションの表題は、系統的目的のみであり、記載されている対象の限定と解釈されるべきでない。限定はしないが、特許、特許出願、論文、本および学術論文を含む本出願において引用されている全ての文献または文献の一部は、あらゆる目的のために、それら全体において明白に出典明示により本明細書に包含させる。

20

【0008】

他に定義がない限り、本明細書において使用される全ての専門および科学用語は、本発明が属する分野における通常の技術者により一般的に理解されるのと同じ意味を有する。適当な方法および材料は以下に記載されるが、しかしながら、本明細書に記載されているものと同様または同等の方法および材料を本発明の実施において使用することができる。したがって、材料、方法および実施例は、説明のためのみであり、限定されることを意図しない。本明細書に記載されている全ての刊行物、特許出願、特許および他の文献は、それら全体において、出典明示により包含させる。対立のある場合、定義を含む本願明細書が調整する。

【0009】

標準技術は、組換えDNA、オリゴヌクレオチド合成、組織培養およびトランスフェクション（例えば、エレクトロポレーション、リポフェクションなど）のために使用され得る。酵素反応および精製技術は、製造業者の仕様書にしたがって、または、当分野で一般的に成し遂げられているとおり、もしくは本明細書に記載されているとおりに実施され得る。前記技術および方法は、一般的に、当分野でよく知られている慣用の方法にしたがって、ならびに種々の一般的な文献および本願明細書中で引用および記載されているさらに特定の文献に記載されているとおりに実施され得る。例えば、Sambrookら Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Mayer and Walker, Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology, Academic Press, London (1987); Borrebaeck, Antibody Engineering, 2nd ed., Oxford Univ. Press (1995); Roittら Immunology 6<sup>th</sup> ed., Mosby (2001)参考；全ての上記引用文献ならびに本明細書における全ての引用文献を、それら全体において出典明示により本明細書に包含させる。

30

40

【0010】

本発明は、疾患の処置のために対象への投与に適当なヘテロキメラ抗体および／またはそれらのフラグメントを操作するための方法を提供する。「患者」、「対象」および「個体」なる用語は、本明細書において互換的に使用され、哺乳動物、例えば、限定はしないが、ヒト、ネズミ、サル、ネコ、イヌ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、哺乳動物家畜用および農業用動物、哺乳動物スポーツ用動物、および哺乳動物ペットを示す。本発明の1つの態様において、対象はペット、例えば、イヌ、ネコまたはウマである。

【0011】

50

それらの操作されたヘテロキメラ抗体は、ヘテロキメラ組換え抗体を生産するように、定常領域又クレオチド配列への可変ドメイン又クレオチド配列の部分の融合、およびこれらの配列の共発現の結果である。さらに、本発明は、動物における疾患の処置のための免疫療法剤および診断薬としての、このようなヘテロキメラ抗体および/またはそれらのフラグメントの使用に関する。

## 【0012】

ヘテロキメラ抗体は、いくつかの利点、例えば、(i) 反復投与における減少した免疫原性応答；(ii) 標的種におけるエフェクター機能に関する免疫系の効率的な増強が介在する増加した効力；および(iii) 増加した半減期を提供する。

## 【0013】

本発明は、所望の特性を有する抗体および/またはそれらのフラグメントの產生ならびに生産におけるそれらの使用を含む。本発明の抗体は、定常領域に寄与する種と異なる種由来の抗体の可変領域のフラグメントを含む。したがって、抗体および/またはそれらのフラグメントは、標的種の所望のエフェクター機能に対する特異性および高い親和性を保持する。

## 【0014】

特定の態様における本発明の抗体は、抗体治療に適當なあらゆる治療標的、例えば、腫瘍関連抗原、アレルギーもしくは炎症関連抗原、心臓血管疾患関連抗原、自己免疫疾患関連抗原またはウイルスもしくは細菌感染関連抗原を認識し得る。

## 【0015】

本明細書において使用される「天然抗体」は、通常、2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖からなる約150,000ダルトンの糖タンパク質である。それぞれの重鎖は、1つの共有ジスルフィド結合により重鎖に連結しているが、ジスルフィド結合の数は、種々の免疫グロブリンアイソタイプの重鎖の間で変化する。それぞれの重鎖および軽鎖はまた、規則的間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。それぞれの重鎖は、一方の端で可変ドメイン(可変領域)( $V_H$ )、次にいくつかの定常ドメイン(定常領域)を有する。それぞれの軽鎖は、一方の端で可変ドメイン( $V_L$ )およびもう一方の末端で定常ドメインを有し；軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインとアラインされ、軽鎖可変ドメインは、重鎖の可変ドメインとアラインされる。

## 【0016】

任意の脊椎動物種由来の抗体の「軽鎖」は、カッパおよびラムダと呼ばれる2つの明白に別個の型の1つに割り当てられることができる。

## 【0017】

重鎖の「定常ドメイン」または「定常領域」のアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なるクラスに割り当てられることができる。免疫グロブリンの5つの主要なクラス： $IgA$ 、 $IgD$ 、 $IgE$ 、 $IgG$ および $IgM$ があり、これらのいくつかはさらに、「サブクラス」または「アイソタイプ」、例えば、 $IgG1$ 、 $IgG2$ 、 $IgG3$ 、 $IgG4$ 、 $IgA$ および $IgA2$ に分類され得る。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれアルファ、デルタ、エプシロン、ガンマおよびミューと呼ばれる。

## 【0018】

「可変ドメイン」なる用語は、配列が抗体の間で異なっており、抗原結合のために必要であり、それにより特定の抗原に対するそれぞれの抗体に特異的に与えられる免疫グロブリン分子の特定の部分を示す。しかしながら、可変性は、抗体の可変ドメイン中で均一に分布されない。軽鎖および重鎖可変ドメインの両方における「超可変領域」と呼ばれる3つのセグメントに集中している。可変ドメインのさらに高度に保存されている部分は、「フレームワーク領域」(FR)と呼ばれる。天然重鎖および軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、4つのFR(FR1、FR2、FR3およびFR4)を含む。それぞれの鎖における超可変領域は、FRと極めて接近して結合しており、他の鎖からの超可変領域と共に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabatら Sequences of Proteins of Immunologic

10

20

30

40

50

al Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), pages 647-669参照)。定常ドメインは、抗原への抗体の結合に直接的に関与しないが、種々のエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞毒性および補体活性化における抗体の関与を示す。

【0019】

抗体のパパイン消化は、それぞれ単一の抗原結合部位を有する「F<sub>a</sub>b」フラグメントと呼ばれる2つの同一の抗原結合フラグメント、および容易に結晶化する能力が名前に反映されている残りの「F<sub>c</sub>」フラグメントを生産する。ペプシン処理は、結合架橋(binding cross-linking)抗原を生じる。

【0020】

本明細書において使用される「F<sub>v</sub>」は、完全な抗原認識および結合部位を含む最小抗体フラグメントを示す。この領域は、1つの重鎖および1つの軽鎖可変ドメインのダイマーからなる。

【0021】

F<sub>a</sub>bフラグメントはまた、軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)を含む。F<sub>a</sub>b'フラグメントは、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシル末端での少数の残基の付加により、F<sub>a</sub>bフラグメントと異なる。F<sub>a</sub>b'-SHは、本明細書において、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するF<sub>a</sub>b'を示す。F<sub>(a</sub><sub>b'</sub>)<sub>2</sub>抗体フラグメントは、初めは、F<sub>a</sub>b'フラグメント間でヒンジシステインを有するフラグメント対として生産された。抗体フラグメントの他の立体配置もまた、当業者によく知られている。

【0022】

「抗体」なる用語は、本明細書において非常に広範な意味で使用され、具体的には、モノクローナル抗体(全長モノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多特異的抗体(例えば、二重特異性抗体)、および所望の生物学的または機能活性を示す抗体フラグメントを含む。所望の生物学的または機能活性は、少なくとも同種抗原に対する結合を含み、補体活性化および/または他のエフェクター機能をさらに含み得る。本明細書において「全長抗体」は、可変および定常領域を含む抗体の天然生物学的形態を構成する構造を意味する。

【0023】

「抗体フラグメント」または「抗原結合部分」は、全長抗体の一部、一般的に、それらの抗原結合または可変ドメインを含む。抗体フラグメントの例は、F<sub>a</sub>b、F<sub>a</sub>b'、F<sub>(a</sub><sub>b'</sub>)<sub>2</sub>、およびF<sub>v</sub>フラグメント；ダイアボディ；直線抗体；一本鎖抗体分子；ならびに2つまたはそれ以上の異なる抗原に結合する抗体フラグメントから形成される多特異的抗体を含む。

【0024】

「免疫抱合体」なる用語は、別の分子、特に、細胞毒性剤、例えば、化学療法剤、毒素(例えば、細菌、真菌、植物または動物起源の酵素的に活性な毒素、またはそれらのフラグメント)、または放射性同位体(すなわち、放射性抱合体)に抱合された抗体またはそれらのフラグメントを示す。

【0025】

本明細書において使用される「価数」なる用語は、ポリペプチドにおける電位標的結合部位の数を示す。それぞれの標的結合部位は、1つの標的分子または標的分子に対する特定の部位に特異的に結合する。ポリペプチドが1つ以上の標的結合部位を含むとき、それぞれの標的結合部位は、同じか、または異なっている分子に特異的に結合し得る(例えば、異なる分子、例えば、異なる抗原、または同じ分子上の異なるエピトープに結合し得る)。

【0026】

「特異性」なる用語は、所定の標的に特異的に結合する(例えば、と免疫反応する)能力を示す。ポリペプチドは、单一特異性であり、標的に特異的に結合する1つ以上の結合

10

20

30

40

50

部位を含むか、ポリペプチドは、多特異的（例えば、二重特異性または三重特異性）であり、同じか、または異なる標的に特異的に結合する2つ以上の結合部位を含んでいてよい。

【0027】

興味ある抗原またはエピトープ「に結合する」または「を認識する」本発明の抗体は、抗体が抗原の標的化における診断および/または治療剤として有用であるような十分な親和性で抗原またはエピトープに結合するものである。全部または一部において、標的分子に対する抗体の結合に関して、特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド標的上のエピトープを「特異的結合」または「に特異的に結合する」または「に特異的」であるまたは「に特異的に免疫反応性」であるまたは「特異的に認識する」なる用語は、非特異的相互作用と測定可能な程度に異なる結合を意味する。CD20標的分子を欠いている細胞または組織ではなく、CD20標的分子を有する細胞または組織との、全部または一部における抗体の選択的結合への言及を含む。特異的結合は、一般的に、CD20を欠いている細胞もしくは組織または非特異的ポリペプチドと比較して、単離されたポリペプチドまたはCD20を有する細胞もしくは組織に対して結合したリガンドの量において、2倍以上、好ましくは5倍以上、さらに好ましくは10倍以上、およびより好ましくは100倍以上の増加をもたらす。特異的結合は、CD20を欠いている細胞もしくは組織または非特異的ポリペプチドと比較して、単離されたポリペプチドまたはCD20を有する細胞もしくは組織に対して結合したリガンドの量において、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍または90倍の増加をもたらすことが、さらに考慮される。種々の免疫測定法フォーマットは、特定のタンパク質と特異的に免疫反応性である抗体を選択するために適当である。例えば、ELISA免疫測定法、FACSアッセイ、ウェスタンプロットは、日常的に、タンパク質と特異的に免疫反応性であるモノクローナル抗体を選択するために使用される。

10

【0028】

抗体は、2つの抗体が同一または立体的に重複するエピトープを認識するとき、参照抗体と「同じエピトープ」に結合する。2つのエピトープが同一または立体的に重複のエピトープに結合するか否かを決定するために非常に広範に使用されている迅速な方法は、標識された抗原または標識された抗体のいずれかを使用する、異なるフォーマットの全てにおいて構成することができる競合アッセイである。抗体は、所定のエピトープへの参照抗体の結合を競合的に少なくとも90%、少なくとも80%、少なくとも70%、少なくとも60%または少なくとも50%阻害すると言われ得る。

20

【0029】

本明細書において使用される「モノクローナル抗体」なる用語は、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を示し、すなわち、集団からなる個々の抗体は、少量で存在し得る起こりうる天然変異体を除けば、同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的である。例えば、本発明において使用されるべきモノクローナル抗体は、Kohlerら Nature 256:495 (1975)により最初に記載されたハイブリドーマ方法により作製され得るか、または組換えDNA方法により作製され得る。モノクローナル抗体はまた、例えばファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

30

【0030】

モノクローナル抗体は、「抗原」の投与、次に抗体を作るB細胞の単離により、マウスにおいて非常に頻繁に產生される。次に、B細胞は、「ハイブリドーマ」を創造するために、B細胞と同じ種の別の安定な細胞型への融合により不死化される。個々のB細胞は、一次アミノ酸配列および根本的な遺伝子配列により定義される1つの特異的抗体（すなわち、クローン的に单一特異性である）を作る。本明細書において使用される「ヘテロハイブリドーマ」および「ヘテロ骨髄腫」なる用語は、2つの異なる種由来のリンパ球および骨髄腫の融合により不死化されたリンパ球細胞系を示す。

40

【0031】

モノクローナル抗体は、最初に、例えば、抗原または抗原を発現する細胞で動物を免疫

50

化することにより產生され得る。ハイブリドーマの產生は、マウスまたはペット、例えば、イヌの免疫化で開始する。免疫化は、アジュバントの存在または非存在下で細胞のいくつかの型で行うことができる。細胞はまた、ELISA、Biacore、FACSまたは当分野で利用できる他の方法論により、所望の特性を有するハイブリドーマ細胞系を同定するために使用することができる。

#### 【0032】

本発明のモノクローナル抗体調製の方法における使用のために適當な細胞は、(1)健常または罹患ペット、例えば、イヌ、ネコまたはウマから回収された細胞の特定の型において豊富である末梢血単核細胞(PBMC)またはPBMCの画分を含む。リンパ球は、場合によっては、免疫化前に、抗原の発現を増加させるために、増殖因子、例えば、EPO、SCF、TNF、TGF、GMCSF、TPO、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、GCSFを含む因子とプレインキュベートされる。(2)健常または罹患対象から確立されたリンパ腫細胞系または腫瘍細胞系は、所望により、免疫化前に、抗原の発現を増加させるために、上記因子とプレインキュベートされる。(3)健常または罹患対象の組織由来の細胞系は、場合によっては、免疫化前に、抗原の発現を増加させるために、上記因子とプレインキュベートされる。(4)抗原コード領域またはそのフラグメントを発現するように操作された培養細胞、例えば、バキュロウイルス感染細胞、細菌細胞、酵母細胞、哺乳動物細胞、植物細胞、真菌細胞など。DNA、RNA、タンパク質またはペプチドの形態における抗原は、細胞の画分のいずれか1つに含まれ得る。(5)膜貫通受容体の天然構造が維持されるように、抗原を発現する細胞から調製されるマグネットイック(Magnetic)プロテオリポソーム(Proteoliposome)粒子(MPL)が、以前に記載されている(例えば、Mirzabekovら Nat. Biotechnol. 18:649-654 (2000); Babcockら J. Biol. Chem. 276:38433-38440 (2001); PCT公開WO 01/49265; 米国特許出願第20010034432号参照)。

#### 【0033】

本発明の1つの態様において、モノクローナル抗体の產生は、DNA、ペプチドまたはタンパク質由来の免疫原を使用してなし遂げることができる。ハイブリドーマは、例えば、マウスまたはペットであり得る動物、または適當な抗体応答を与える任意の動物を免疫化することにより產生する。1つの局面において、免疫化は、動物に抗原をコードする核酸またはタンパク質抗原、例えば、イヌCD20もしくはその免疫原性フラグメントまたはCD20もしくはその免疫原性フラグメントをコードする核酸を導入することにより行われる。当業者は、特定のエピトープは、天然環境から取り出されたとき、動物においてさらに免疫原性であることを認識している。したがって、担体、例えば、キーホールリンペットヘモシアニンに接合した抗原のエピトープに対応するペプチドは、天然タンパク質の一部において見られるときのペプチド単独またはエピトープのいずれかよりもより強い抗体応答を誘導し得る。かかる変形免疫化スキームおよび他の免疫化スキームは、当業者に知られており、本発明の免疫化方法に含まれる。

#### 【0034】

免疫原は、抗原またはそれらのフラグメントをコードする核酸配列を有するプラスミドであり得る。本発明の他の態様において、本発明のモノクローナル抗体は、動物の免疫化から得られる抗体分子またはそれらのフラグメントのライブラリーをスクリーニングすることにより得ることができる。本発明のモノクローナル抗体はまた、抗体または抗体をコードする核酸のライブラリーから得ることができる。

#### 【0035】

本明細書において使用される「抗原」なる用語は、抗体生産を刺激することができるあらゆる物質であることが理解される。また、「免疫原」なる用語は、免疫応答を誘導するために使用されるあらゆる物質を含むことが理解される。

#### 【0036】

いくつかの態様において、本明細書においてモノクローナル抗体は、重鎖および/または軽鎖の一部が、特定の種由来の抗体由来の対応する配列または特定の抗体クラスまたは

10

20

30

40

50

サブクラスに属する配列と同一であるか、または相同であるが、残りの鎖が、別の種由來の抗体における対応する配列または別の抗体クラスまたはサブクラスに属する配列と同一であるか、または相同である「キメラ」抗体、ならびに、所望の生物学的活性を示すこのような抗体のフラグメントを含み得る（例えば、米国特許第4,816,567号；およびMorrisonら Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984) 参照）。

【0037】

「一本鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントは、単一のポリペプチド鎖に存在する抗体のVHおよびVLドメインを含む。一般的に、Fvポリペプチドは、sFvが抗原結合のための所望の構造を形成することができるようするVHおよびVLドメイン間にポリペプチドリンカーをさらに含む。sFvの概観ために、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) 参照。

10

【0038】

「ダイアボディ」なる用語は、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体フラグメントであって、該フラグメントが同じポリペプチド鎖において軽鎖可変ドメイン(VL)に連結している重鎖可変ドメイン(VH)(VH-VL)を含む抗体フラグメントを示す。同じ鎖上の2つのドメイン間で対形成することを可能にするように短いリンカーを使用することにより、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対になり、2つの抗原結合部位を創造させられる。

【0039】

20

1つの局面において、本発明は、抗体を意図される治療標的の種に適応させるための方法を提供する。一般的に、これら的方法は、ドナー抗原結合情報をより弱い免疫原性の哺乳動物抗体受容体に移し、有用な治療処置を產生するための方法として定義される「哺乳動物化(mammalization)」を含む。さらに具体的には、本発明は、抗体のネコ化(felinization)、ウマ化(equinization)およびイヌ化(caninization)のための方法を提供する。

【0040】

「イヌ化」は、ドナー抗体由來の非イヌ抗原結合情報をより弱い免疫原性のイヌ抗体アクセプターに移し、イヌにおける治療として有用な処置を產生する方法として定義される。

【0041】

30

「ネコ化」は、ドナー抗体由來の非ネコ抗原結合情報をより弱い免疫原性のネコ抗体アクセプターに移し、ネコにおける治療として有用な処置を產生する方法として定義される。

【0042】

「ウマ化」は、ドナー抗体由來の非ウマ抗原結合情報をより弱い免疫原性のウマ抗体アクセプターに移し、ウマにおける治療として有用な処置を產生する方法として定義される。

【0043】

本明細書において提供される非イヌ抗体のイヌ化形態は、非イヌ抗体由來の最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんど、イヌ化抗体は、レシピエントの超可変領域残基が、非イヌ種（「ドナー」抗体）、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ウシ、ウマ、ラマ、ラクダ、ヒトコブラクダ、サメ、非ヒト靈長類、ヒト、ヒト化、組換え配列、または所望の特性を有する操作された配列由來の超可変領域残基により置き換えられている、イヌ抗体配列（「受容体」または「レシピエント」抗体）である。場合によっては、イヌ抗体のフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非イヌFR残基により置き換えられる。さらに、イヌ化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体において見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体能力をさらに向上させるように作製される。イヌ化抗体はまた、イヌ抗体の免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部を含み得る。

40

【0044】

50

本明細書において使用される「同一性」は、2つのポリペプチド、分子、または2つの核酸間で一致している配列を示す。2つの比較配列の両方の位置が同じ塩基またはアミノ酸モノマーサブユニットにより占めるとき（例えば、2つのDNA分子のそれぞれにおける位置がアデニンにより占めるか、または2つのポリペプチドのそれぞれにおける位置がリジンにより占めるとき）、それぞれの分子はその位置で同一である。2つの配列間の「同一性パーセント」は、2つの配列により共有される一致している位置の数を比較される位置の数で割り、100を掛ける関数である。このようなアライメントは、例えば、全米バイオテクノロジー情報センター N C B I からのプログラム Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) を使用して提供することができる。

10

## 【0045】

1つの態様において、組換えポリペプチド、またはそれらのフラグメント、誘導体もしくは修飾体は、具体的には、患者に投与される。別の態様において、本発明の組換えポリペプチド、またはそれらのフラグメント、誘導体もしくは修飾体は、疾患状態または該疾患と関連するか、もしくは該疾患が介在する症状を処置、予防、回復またはあるいは低減する目的のために、哺乳動物体に細胞および/または組織の移植の前に、インビトロまたはエキソビオ条件下で細胞および/または組織に導入される。

## 【0046】

「フラグメント」および「領域」なる用語は、参照核酸分子またはポリペプチドの全長の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、またはそれ以上を含むポリペプチドまたは核酸分子の部分を示す。

20

## 【0047】

「ポリヌクレオチド」、「核酸」および「核酸分子」なる用語は、本明細書において互換的に使用され、あらゆる長さのヌクレオチドのポリマー形態を示す。ポリヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチドおよび/またはそれらのアナログを含むことができる。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を含むことができ、任意の既知または未知の機能を果たすことができる。ポリヌクレオチドなる用語は、一本鎖、二本鎖および三重らせん分子を含み、合成、天然または非天然であってよく、参照核酸と同様の結合特性を有するヌクレオチドアナログまたは修飾された骨格残基もしくは連結を含む核酸を含む。

30

## 【0048】

「オリゴヌクレオチド」は、一般的に、5から約100ヌクレオチドの一本鎖または二本鎖DNAであるポリヌクレオチドを示す。オリゴヌクレオチドはまた、一本鎖または二本鎖DNAの約10、20、30、40、50、60、70、80または90ヌクレオチドであるポリヌクレオチドを示す。本明細書の目的のために、オリゴヌクレオチドのサイズの下限は2であり、オリゴヌクレオチドの長さの上限はない。オリゴヌクレオチドは、「オリゴマー」または「オリゴ」としても知られており、天然ポリヌクレオチドからの単離、酵素合成および化学合成を含む当分野で知られている任意の方法により製造することができる。

## 【0049】

40

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」なる用語は、本明細書において互換的に使用され、あらゆる長さのアミノ酸残基のポリマーを示す。ポリペプチドは、任意の三次元構造を有することができ、任意の既知または未知の機能を果たすことができる。該用語は、1つ以上のアミノ酸残基が対応する天然アミノ酸の人工的化学模擬物であるアミノ酸ポリマー、ならびに天然アミノ酸ポリマーおよび非天然アミノ酸ポリマーに適用する。

## 【0050】

「アミノ酸」なる用語は、天然および合成アミノ酸、ならびに天然アミノ酸と同様の様式において機能するアミノ酸アナログおよびアミノ酸模擬物を示す。天然アミノ酸は、遺伝子コードによってコードされるもの、ならびにアミノ酸が後に、例えば、ヒドロキシブ

50

ロリン、-カルボキシグルタミン酸およびO-ホスホセリンで修飾されたものである。アミノ酸模擬物は、アミノ酸の一般的な化学構造と異なる構造を有するが、天然アミノ酸と同様の様式において機能する化合物を示す。

【0051】

アミノ酸は、本明細書において、一般的に知られている3文字記号またはIUPAC-IUB Biochemical Nomenclature Commissionにより推奨されている1文字記号のいずれかにより示され得る。ヌクレオチドは、同様に、一般的に受け入れられている1文字記号により示され得る。

【0052】

「保存的に修飾された変異体」または「保存変異体」なる用語は、アミノ酸および核酸配列の両方に適用される。特定の核酸配列に対して、保存的に修飾された変異体は、同一または実質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸のもの；または、アミノ酸配列をコードしない核酸に対して、実質的に同一である核酸を示す。本明細書において使用される「実質的に同一の」は、2つのアミノ酸またはポリヌクレオチド配列が、わずか10%のアミノ酸またはヌクレオチド位置、一般的にわずか5%、しばしばわずか2%、および非常に頻繁にわずか1%のアミノ酸またはヌクレオチド位置で異なることを意味する。

【0053】

遺伝子コードの縮重のため、多くの機能的に同一の核酸は、いずれかの所定のタンパク質をコードする。例えば、コドンGCA、GCC、GCGおよびGCUは、全てアミノ酸アラニンをコードする。したがって、アラニンがコドンにより特定されている全ての位置で、コドンは、コードされるポリペプチドを変化することなく、代替アラニンコドンのいずれかに変化させることができる。このような核酸変異は、保存的に修飾された変異体の1つの型である「サイレント変異」である。本明細書に記載されているポリペプチドをコードする核酸配列はまた、核酸の全ての可能なサイレント変異を含む。当業者は、核酸におけるそれぞれのアミノ酸コドン（通常メチオニンに対する唯一のコドンであるAUGおよび通常トリプトファンに対する唯一のコドンであるTGGを除く）が、1つ以上の位置で同じアミノ酸に対するコドンに変化され得ることを認識している。したがって、ポリペプチドをコードする核酸のそれぞれのサイレント変異は、発現産物に対してそれぞれ記載されている配列に含まれる。

【0054】

核酸に適用される「相補性」は、塩基対合の従来のワツンクリックまたは他の非従来の型のいずれかによる別のポリヌクレオチド配列との水素結合を形成する核酸の能力を示す。本発明の核酸分子への言及において、標的または相補的配列と核酸分子に関する結合自由エネルギーは、核酸の関連機能が、例えば、酵素的核酸開裂、RNA干渉、アンチセンスまたは三重らせん阻害を続行することを可能にするために十分である。核酸分子に対する結合自由エネルギーの決定は、当分野でよく知られている。「相補性パーセント」は、別の核酸分子と水素結合（例えば、ワツンクリック塩基対合）を形成することができる核酸分子における隣接する残基のパーセントを示す。「完全に相補的」または「100%相補性」は、核酸分子の隣接ヌクレオチドの全てが、第2の核酸分子における同じ数の隣接する残基と水素結合していることを意味する。本明細書において使用される「実質的な相補性」および「実質的に相補的」は、2つの核酸が、約15以上のヌクレオチド、およびさらにしばしば約19以上のヌクレオチドの領域にわたって、少なくとも90%相補的、一般的に少なくとも95%相補的、しばしば少なくとも98%相補的、および非常に頻繁に少なくとも99%相補的であることを示す。

【0055】

「相同」は、2つのヌクレオチド配列が、同じ遺伝子またはその遺伝子産物を示し、一般的に2つ以上の核酸分子のヌクレオチド配列が、部分的に、実質的にまたは完全に同一であることを意味する。同じ生物体由来のとき、同種ポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチド配列間の個々の違い（例えば、多型変異体、対立遺伝子など）があり得るが、同じ染色体位置を有する同じ遺伝子の代表である。1つの態様において、ホモログは、例えば、

10

20

30

40

50

転座の結果として、ゲノムにおいて非天然位置において見ることができる。

【0056】

「異種」なる用語は、通常、天然において互いに同じ関係において見られないあらゆる2つ以上の核酸またはポリペプチド配列を示す。例えば、異種核酸は、一般的に、2つ以上の配列を有して、例えば、新規機能性核酸を作製するように配置された非関連遺伝子、例えば、ある供給源由来のプロモーターおよび別の供給源由来のコード領域から組換え的に生産される。同様に、異種ポリペプチドは、しばしば、天然において互いに同じ関係において見られない2つ以上の部分配列（例えば、融合タンパク質）を示す。

【0057】

「ホモログ」なる用語は、参照アミノ酸配列（例えば、本明細書に記載されているアミノ酸配列のいずれか1つ）または核酸配列（例えば、本明細書に記載されている核酸配列のいずれか1つ）と少なくとも50%同一性を示すポリペプチドまたは核酸分子を示す。好ましくは、このような配列は、参照配列に対するアミノ酸レベルまたは核酸で少なくとも55%、57%、60%、65%、68%、70%、さらに好ましくは80%または85%、およびより好ましくは90%、95%、98%または99%同一である。

【0058】

「同様の」配列は、アラインされたとき、同一および同様のアミノ酸残基を共有するものであって、該同様の残基とは、アラインされた参照配列において対応するアミノ酸残基に対する保存的置換である。この点において、配列における保存的残基は、対応する参照残基と物理的または機能的に同様である、例えば、同様のサイズ、形状、電荷、化学特性、例えば、共有または水素結合を形成する能力などを有する残基である。2つの配列間の「類似性パーセント」は、2つの配列により共有される一致している残基または保存的残基を含む位置の数を比較される位置の数で割り、100を掛ける関数である。

【0059】

本明細書において使用される「アミノ酸コンセンサス配列」は、少なくとも2つ、および好ましくはそれ以上のアラインされたアミノ酸配列のマトリックスを使用して、それぞれの位置で非常に頻繁なアミノ酸残基を決定することができるよう、アラインメントにおけるギャップを考慮して产生することができる仮説的アミノ酸配列を示す。コンセンサス配列は、それぞれの位置で非常に頻繁に示されているアミノ酸を含む配列である。万一、2つまたはそれ以上のアミノ酸が單一の位置で均一に示されているという場合には、コンセンサス配列は、これらのアミノ酸の両方または全てを含む。いくつかの場合において、アミノ酸コンセンサス配列は、天然において見られる配列または部分配列に対応する。他の場合において、アミノ酸コンセンサス配列は、天然において見られず、理論的配列のみを示す。

【0060】

タンパク質のアミノ酸配列は、種々のレベルで分析することができる。例えば、保存または可変性は、單一の残基レベル、複数の残基レベル、ギャップなどを有する複数の残基で示すことができる。残基は、同一の残基の保存を示すことができ、またはクラスレベルで保存され得る。以下の8つのグループはそれぞれ、互いに對して保存的置換であるアミノ酸を含む：1) アラニン (A)、グリシン (G)；2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；4) アルギニン (R)、リジン (K)；5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；7) セリン (S)、スレオニン (T)；および8) システイン (C)、メチオニン (M)（例えば、Creighton, Proteins (1984) 参照）。他のクラスは当業者に知られており、構造決定または代替性を評価するための他のデータを使用して定義され得る。

【0061】

アミノ酸配列に関して、当業者は、コードされた配列における單一のアミノ酸または少數のアミノ酸を変化、挿入または欠失する核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列に対する個々の置換、欠失または挿入が、該変化が化学的に同様のアミノ酸でのア

10

20

30

40

50

ミノ酸の置換をもたらす「保存的に修飾された変異体」であることを認識している。機能的に同様のアミノ酸を記載している保存的置換表は、当分野でよく知られている。このような保存的に修飾された変異体は、加えて、本発明の機能的に同等の多型変異体、ホモログおよび対立遺伝子を除かない。

#### 【0062】

本明細書において使用される、1つのアミノ酸配列（例えば、第1のVHまたはVL配列）が1つ以上のさらなるアミノ酸配列（例えば、データベースにおける1つ以上のVHまたはVL配列）とアラインされるとき、1つの配列（例えば、第1のVHまたはVL配列）におけるアミノ酸位置は、1つ以上のさらなるアミノ酸配列における「対応する位置」と比較され得る。本明細書において使用される「対応する位置」は、配列が最適にアラインされるとき、すなわち、配列が最も高い同一性パーセントまたは類似性パーセントをなし遂げるようアラインされるとき、比較される配列における同等位置を示す。  
10

#### 【0063】

本明細書において使用される「抗体データベース」なる用語は、2つ以上の抗体アミノ酸配列（「多数」または「複数」の配列）の回収物を示し、一般的に10、100またはさらに1000の抗体アミノ酸配列の回収物を示す。抗体データベースは、例えば、抗体VH領域、抗体VL領域またはそれらの両方の回収物のアミノ酸配列を保存することができ、またはフレームワーク配列の回収を保存することができる。1つの態様において、抗体データベースは、生殖細胞系列抗体配列を含むか、または該配列からなるデータベースである。別の態様において、抗体データベースは、成熟抗体配列（例えば、成熟抗体配列のKabatデータベース）を含むか、または該配列からなるデータベースである。別の態様において、抗体データベースは、1つ以上の所有物に対して選択された配列を含むか、または該配列からなる。別の態様において、抗体データベースは、コンセンサス配列を含むか、または該配列からなる抗体データベースである。別の態様において、抗体データベースは、同様の配列を含むか、または該配列からなる抗体データベースである。さらに別の態様において、抗体データベースは、主要な抗体クラン由来の配列を含むか、または該配列からなる（Dasら Immunogenetics, 60:47-55 (2008); Dasら Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105:16647-16652 (2008)）。

#### 【0064】

本明細書において使用される「性質」または「特性」なる用語は、例えば、ポリペプチドの製造特性または治療効果を改善するために、当業者に望ましい、および/または有利であるポリペプチドの性質である。1つの態様において、機能特性は、改善された安定性である。別の態様において、機能特性は改善された溶解度である。さらに別の態様において、機能特性は非凝集である。さらに別の態様において、機能特性は発現における改良である。1つの態様において、機能特性は抗原結合親和性における改良である。  
30

#### 【0065】

発現「コントロール配列」は、特定の宿主生物において作動可能に連結しているコード配列の発現のために必要であるDNA配列を示す。原核生物のために適当であるコントロール配列は、例えば、プロモーター、所望によりオペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核細胞は、プロモーター、ポリアデニル化シグナルおよびエンハンサーを利用することが知られている。  
40

#### 【0066】

核酸は、別の核酸配列と機能的な関係に配置されているとき、「作動可能に連結している」。例えば、プレ配列または分泌リーダーに対するDNAは、ポリペプチドの分泌に関与するプレタンパク質として発現されるとき、ポリペプチドに対するDNAに作動可能に連結されており；プロモーターまたはエンハンサーは、配列の転写に影響するとき、コード配列に作動可能に連結されており；または、リボソーム結合部位は、翻訳を容易にするように配置されるとき、コード配列に作動可能に連結されている。一般的に、「作動可能に連結している」は、連結しているDNA配列が隣接しており、分泌リーダーの場合、リーディング相において隣接していることを意味する。しかしながら、エンハンサーは、隣

10

20

30

40

50

接していなくてもよい。連結は、便利な制限酵素認識部位でのライゲーションにより成し遂げられる。このような部位が存在しないとき、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーが慣用の習慣にしたがって使用される。

【0067】

「コドン最適化」または「コドン最適化配列」なる用語は、元の翻訳されたポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく最適化されており、宿主種において低い使用頻度で有する任意のコドンでの置換、スプリアス(spurious)ポリアデニル化配列の除去、エクソン/イントロンスプライシングシグナルの除去、トランスポゾン様リピートの除去およびGC含有量の最適化を含むヌクレオチド配列を示す。

【0068】

本明細書において使用される「細胞」、「細胞系」および「細胞培養」なる表現は互換的に使用され、全てのこののような意味は子孫を含む。したがって、「形質転換体」および「トランスフェクタント」、「形質転換細胞」および「トランスフェクト細胞」なる用語は、一次対象細胞およびそれ由来の培養物を含む。

【0069】

本明細書において使用される免疫原性は、動物に導入されるとき、免疫応答、例えば、体液性または抗体応答を誘導する抗原（天然抗原、それらのフラグメント、変異体および誘導体、ならびに組換えおよび合成抗原を含む）を示す。

【0070】

本明細書において使用される「免疫原性なし」または「非免疫原性」なる用語は、抗原、例えば、抗体、または他の分子が、治療効果をなし遂げるために十分な時間、処置された患者の多くにおいて抗体の連続投与の有効性を減少させるような十分な大きさの抗体応答を引き起こさないことを意味する。

【0071】

本明細書において使用される「治療」なる用語は、「疾患」または「障害」または「状態」に対する処置の全範囲を含む。本発明の「治療」剤は、危険性（遺伝薬理学的）があると同定することができる個体を標的化するように設計された手法を組み込む処置を含み、予防的または防止的に作用し得る；または、自然に改善または治癒するように作用し得る；または、疾患または障害の進行の速度または程度を遅延するように作用し得る；または、必要とされる時間、あらゆる不快または苦痛の発生または程度、または疾患、障害または身体外傷からの回復と関連する身体的制約を最小限にするように作用し得る；または、他の治療および処置に対するアジュvantとして使用され得る。

【0072】

本明細書において使用される「処置」は、動物に対する治療薬のあらゆる投与または適用、例えばヒトにおける疾患、疾患を阻害する、すなわち、発症を阻止する；疾患を軽減する、すなわち、退行を引き起こす；および疾患を排除する、すなわち、疾患細胞の除去または非疾患状態の回復を引き起こすことを含む。処置は、治療処置および予防または防止処置の両方を示す。処置を必要とするものは、障害をすでに有するもの、ならびに障害を予防すべきであるものを含む。

【0073】

本明細書における抗体、ポリペプチドまたはポリヌクレオチドの「医薬組成物」または「薬学的に許容される組成物」は、通常、当分野で慣用であり、治療、診断または予防目的のために対象への投与に対して適当である薬学的に許容される担体または賦形剤を含む組成物を示す。例えば、経口投与のための組成物は、溶液、懸濁液、錠剤、丸剤、カプセル、持続放出製剤、含嗽液または粉末を形成することができる。

【0074】

「併用療法」なる用語は、指示された治療効果をなし遂げるような少なくとも2つの別個の治療の提供を含む治療レジメンを示す。例えば、併用療法は、2つ以上の化学的に別個の活性成分、例えば、化学療法剤および抗体の投与を含み得る。あるいは、併用療法は、抗体および/または1つ以上の化学療法剤の投与を、単独または別の処置、例えば、放

10

20

30

40

50

射線療法および／または外科手術の送達と一緒に含み得る。2つ以上の化学的に別個の活性成分の投与の文脈において、活性成分は、同じ組成物の一部として、または異なる組成物として投与され得ることが理解される。別々の組成物として投与されるとき、異なる活性成分を含む組成物は、同時か、または異なっている時間で、同じか、または異なっている経路により、同じか、または異なっている投与レジメンを使用して投与され得、全て特定の事情上に応じて、担当の獣医または介護人により決定され得る。

【0075】

「単剤療法」なる用語は、単回投与または時間をかけて複数回投与として投与されようとなかろうと、1つの治療的に有効な化合物の送達に基づく処置レジメンを示す。

【0076】

「免疫状態」は、免疫系またはその一部、例えば、免疫系の細胞が、異常であるか、または疾患状態を引き起こす、関節炎、乾癬、炎症性腸疾患、多発性硬化症、心筋梗塞、卒中、溶血性貧血、アトピー性皮膚炎、皮膚障害などを含む広範な疾患に対する一般名である。免疫状態は、免疫細胞、組織または臓器における原発性欠損、ならびに自己抗原の免疫認識を防止するための正常メカニズムが欠損しており、非免疫細胞、組織または臓器型に関する疾患または障害をもたらす「自己免疫性状態」を含む。癌、例えば、白血病およびリンパ腫は原発性免疫障害であるが、多発性硬化症および狼瘡は自己免疫性起源であると考えられている。

【0077】

多数の治療剤は、ヒトに対する種々の型の免疫状態の処置のために、過去数十年にわたって開発されており、これらはまた、ペットにおける免疫状態の処置のために使用されている。最も一般的に使用される抗免疫剤の型は、免疫抑制剤（例えば、シクロスボリン、チオプリン、プレドニゾン）、および鎮痛剤および解熱剤（例えば、アスピリン、イブプロフェン、ナプロキセン、セレコキシブ、ニメスリド、リコフェロン、オメガ-3-脂肪酸）を含み、これらそれぞれは、本発明の抗体と同時に、連続して、もしくは共通の投与レジメンにおいて投与され得る。

【0078】

本明細書において使用される「癌」は、あらゆる異常な細胞または組織増殖、例えば、悪性または非悪性であり得る腫瘍を示す。癌は、周囲組織に侵入していくよく、または侵入していくなくてもよく、したがって、新規身体部位に転移していくよく、または転移していくなくてもよい、細胞の制御されない増殖により特徴付けられる。癌は、上皮性細胞の癌である癌腫（例えば、扁平上皮癌、腺癌、黒色腫および肝臓癌）を含む。癌はまた、間葉性起源の腫瘍である肉腫（例えば、骨肉腫、白血病およびリンパ腫）を含む。癌は、1つ以上の腫瘍性細胞型を含み得る。癌は、非制御な増殖、分化の欠如、および局所組織に侵入し、転移する能力により特徴付けられる広範な細胞性悪性腫瘍に対する一般名である。これらの新生悪性腫瘍は、種々の程度の罹患率で、全ての身体の組織および臓器に影響する。多数の治療剤は、ヒトに対する種々の型の癌の処置のために、過去数十年にわたって開発されており、ペットにおける癌の処置のために不認可でまたは再製剤化されて使用されている。最も一般的に使用される抗癌剤の型は、DNA-アルキル化剤（例えば、シクロホスファミド、イホスファミド）、抗代謝産物（例えば、メトトレキサート、葉酸アンタゴニスト、および5-フルオロウラシル、ピリミジンアンタゴニスト）、微小管分解剤（例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、パクリタキセル）、DNA挿入剤（例えば、ドキソルビシン、ダウノマイシン、シスプラチン）、および免疫抑制剤（例えば、プレドニゾン）を含み、これらそれぞれは、本発明の抗体と同時に、連続して、もしくは共通の投与レジメンにおいて投与され得る。（例えば、Withrow & MacEwen's, Small Animal Clinical Oncology, Saunders Elsevier, 4<sup>th</sup> ed. (2007)参照）。

【0079】

本明細書に記載されている技術に付すことができる抗体（mAb）は、種々の供給源由來のモノクローナルおよびポリクローナルmAb、および抗体フラグメント、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fd、scFv、ダイアボディ、抗体軽鎖、抗体重鎖

10

20

30

40

50

および／または抗体フラグメントを含む。抗体は、配列ドナー種から得られる。さらに特に、ドナー種抗体の軽鎖、重鎖または両方の可変部分の核酸またはアミノ酸配列は、所望の抗原に対する特異性を有する。ドナー種は、抗体または抗体ライブラリーを产生するために使用された任意の種である、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ネコ、イヌ、ヤギ、ニワトリ、ウシ、ウマ、ラマ、ラクダ、ヒトコブラクダ、サメ、非ヒト靈長類、ヒト、ヒト化、組換え配列、操作された配列など。モノクローナル抗体を产生およびクローニングする技術は、当業者によく知られている。

【0080】

ドナー種またはライブラリーから得られた抗体をシーケンシング後、可変領域（V H およびV L）は、CDRおよびフレームワークの任意の公開された定義（例えば、Kabat、Chothia、AbM、コンタクト(contact)定義およびそれらの任意の組合せ、ならびに当業者に知られている任意の他のもの）を使用して、別々の領域、例えば、リーダー配列、フレームワーク（FR）およびCDRに分離される。特定の態様において、FRおよびCDRは、Kabat定義を基準にして同定される。

10

【0081】

本明細書において表されているときはいつでも、数的範囲、例えば、「1から100」は、所定の範囲におけるそれぞれの整数を示す；例えば、「1から100ヌクレオチド」は、核酸が1個のヌクレオチドのみ、2個のヌクレオチド、3個のヌクレオチドなど、最大100個のヌクレオチドを含むことができる意味する。

【0082】

20

重鎖の定常ドメインについて、標的種由来の任意のサブクラスの定常ドメインまたはそのフラグメントが、重鎖ヘテロキメラ可変ドメインに融合され得る。

【0083】

本発明の組換え抗体の操作は、組換え、エラープローン(error-prone)PCR、シャフリング(shuffling)、オリゴヌクレオチド指向性変異誘発、アセンブリ(assembly)PCR、セクシャル(sexual)PCR変異誘発、インビオ変異誘発、部位特異的変異誘発、遺伝子再集合、合成ライゲーション再集合またはそれらの組合せを含む当分野で既知の任意の方法により抗体をコードする核酸への修飾、付加または欠失の導入により創造することができる。

【0084】

30

さらに、本発明の範囲内で構想されるものは、炎症の発症に介在するか、または関連する全てのペットの疾患および／または状態、ならびに自己免疫に介在するか、または関連するペットの疾患および／または状態の処置のための、本明細書に記載されている組換え核酸もしくはタンパク質またはそれらのフラグメントもしくは誘導体の使用である。このような疾患および／または状態は、炎症性疾患として本明細書において示され、限定はないが、炎症、自己免疫疾患および免疫関連疾患を含む。

【0085】

さらなる局面において、本発明は、本発明の抗体が治療的または予防的使用のために提供される医薬組成物を特徴とする。本発明は、特定の抗原、例えば、疾患と関連するものを有するイヌ対象を処置するための方法を特徴とする。該方法は、治療有効量の特定の抗原に対して特異的な組換え抗体を、本明細書に記載されている組換え抗体と共に投与することを含む。

40

【0086】

治療効果を生産するために有用な抗体の量は、当業者によく知られている標準技術により決定することができる。抗体は、一般的に、薬学的に許容されるバッファー内で標準技術により提供され、所望の任意の経路により投与され得る。本発明の抗体または抗原結合部分の投与経路は、経口的、非経口的、吸入的または局所的であり得る。本明細書において使用される非経口なる用語は、静脈内、筋肉内、皮下的、経直腸的、腔内または腹腔内投与を含む。

【0087】

50

上記手段または同等の技術により生産される抗体は、機能性生物学的アッセイにおける特性化のためにアフィニティーおよびサイズ排除クロマトグラフィーの組合せにより精製することができる。これらのアッセイは、特異性および結合親和性ならびに発現されるアイソタイプと関連するエフェクター機能、例えば、ADC、アポトーシス、または補体結合の決定を含む。このような抗体は、多くの疾患、例えば、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、自己免疫疾患、炎症性疾患、感染症、および移植に対する受動的または能動的治療剤として使用され得る。

【0088】

「抗体依存性細胞介在細胞毒性」および「ADC」は、非特異的細胞毒性細胞、例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球およびマクロファージが標的細胞上に結合した抗体を認識し、次に標的細胞の溶解を引き起こす細胞介在反応を示す（例えば、Janewayら Immuno Biology: Elsevier Science Ltd., 4th ed., (1999) 参照）。

10

【0089】

「補体依存性細胞毒性」および「CDC」は、補体の存在下での標的の溶解を示す。補体活性化経路は、同種抗原と複合体化した分子（例えば抗体）への補体系の第1の成分（C1q）の結合により開始する。

【0090】

本明細書において使用される「増強した」または「減少した」ADCまたはCDC活性は、一般的に、参考重鎖よりも高い活性または低い活性を与える重鎖を示す。当分野で理解されるとおり、活性の量は、当分野で知られている任意のアッセイまたは技術にしたがう手段で、定量的または定性的に、並行してまたは別々に決定され得る。

20

【0091】

上記局面の1つの態様において、抗原は、腫瘍抗原、免疫障害に関する抗原、自己免疫性応答に関する抗原、宿主細胞上に発現されるか、血液循環において利用できるか、もしくは細胞により分泌される受容体であり、組換え抗体は、望ましくない細胞を枯渇させるか、または受容体機能を阻害もしくは刺激するか、または活性な可溶性生成物を中和することができる。

【0092】

本発明の抗体（またはそれらのフラグメント）はまた、ペットにおける腫瘍を処置するために有用であり得る。さらに具体的には、それらは、腫瘍サイズを減少する、腫瘍増殖を阻害する、および/または腫瘍含有動物の生存時間を延長するために有用であるべきである。したがって、本発明はまた、有効用量を投与することによるイヌまたは他の動物における腫瘍を処置する方法に関する。有効用量は、1日に1キログラム体重あたり約0.05から100ミリグラムの範囲であることが予期される。有効用量はまた、1日に1キログラム体重あたり約0.05、0.10、0.50、1.0、5.0、10.0、15.0、20.0、25.0、30.0、35.0、40.0、45.0、50.0、55.0、60.0、65.0、70.0、75.0、80.0、85.0、90.0、95.0および100ミリグラムであり得ることがさらに考慮される。

30

【0093】

特定の態様において、本発明は、CD20に対する抗体を提供する。イヌCD20は、ほとんど全ての正常および悪性B細胞の表面上に発現される非グリコシル化内在性膜リントンパク質である。それは、4つの膜貫通疎水性領域および第3および第4膜貫通ドメイン間の短い細胞外ループを有する。

40

【0094】

CD20タンパク質は、ヒトCD20のような2つの細胞外ドメイン、4つの膜貫通ドメインおよび3つの細胞内ドメインからなるアミノ酸配列のドメインを含むことが予期される。

【0095】

イヌCD20のアミノ酸配列は、ヒトおよびマウスのものと配列類似性を示す。イヌCD20のアミノ酸配列は、ヒト遺伝子と高度な類似性を示し、同様の生物学的機能を示唆

50

する。イヌおよびヒト C D 2 0 配列間の配列相同性にもかかわらず、ヒト C D 2 0 抗原に対するモノクローナル抗体であるリツキシマブは、恐らくリツキシマブにより認識される C D 2 0 の細胞外ドメインのエピトープにおけるヒトおよびイヌ間の相同性の欠如によって、イヌ B 細胞と反応しない (Veterinary Journal, 2006, vol 171, 556)。

イヌ C D 2 0 のいくつか報告されているバージョンが存在する。1つの態様において、イヌ C D 2 0 は、配列番号：1：

【表 1】

MTTPRNSMSGTLPVDPMSPTAMYPVQKIIPKRMPGVGPTQNFFMRESKTLGAVQIMNGLF  
HIALGSLLMIHTDVYAPICITMWYPLWGGIMFIISGSLLAAADKNPRKSLVKGKIMNSLSLF  
AAISGIIFLIMDIFNITISHFFKMENLNLIKAPMPYVDIHNCDPANPSEKNSLSIQYCGSIRSVFLG  
VFAVMVIFTFFQKLVTAGIVENEWKKLCSKPKSDVVVLLAAEEKKEQPIETTEEMVELTEIAS  
QPKKEEDIEIIPVQEEEEELEINFAEPPQEQQESSPIENDSIP

10

【0096】

正常および悪性 B リンパ球により発現される C D 2 0 抗原に対するイヌ抗体。抗体は、哺乳動物細胞 (C H O または P e r . C 6 ) において生産され、製造および精製加工で処理される。産物は、非経口投与用の滅菌性の透明な無色の保存剤を含まない液体濃縮物である。

【0097】

20

したがって、本発明は、(i) ドナー種由来の抗体において見られる配列と完全に、もしくは実質的に同一の超可変領域配列；(ii) ドナー種と異なる標的種由来の抗体において見られる配列と完全に、もしくは実質的に同一の定常領域配列；および(iii) 標的種由来の抗体において見られる配列に対応する少なくとも3つの隣接する非 C D R 残基およびドナー種由来の抗体において見られる配列に対応する少なくとも3つの隣接する非 C D R 残基を含む重鎖および/または軽鎖可変フレームワーク配列、を含むヘテロキメラ抗体および/またはそのフラグメントを提供する。

【0098】

1つの態様において、本発明の抗体は、特定の疾患または障害、例えば、急性炎症、リウマチ性関節炎、移植拒絶反応、喘息、アレルギー性炎症、再狭窄、動脈再狭窄、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、多発性硬化症、乾癬、創傷治癒、エリテマトーデス、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、糖尿病、皮膚炎、血栓性血小板減少性紫斑病、脳炎、白血球接着不全症、リウマチ性発熱、乾癬性関節炎、骨関節症、眼の炎症性疾患、進行性全身性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、C N S 炎症性疾患、抗原抗体複合体介在疾患、自己免疫性溶血性貧血、虚血性心臓疾患、アテローム性動脈硬化症、透析後症候群、白血病、後天性免疫不全症候群、敗血症性ショック、脂質性組織球増殖症および癌と関連している抗原を標的とする。

30

【0099】

特に興味のあるものは、抗原 C D 2 0 である。当業者は、抗原が好ましくは標的種（例えば、イヌ、ネコまたはウマ）から単離されるか、または標的種由来であるが、適当な交差反応性抗体が、いくつかの場合において、異種由来の抗原を使用することにより产生することができることを理解している。

40

1.1. 相補性決定領域およびフレームワーク領域が K a b a t にしたがって定義されている、前記の態様のいずれかに記載の抗体。

1.2. 抗体の定常領域が、A D C C 、抗体依存性細胞食作用 (A D C P ) および補体依存性細胞毒性 (C D C ) から選択される細胞毒性エフェクター機能を増強させるように修飾されている、前記の態様のいずれかに記載の抗体。

【0100】

さらなる態様において、本発明は、以下のものを提供する。

2. イヌまたはネコまたはウマ C D 2 0 を認識する抗体または抗体フラグメントである抗

50

体 2。

2.1. イヌまたはネコまたはウマ C D 2 0 に対するものである抗体 2。

2.2. C D 2 0 の 1 つ以上の細胞外ループの配列を含むペプチドを含むか、または発現する免疫原性構築物に対する抗体由来であるか、または該抗体と実質的に同じ超可変ドメインを有する、抗体 2.1。

2.3. C D 2 0 を発現する細胞のアポトーシスを誘導する、抗体 2-2.2 のいずれか。

2.4. C D 2 0 を発現する細胞の増殖を抑制する、抗体 2-2.3 のいずれか。

2.5. 抗体依存性細胞介在細胞毒性 (A D C C) による C D 2 0 を発現する細胞の死を引き起こす、抗体 2-2.4 のいずれか。

10

2.6. 補体依存性細胞毒性 (C D C) による C D 2 0 を発現する細胞の死を引き起こす、抗体 2-2.5 のいずれか。

2.7. 例えば、配列番号：2 のネコ C D 2 0 に対する抗体である、抗体 2-2.6 のいずれか。

2.8. 例えば、配列番号：1 のイヌ C D 2 0 に対する抗体である、抗体 2-2.6 のいずれか。

2.9. 1 つ以上の配列番号：1 および配列番号：2 の配列から選択される配列を含むペプチドを含むか、または発現する免疫原性構築物に対する抗体由来であるか、または該抗体と実質的に同じ超可変ドメインを有する、抗体 2.8。

2.10. イヌ C D 2 0 の細胞外ループ上のエピトープを特異的に認識する抗体 2.8 または 2.9 であって、該エピトープは、配列番号：1 の残基 74-84、178-188、154-170、140-146、162173、148-159、142-153、148-169、166-177 または 161-176 の 1 つ以上の配列から選択される配列を含むペプチドを含むか、または発現する C D 2 0 の領域を含むか、または該領域内で見られる、抗体 2.8 または 2.9。

20

2.11. ウマ C D 2 0 に対する抗体である、抗体 2-2.6 のいずれか。

2.12. ドナー種抗体由来の超可変配列および標的種由来の定常領域配列を含む、抗体 2-2.11 のいずれか。

2.13. イヌ化されている、抗体 2 のいずれか。

2.14. ネコ化されている、抗体 2 のいずれか。

30

2.15. ウマ化されている、抗体 2 のいずれか。

2.16. 抗体 1-1.35 のいずれかのヘテロキメラ抗体である、抗体 2.23 から 2.26 のいずれか。

2.17. モノクローナルであり、完全にイヌ抗体である、抗体 2 のいずれか。

2.18. モノクローナルであり、完全にネコ抗体である、抗体 2 のいずれか。

2.19. モノクローナルであり、完全にウマ抗体である、抗体 2 のいずれか。

2.20. 配列番号 17-43 から選択される配列を含む、イヌまたはネコ C D 2 0 を認識する抗体 2 のいずれか。

2.21. イヌまたはネコ C D 2 0 を認識し、配列番号 17-43 からの少なくとも 1 つの C D R 領域を含む抗体 2 のいずれか。

40

2.22. m A b C D 2 0 - 1、C D 2 0 - 2、C D 2 0 - 3、C D 2 0 - 4、C D 2 0 - 5 および C D 2 0 - 6 から選択される抗体の結合特性を有する抗体 2 のいずれか。

2.23. A V D - 1 から A V D - 13 から選択される可変ドメイン構造を含む、請求項 1-3 のいずれかに記載の抗体 2 のいずれか。

2.24. 配列番号：20、21、22、24、25、26、28、32、33、36、37、38、39、41 および 43 から選択される軽鎖および配列番号：17、18、19、23、27、29、30、31、34、35、38、40 および 42 から選択される重鎖を含む抗体 2 のいずれか。

2.25. ヘテロキメラ抗体である、抗体 2 のいずれか。

2.26. 定常ドメインが、増強した A D C C および / または C D C を提供するために選

50

択された配列を含む、抗体または抗体フラグメント。

2.27. イヌ C D 2 0 に結合し、定常領域がイヌ起源である、抗体 2 のいずれか。

2.28. ネコ C D 2 0 に結合し、定常領域がネコ起源である、抗体 2 のいずれか。

【 0 1 0 1 】

本発明は、抗体 1 または 2 のいずれかをコードする核酸をさらに提供する。

【 0 1 0 2 】

本発明は、さらに以下のものを提供する。

a. 標的抗原を発現する異常細胞の存在または異常細胞のレベルにより特徴付けられる疾患または状態に罹患している患者を処置する方法であって、治療有効量のこのような標的抗原に結合する抗体を投与することを含み、該抗体は抗体 1 または 2 から選択される、方法。  
10

b. C D 2 0 を発現する異常細胞の存在または異常細胞のレベルにより特徴付けられる疾患または状態に罹患している患者を処置する方法であって、治療有効量の抗体 1 および 2 から選択される抗体を投与することを含む、方法。

c. 患者がイヌである、方法 b )。

d. 処置される状態がイヌリンパ腫である、方法 c )。

e. 疾患が、急性炎症、リウマチ性関節炎、移植拒絶反応、喘息、アレルギー性炎症、再狭窄、動脈再狭窄、炎症性腸疾患、ブドウ膜炎、多発性硬化症、乾癬、創傷治癒、エリテマトーデス、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、食物アレルギー、糖尿病、皮膚炎、血栓性血小板減少性紫斑病、脳炎、白血球接着不全症、リウマチ性発熱、乾癬性関節炎、骨関節症、眼の炎症性疾患、進行性全身性硬化症、原発性胆汁性肝硬変、C N S 炎症性疾患、抗原抗体複合体介在疾患、自己免疫性溶血性貧血、虚血性心臓疾患、アテローム性動脈硬化症、透析後症候群、白血病、後天性免疫不全症候群、敗血症性ショック、脂質性組織球増殖症および癌からなる群から選択される、方法 a )。

f. 化学療法の投与をさらに含む、方法 a 、 b 、 c または d または e 。

g. 化学療法が、シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン、プレドニゾン、L - アスパラギナーゼ、シトキサンおよびアドリアマイシンから選択される 1 つ以上の薬剤の投与を含む、方法 f 。

h. 化学療法が、例えば、癌細胞における抗体の A D C C 効果への干渉を増強または減少させるように、エフェクター細胞を省くか、または増強させる、方法 f または g 。

i. コルチコステロイド、例えば、プレドニゾンの投与をさらに含む、前記方法のいずれか。

j. 放射線の投与をさらに含む、前記方法のいずれか。

k. C D 2 0 および C D 5 2 に対する抗体の共投与を含む、前記方法のいずれか。

【 0 1 0 3 】

本発明は、さらに、例えば、方法 a - k のいずれかにおける使用のための、抗体 1 または 2 のいずれかを含む医薬組成物を提供する。

【 0 1 0 4 】

本発明は、さらに、方法 a - k のいずれかにおける使用のための医薬のとしての、または医薬の製造における抗体 1 または 2 のいずれかの使用を提供する。  
40

【 0 1 0 5 】

本発明は、さらに、抗体 1 または 2 のいずれかを安定に発現する細胞系、例えば、抗体 1 または 2 のいずれかを安定に発現する C H O 細胞系または P e r C 6 を提供する。

【 0 1 0 6 】

本発明は、さらに、抗体 1 または 2 のいずれかの少なくとも 1 つの重鎖および少なくとも 1 つの軽鎖を発現するベクターを提供する。

【 0 1 0 7 】

本発明は、さらに、抗体 1 または 2 のいずれかの少なくとも 1 つの重鎖および少なくとも 1 つの軽鎖を発現するベクターで細胞系を形質転換することを含む抗体を製造する方法を提供する。  
50

**【 0 1 0 8 】**

例えば、方法 K における使用のための C D 5 2 に対する抗体を、例えば、同時係属米国仮出願番号 6 1 / 3 1 0 , 4 5 0 ならびにそれからの優先権主張された出願 U S および P C T 出願（これらの内容を出典明示により本明細書に包含させる）において記載されている。

**【 0 1 0 9 】**

別の態様において、本発明は、本発明の抗体で処置することができる疾患または状態を診断する方法であって、組織サンプルを得て、本発明の抗体の 1 つによる結合を測定することを含む方法、および、本発明の抗体、例えば、抗体 1 または 2 のいずれかを含む、このような方法を行うための診断キットを提供する。

10

**【 0 1 1 0 】**

したがって、本発明は、以下の抗体、ならびにそれらの機能性フラグメントおよび保存変異体を提供する：

【表2】

配列番号	名称	種類
配列番号1	CD20	イヌCD20
配列番号2	CD20	ネコCD20
配列番号3	CD20 FL-F	プライマー
配列番号4	CD20 FL-R	プライマー
配列番号5	CD20 Lp-F	プライマー
配列番号6	CD20 Lp-R	プライマー
配列番号7	FCD20R	プライマー
配列番号8	VET200	イヌ HC
配列番号9	VET201	イヌ HC
配列番号10	VET202	イヌ HC
配列番号11	VET203	イヌ HC
配列番号12	VET204	イヌ HC
配列番号13	VET205	イヌ HC
配列番号14	VET206	イヌ HC
配列番号15	VET100	イヌ LC
配列番号16	VET101	イヌ LC
配列番号17	VET256	Ma b CD20-1 HC
配列番号18	VET229	Ma b CD20-1 HC FR4 <sub>T</sub>
配列番号19	VET230	Ma b CD20-1 HC FR1 <sub>T</sub> FR4 <sub>T</sub>
配列番号20	VET132	Ma b CD20-1 LC
配列番号21	VET119	Ma b CD20-1 LC FR4 <sub>T</sub>
配列番号22	VET120	Ma b CD20-1 LC FR1 <sub>T</sub> FR4 <sub>T</sub>
配列番号23	VET259	Ma b CD20-2 HC FR4 <sub>T</sub>
配列番号24	VET134	Ma b CD20-2 LC
配列番号25	VET138	Ma b CD20-2 LC FR4 <sub>T</sub>
配列番号26	VET121	Ma b CD20-3 LC FR4 <sub>T</sub>

10

20

30

【表3】

配列番号27	V E T 2 3 5	M a b C D 2 0 - 4 H C F R 4 T
配列番号28	V E T 1 6 3	M a b C D 2 0 - 3 L C
配列番号29	V E T 2 8 7	M a b C D 2 0 - 4 H C
配列番号30	V E T 2 8 6	M a b C D 2 0 - 5 H C
配列番号31	V E T 2 6 8	M a b C D 2 0 - 5 H C F R 4 T
配列番号32	V E T 1 6 2	M a b C D 2 0 - 5 L C
配列番号33	V E T 1 5 1	M a b C D 2 0 - 5 L C F R 4 T
配列番号34	V E T 2 8 9	M a b C D 2 0 - 6 H C
配列番号35	V E T 2 8 1	M a b C D 2 0 - 6 H C F R 4 T
配列番号36	V E T 1 5 9	M a b C D 2 0 - 6 L C
配列番号37	V E T 1 6 1	M a b C D 2 0 - 6 L C F R 4 T
配列番号38	V E T 3 0 5 - 全長 H C	M a b C D 2 0 - 2 H C
配列番号39	V E T 3 0 5 - 全長 L C	M a b C D 2 0 - 2 L C
配列番号40	V E T 3 0 8 - 全長 H C	M a b C D 2 0 - 5 H C
配列番号41	V E T 3 0 8 - 全長 L C	M a b C D 2 0 - 5 L C
配列番号42	V E T 3 0 9 - 全長 H C	M a b C D 2 0 - 6 H C
配列番号43	V E T 3 0 9 - 全長 L C	M a b C D 2 0 - 6 L C
配列番号44	V E T 2 4 6	ネコ H C
配列番号45	V E T 2 4 9	ネコ H C
配列番号46	V E T 1 3 1	ネコ L C

## 【0111】

30

本発明の他の特徴および利点は、その好ましい態様の以下の記載および特許請求の範囲から明らかである。

## 【実施例】

## 【0112】

## 実施例1. イヌおよびネコCD20のクローニング

## I. イヌCD20のクローニング

イヌCD20遺伝子を哺乳動物発現ベクターにクローニングし、対応するプラスミドDNAを哺乳動物細胞にトランスフェクトすることができる。CD20を発現する細胞を、免疫化および細胞スクリーニングベースのアッセイのために使用することができる。

## 【0113】

40

CD20をイヌ末梢血単核細胞(PBMC)から単離する。全RNAを、Master Pure<sup>TM</sup> RNA Purification Kit (Epicentre Biotechnology)を使用して、100万のイヌPBMCから抽出する。一本鎖cDNAを、製造業者の指示にしたがってFirst-Strand Synthesis System for RT-PCR kit (Invitrogen)を使用して、2μgの全RNAから合成する。コード領域を、配列番号：3および配列番号：4のプライマーで、大型細胞外ドメイン(ループ)を含むそれらのフラグメントを、配列番号：5および配列番号：6のプライマーで、PCRにより増幅する。サンプルを94℃で5分間変性、次に35サイクル(94℃ 30s、62℃ 20s、72℃ 45s)増幅し、PCR産物を配列決定する。

## 【0114】

50

イヌP B M C から単離されたイヌC D 2 0 のアミノ酸配列を、配列番号：1として記載する。

【0115】

I I . ネコC D 2 0 のクローニング

ネコC D 2 0 コード領域を、M i n i R N A I s o l a t i o n K i t (Zymo R esearch) を使用して、全血から分別した5 0 0 万のネコP B M C から単離する。一本鎖c D N Aを、製造業者の指示にしたがってF i r s t - S t r a n d S y n t h e s i s S y s t e m f o r R T - P C R k i t (Invitrogen) を使用して、2  $\mu$  gの全R N Aから合成する。次に、コード領域を、製造業者の指示にしたがってG o T a q G r e e n M a s t e r M i x を使用して、配列番号：3 および配列番号：7 のプライマーを使用するP C Rにより増幅する。サンプルを9 4 で5分間変性、次に3 5 サイクル(9 4 3 0 s、5 2 3 0 s、7 2 1分)増幅する。P C R 産物を配クローニングし、配列決定する。

【0116】

ネコP B M C から単離されたネコC D 2 0 のアミノ酸配列を、配列番号：2として記載する。

【0117】

実施例2 . C D 2 0 での免疫化およびイヌC D 2 0 に対するマウスモノクローナル抗体の产生

イヌC D 2 0 に対するモノクローナル抗体を产生するために、C H O - D G 4 4 (チャイニーズハムスター卵巣細胞、ジヒドロ葉酸レダクター欠失 A T C C C R L - 9 0 9 6 ) およびN I H : 3 T 3 (A T C C C R L - 1 6 5 8 ) を、全長イヌC D 2 0 タンパク質をコードする発現ベクターでトランスフェクトする。膜貫通受容体の天然構造が維持されるような、C D 2 0 含有マグネティック(Magnetic)プロテオリポソーム(Proteoliposome)粒子( M P L )を、免疫化およびパニングのために調製する。簡潔には、エピトープタグを含んだ組換えイヌC D 2 0 を、界面活性剤C H A P S O を使用してトランスフェクトC D 2 0 発現細胞系から可溶性にし、タンパク質を、エピトープタグを介して電磁ビーズ上に捕獲する。C D 2 0 の天然膜構造が維持されるように、界面活性剤の除去中に脂質膜を再構成し、C D 2 0 - M P L を創造する。

【0118】

抗C D 2 0 モノクローナル抗体を、マウスの免疫化により产生し、イヌC D 2 0 に対して特異的な免疫グロブリンをもたらす。イヌC D 2 0 を発現する洗浄されたC H O - D G 4 4 細胞(1 0 0  $\mu$  L中 $1 \times 1 0^7$  個の細胞)または1 0 0  $\mu$  LのC D 2 0 - M P L (1  $\times 1 0^9$  個のビーズ/ m L)を免疫原として使用する。マウスをR i b i アジュバント中の抗原で腹腔内に3回免疫化し、次に、連日で2回ブーストする。免疫応答は、眼窩後出血によりモニタリングされる。血清を、C D 2 0 発現細胞およびC D 2 0 - M P L (対未トランスフェクト親細胞)のF A C S 染色によりスクリーニングする。

【0119】

脾臓を、抗C D 2 0 免疫グロブリンの十分な力価でマウスから回収する。マウス抗体ライブラリーをマウスの脾臓細胞から調製し、次に、C D 2 0 に対する特異性を有する抗体の発現のために、ファージがスクリーニングされるようにファージ上に提示させる。この組合せアプローチは、一般的に、米国出願第6,092,098号(この内容を出典明示により本明細書に包含させる)に記載されている。

【0120】

ファージディスプレイライブラリーを、マグネティックプロテオリポソームに組み込まれたイヌC D 2 0 (C D 2 0 - M P L )で、パニングによりC D 2 0 に対する親和性を有するライブラリーメンバーに対してスクリーニングする。C D 2 0 - M P L におけるファージディスプレイライブラリーの3回のパニングは、バックグラウンドと比較して、数倍の濃縮のC D 2 0 - バインダーをもたらす。興味ある可変領域フラグメントをF a b 発現ベクターに再クローニングし、F a b をトランスフェクトC D 2 0 発現細胞に対する抗原

10

20

30

40

50

結合に関して再試験する。

【0121】

有効性を示すイヌCD20に対する高親和性を有する抗CD20抗体を、当分野で利用できる方法論を使用する一群のアッセイにおいて試験することにより同定する。

【0122】

新たに產生された抗CD20抗体の特異的結合を、CD20を発現する細胞でのFACSにより評価する。天然CD20に対する抗体の比較結合親和性を測定するために重要であるため、CD20を発現する生細胞をFACS分析において使用する。細胞結合アッセイにおいて、CD20を発現する細胞またはイヌリンパ腫細胞をリン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄し、ウェルに播種する。プレート表面への細胞付着を可能にするための室温で1時間後、細胞をFBSで洗浄し、プレート上の非特異的結合部位をブロックする。次に、抗-イヌCD20抗体を発現する細胞からの上清を加える。室温で1時間インキュベーション後、プレートをPBSで洗浄する。次に、二次抗体を加え、標準方法を使用して検出する。

【0123】

免疫組織化学(IHC)を、B細胞リンパ腫を有するイヌから回収されたリンパ節組織において行う。横断面を、製造業者の指示にしたがってIMPEREST試薬(Vector Laboratories)を使用して染色する。切片を40×対物レンズ下で評価し、コントロール組織と比較してポジティブまたはネガティブとしてスコアリングする。B細胞およびT細胞を、抗イヌCD21抗体(Serotec)および抗イヌCD3抗体(Serotec)各々を使用することにより同定する。新たに產生された抗-イヌCD20抗体はB細胞の強い染色を示し、それらのいくつかは膜の優勢な染色を示す。

【0124】

実施例3. ヘテロキメラ抗体

以下の実施例は、以下で説明されている配列および一般的なパターンを使用して、標準技術にしたがって構築されたヘテロキメラ抗体の一般的な表示を提供する。以下に記載されている実施例において、CDRは、Kabat命名法を使用して定義される。

【0125】

I. 抗体可変ドメイン

表1の説明は、別々の免疫グロブリンドメインの隣接する配列を示す、軽鎖(ADV1からADV10)および重鎖(ADV11からADV13)抗体に関するヘテロキメラ化の図表示である。さらなる抗体変異体を、ドナー種由来の可変領域を標的種由来の任意の定常ドメインと連結することにより構築する。

表1.

【表4】

A V D 1 :	FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 <sub>T-ラムダ</sub> -C <sub>T-ラムダ</sub>
A V D 2 :	FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 <sub>T-カッパ</sub> -C <sub>T-ラムダ</sub>
A V D 3 :	FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 <sub>T-ラムダ</sub> -C <sub>T-カッパ</sub>
A V D 4 :	FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 <sub>T-カッパ</sub> -C <sub>T-カッパ</sub>
A V D 5 :	FR1 <sub>T-ラムダ</sub> -CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C <sub>T-ラムダ</sub>
A V D 6 :	FR1 <sub>T-カッパ</sub> -CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C <sub>T-ラムダ</sub>
A V D 7 :	FR1 <sub>T-ラムダ</sub> -CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C <sub>T-カッパ</sub>
A V D 8 :	FR1 <sub>T-カッパ</sub> -CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C <sub>T-カッпа</sub>
A V D 9 :	FR1 <sub>T-ラムダ</sub> -CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 <sub>T-ラムダ</sub> -C <sub>T-ラムダ</sub>
A V D 1 O :	FR1 <sub>T-カッパ</sub> -CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 <sub>T-カッпа</sub> -C <sub>T-カッпа</sub>
A V D 1 1 :	FR1-T-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 <sub>T</sub> -C <sub>T</sub>
A V D 1 2 :	FR1 <sub>T</sub> -CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4-C <sub>T</sub>
A V D 1 3 :	FR1 <sub>T</sub> -CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 <sub>T</sub> -C <sub>T</sub>

A V D = 抗体可変ドメイン； T = 標的種； ラムダ = ラムダ軽鎖； カッパ = カッパ軽鎖； C = 定常ドメイン； F R = フレームワーク領域； C D R = 相補性決定領域。

## 【0126】

## I I . フレームワーク配列

軽鎖および重鎖ヘテロキメラ抗体を構築するために供給源として使用される典型的なフレームワーク配列は、一般的に、米国シリアルナンバー 12 / 584, 390 および PCT / U S 2009 / 04997 (これらの出願を出典明示により本明細書に包含させる) に記載されている。

## 【0127】

## I I I . 定常ドメイン配列

抗体変異体および / またはそのフラグメントを構築するために供給源として使用される典型的な定常ドメイン配列は、一般的に、国際公開 WO 2010 / 110838 (この内容を出典明示により本明細書に包含させる) に記載されている。

## 【0128】

## 実施例4 . 抗体変異体の構築、発現および精製

抗 C D 2 0 モノクローナル抗体は、非イヌ哺乳動物において産生され、反復投与のために適当ではない。抗体変異体は、標的種由来の配列を含むように産生される。次に、抗体変異体を特性の一団について試験する。

## 【0129】

## I . マウス抗イヌ C D 2 0 抗体由来の抗体変異体

マウス抗イヌ C D 2 0 抗体を、実施例3に記載されるとおりに修飾する。可変領域を合成オリゴヌクレオチドをアセンブリー (assemble) することにより調製し、可変ドメインの 5' - および 3' - 末端のそれぞれにおいて側面に位置する制限酵素認識部位として Hind III および Nhe I を有する pSMART にクローニングする。次に、アセンブリーさせた産物をプロモーターおよび重鎖定常ドメインを含むか、またはラムダ軽鎖定常ドメインを含む発現ベクターにサブクローニングする。全発現カセットは、得られる抗体産物を分泌経路に向かわせるために、コード配列のすぐ上流および軽鎖および重鎖の両方の可変領域とインフレームにおいて、ヒトサイトメガロウイルス前初期 (CMV) プロモーター、k o z a k 配列およびシグナルペプチド配列を含む。ベクターはまた、ラムダイヌ軽鎖定常ドメインおよびイヌ重鎖定常ドメインも含む。

## 【0130】

## I I . 抗体変異体の発現、精製および定量

これらのプラスミドを、化学的コンピテント大腸菌細胞 (Lucigen) の大腸菌に形質転

10

20

30

40

50

換し、Luria Broth (LB) 培地で培養し、グリセロール中で貯蔵する。大規模プラスミドDNAを、製造業者 (Zymo Research Corp.) により記載されているとおりに調製する。抗体変異体を、無血清条件下でヒト胚腎臓細胞系293F (Invitrogen)において一時的に発現させる。重鎖 (VET200 series) および軽鎖 (VET100 series) 発現ベクターを、293fection (Invitrogen) を使用して共トランスフェクトし、293F-Freestyle 培養培地 (Invitrogen) で培養する。トランスフェクト293培養物は、約5-20mg/Lの組換え抗体を発現した。結合アッセイを上清または上清から精製された組換え抗体で行う。

【0131】

抗体力価を定量ELISAを使用して決定する。プレートを、37で1時間、炭酸塩バッファー (100mMのNaHCO<sub>3</sub>、33.6mMのNa<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>、pH9.5) で1:100希釈されたウサギ抗イヌIgG (H+L) 抗体 (Jackson Immuno-Research) で100μL/ウェルでコーティングする。プレートをTBS-T (50mMのTris、0.14MのNaCl、0.05%のTween-20、pH8.0) で3回洗浄し、200μL/ウェルのTBSBSA (50mMのTris、0.14MのNaCl、1%のBSA、pH8.0) で37で1時間ブロックする。標準を、0から500ng/mlの濃度範囲にTBS-T/BSA (TBS-T、1%のBSA) で参照抗体 (Jackson Immuno-Research, Dog Gamma Globulin 10.0mg) を希釈することにより調製する。プレートをTBS-Tで2回洗浄後、標準/サンプル調製物をそれぞれのウェルに加え、37で1時間インキュベートする。次に、プレートをTBS-Tで3回洗浄し、TBS-T/BSAで1:20,000希釈されたHRP-ウサギ抗イヌIgG 抗体 (Perodixase Rabbit Anti-Dog IgG (H+L) Jackson Immuno-Research) と37で1時間インキュベートする。プレートをTBS-Tで2回洗浄し、100μL/ウェルのTMB基質を使用して開発する。反応を1MのH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>で停止し、ODを450nmで測定する。標準曲線を4つのパラメーター等式を使用して合わせ、サンプル中の抗体濃度を計算するために使用する。

【0132】

抗体を、タンパク質Aアフィニティクロマトグラフィーを使用して培養上清から精製する。上清をBinding Buffer (Pierce) で1:1希釈し、重力流カラム (GE Healthcare) を通し、20樹脂床(resin-bed)容量のBinding Bufferで平衡にする。カラム上で保持された抗体を15mlの結合バッファーで洗浄し、低pH溶離バッファー (Pierce) で溶離し、100μLのBinding Bufferを含む1mlの画分に回収し、pHを中和する。吸光度 (280nm) > 0.1の画分を脱塩カラム (Pierce) を使用して脱塩する。

【0133】

I II . 抗イヌCD20抗体変異体配列

単離された抗体および抗体変異体のアミノ酸配列を、配列番号：17から配列番号：43として挙げる。

【0134】

I V . 抗イヌCD20抗体変異体配列の名称

表2は、種々のベクターの名称および部分を要約している。

表2

【表5】

名称	可変ドメイン	定常ドメイン
VET124	VET121	VET101
VET133	VET132	VET101
VET135	VET134	VET101
VET237	VET235	VET201
VET257	VET256	VET201
VET258	VET256	VET205
VET260	VET259	VET201

10

## 【0135】

実施例4. 細胞に対する抗体変異体の結合

I. C D 2 0 に対する抗体変異体はイヌP B M Cに結合する

本実施例において、抗体変異体をC D 2 0陽性細胞とインキュベートし、結合した抗体の量を、蛍光標識レポーター試薬にて以下のインキュベーションで評価する。該レポーターは、その後、F A C Sにより測定される。

20

## 【0136】

簡潔には、それぞれのアッセイにおいて、標準技術により正常イヌ由来の全血から単離された100万個の末梢血単核細胞(P B M C)を、F A C Sバッファー(P B S + 2%のF B S)に再懸濁した。2 μgの一次抗体を細胞に加え、サンプルを4℃で1時間インキュベートした。一次抗体は、組換え抗体構築物でトランスフェクトされた細胞または精製された抗体調製物からの上清として提供される。B-リンパ球を認識するマウス抗イヌC D 2 1 m A b(Serotec)をコントロールとして細胞に加え、所定のサンプル中のB-リンパ球のパーセントを概算する。1 m lのF A C Sバッファーを加え、細胞をエッペンドルフ微量遠心管で800×gで3分間スピンする。細胞を1 m lのF A C Sバッファーで洗浄し、再びスピンする。二次抗体、例えば、フルオレセイン-イソチオシアネート(F I T C)結合ヤギ抗マウスカッパ(mF I T C, Jackson ImmunoResearch)またはF I T C結合ヤギ抗イヌI g G(H+L)(dF I T C, Bethyl Laboratories)を、適当なチューブに1%のB S Aを補った100 μLのF A C Sバッファー中に加え、チューブを4℃で30分間インキュベートした。洗浄工程を繰り返す。次に、細胞を500 μLのF A C Sバッファーに再懸濁し、12×75 m mのポリスチレン試験チューブに移す。細胞を、C e 1 1 Q u e s tソフトウェア(Becton-Dickenson)を使用するF a c S c a nサイトメトリーでF A C Sにより分析する。分析ゲートを、典型的な順方向および側面散乱特性に基づいて、生リンパ球集団にセットする。いくつかのコントロールを、バックグラウンド蛍光を決定するために利用する：(i) 1つのチューブの細胞を一次抗体なしでF I T C結合二次抗体とインキュベートする、および(ii) 1つのチューブの細胞をP B Sのみとインキュベートする。

30

## 【0137】

典型的な染色プロフィールを表3に報告している。このサンプル中のB細胞サブセットの全パーセントは、抗イヌC D 2 1 m a bコントロールの結合に基づいて約12%であると概算される。表3の結果は、リンパ球への抗体変異体の有効な結合を証明する。

40

表3. イヌP B M Cへの抗体変異体の結合

## 【表6】

	リンパ球 %	平均蛍光	
PBMC	0.37	31.56	
PBMC + dFITC	0.47	43.86	
PBMC + VET 133 X VET 257 + dFITC	12.03	3165.67	
PBMC + VET 135 X VET 257 + dFITC	8.33	2499.17	
PBMC + VET 133 X VET 260 + dFITC	13.73	2906.29	10
PBMC + VET 135 X VET 260 + dFITC	12.72	2659.34	
PBMC + VET 124 X VET 237 + dFITC	13.00	2656.60	

## 【0138】

I I . C D 2 0 に対する抗体変異体はネコ C D 2 0 を発現する細胞に結合する

イヌ C D 2 0 に対する本発明の抗体変異体の結合は、標準免疫学的技術 ( Veterinary Immunology and Immunopathology 2005, 106:179-196; Brousseau ら Manual of Immunology Methods, CRC Press, 1998 参照 ) にしたがって、ネコ C D 2 0 への結合について F A C S 分析により評価することができる。

## 【0139】

本実施例において、抗体変異体 ( 2 . 5  $\mu$  g / m L ) を組換えネコ C D 2 0 またはイヌ C D 2 0 またはコントロール細胞を発現する哺乳動物細胞とインキュベートする。結合された抗体の量を、蛍光標識レポーター抗体試薬での検出により評価する。いくつかのコントロールを、バックグラウンド蛍光を決定するために利用する： ( i ) C D 2 0 発現細胞をアイソタイプ抗体と結合した二次抗体とインキュベートする、および ( i i ) コントロール細胞を抗 C D 2 0 抗体とインキュベートする。

## 【0140】

典型的な結合プロフィールを表 4 に報告している。平均蛍光単位として報告された結果は、H E K 細胞において発現された組換えイヌ C D 2 0 に対する抗体 C D 2 0 - 2 、 C D 2 0 - 5 および C D 2 0 - 6 の有効な結合を証明する。 C D 2 0 - 2 および C D 2 0 - 5 抗体のみが、哺乳動物細胞において発現されたネコ C D 2 0 に結合する。

## 表4

## 【表7】

Mab	イヌ	ネコ	コントロール	
	CD20	CD20	Cells	
CD20-2	2340	2209	49	
CD20-5	2769	2048	215	40
CD20-6	2107	60	4	
アイソタイプ	55	50	14	

## 【0141】

I I I . 抗 C D 2 0 抗体変異体は、腫瘍細胞の増殖を改変する

本発明の抗体変異体を、リンパ腫細胞の増殖を改変する能力について試験した。

## 【0142】

10

20

30

40

50

リンパ腫細胞を、5%の二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)中で37℃でFBS10%を有する RPMI培地において増殖させる。細胞を、5%のFBSを有する培地における96-ウェルプレートにおいて5,000細胞/ウェルで播種する。細胞を抗体変異体およびアイソタイプコントロール(10μg/mL)で処理し、37℃で72時間CO<sub>2</sub>インキュベーター下でインキュベートする。10μLのMTT溶液をそれぞれのウェルに加え、製造業者の指示にしたがって(Trevigen)、37℃で4時間インキュベートする。次に、光学濃度(OD)を490nmで測定し、データを、トリプリケート測定の細胞増殖の減少パーセントとして示す。表5におけるデータは、抗体変異体がリンパ腫細胞に対する抗増殖効果を有することを説明する。さらに、抗体変異体は、リンパ腫細胞系を、ペットに対する癌の処置において一般的に使用される細胞毒性薬物であるドキソルビシンに感受性にする。

10

表5. リンパ腫細胞の増殖に対する抗体変異体の効果

【表8】

Mabs (10 μg/mL)	ドキソルビシン		
	0 nM	6.6 nM	66 nM
アイソタイプコントロール	-0.30	12.20	38.69
VET 133 X VET 257	59.82	65.77	76.79
VET 135 X VET 260	40.48	58.63	64.88

【0143】

本発明の抗体変異体を、リンパ腫細胞の増殖を改変する能力についてさらに試験する。細胞アッセイを、上記実施例において記載されているとおりに実施する。データを、トリプリケート測定の細胞増殖の減少パーセントとして表6に示す。データは、種々のアフィニティーで10μg/mLの濃度での抗体変異体がリンパ腫細胞に対する種々のレベルの抗増殖効果を示すことを説明する。

30

表6. リンパ腫細胞の増殖に対する抗体変異体の効果

【表9】

Mabs	減少(%)	KD(nM)
CD20-2 (VET305)	55.0	8.845
CD20-3	22.4	76.28
CD20-4	17.5	77.37
CD20-5 (VET308)	60.1	1.21
CD20-6 (VET309)	27.6	63.41

【0144】

## IV. 抗CD20抗体変異体のアフィニティーおよびエピトープ

本発明の抗体変異体を、イヌCD20に対する結合親和性について比較する。結合親和性は、上記FACS分析により、CHO細胞において発現された組換えイヌCD20に対する結合を測定することにより評価される。アフィニティーは、抗-イヌCD20抗体、CD20-1、CD20-2、CD20-3、CD20-4、CD20-5およびCD20-6に対して、各々1.0nM、8.845nM、76.28nM、77.37nM、

50

1.2 nM、63.41 nMである。

【0145】

標準技術を使用して競合実験を行う。簡潔には、ビオチン化組換え抗イヌCD20抗体を、組換えイヌCD20を発現するCHO細胞に対して滴定する。最初に、細胞を過剰の非標識組換え抗イヌCD20抗体(25 µg/mL)とインキュベートする。その後、細胞を2 µg/mLでビオチン標識された抗体とインキュベートする。洗浄後、細胞をストレプトアビジン-フィコエリトリンとインキュベートし、蛍光をフローサイトメトリーにより分析する。無関係な抗体を阻害に対するネガティブコントロールとして使用する。結果は、非標識抗体で前インキュベートした細胞の蛍光強度とそれぞれのビオチン化抗体単独に対して得られた蛍光強度間の比として示す。阻害パーセント(P.I.)は、以下の式により計算する:  $P.I. = [1 - (実験値 - バックグラウンド値) / ビオチン化抗体単独 - バックグラウンド] \times 100\%$ 。

【0146】

表7において報告された結果は、抗体CD20-1、CD20-3およびCD20-6がイヌCD20の異なるエピトープを認識することを証明する。

表7. 組換えイヌCD20を発現するCHO細胞を使用する抗CD20抗体変異体のエピトープマッピング

【表10】

競合 mab	標識された抗体 (2 µg/mL)		
	CD20-1	CD20-2	CD20-5
CD20-1	111.65	-22.08	87.68
CD20-2	0.90	124.33	3.69
CD20-5	107.07	6.47	85.88
CD20-6	6.03	1.41	5.99

【0147】

V. 抗CD20を生産する細胞系の創造

抗イヌCD20抗体CD20-2およびCD20-5の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子の両方を有するベクターを、対応する組換え抗体を発現する細胞系を創造するために、哺乳動物細胞に導入する。本実施例において、PER.C6細胞を哺乳動物細胞として使用する。細胞を、3.0 mMのグルタミン(Invitrogen, Gibco, Cat No. 25030-081)を補った化学的に定義された無タンパク質培地CDM4P e r M a b (Hyclone, Thermo-Scientific, Cat No. SH30871.02)中で培養する。4代継代解凍後、PER.C6細胞を、標準技術を使用して直線化ベクターDNAでのエレクトロポレーションによりトランスフェクトする。ベクターを安定に組み込んでいる細胞を、96ウェルプレート中でウェルあたり0.3細胞の播種密度での限定希釈により、125.0 µg/mLのGeneticin(Invitrogen, Cat No. 11811-023)の存在下での生存により選択する。コロニーが見えるようになったとき、最初に、単一のウェルからの単一のクローンを力価および標的に対する結合について測定し、次に、より大きなウェルにスケールアップする。選択されたクローンを、大規模培養において、抗体力価、CD20発現細胞への結合、細胞が2倍になる時間、細胞生存能力および細胞安定性についてさらに評価する。最適な特性を有するクローンを、7.5 ± 0.5%のジメチルスルホキシド(Sigma, Cat No. D2650)を補った培養培地中で冷凍する。

【0148】

VII. 組換え抗イヌCD20の半減期

組換え抗イヌCD20抗体の半減期を評価する。本実施例において、抗体CD20-2

10

20

30

40

50

(VET305) の半減期を、ビーグル犬に静脈内に投与することにより評価する。血液を、抗凝固剤としてエチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) で処理された全血として回収された血漿サンプル中の CD20-2 の分析のために回収する。酵素結合免疫測定アッセイ (ELISA) を、血漿抗体濃度を決定するために利用する。このアッセイにおいて、96 ウェルプレートを、抗体 CD20-2 の可変ドメインに対するウサギポリクローナル抗体でコーティングする。標準またはサンプル中の抗体 CD20-2 をポリクローナル抗体により捕獲し、酵素結合抗イヌ二次抗体により検出する。標準の非線形回帰フィットを、血漿中の組換え抗体濃度を決定するために使用する。

【0149】

2.4 mg / kg の抗体 CD20-2 の単回投与は、高い血漿抗体濃度が全ての動物においてなじ遂げられ、その除去半減期が 5.6 から 6.7 時間の範囲であることを示す。2.0 から 5.0 mg / kg の範囲である抗体 CD20-2 の複数回投与は、血漿抗体濃度が時間とともに増加し、1 週間以上の除去半減期および血漿容量に近似する分布容量で、処置の合間に有意なレベルで持続することを示す。

【0150】

興味深いことに、抗体 CD20-2 の半減期値は、連続投与後に増加する。半減期値は、標的細胞の数により影響され、所定の時点での B リンパ球プールのサイズに依存する。CD20 への結合およびリンパ球細胞の最終的溶解によって、抗体の B 細胞枯渇効果は半減期値の増加を説明することができる。

【0151】

VII. インビボでの B 細胞の枯渇

3 匹のビーグル犬に、5 日毎に 2.0 mg / kg から 5.0 mg / kg の範囲である抗体 CD20-2 (VET305) の 3 連続投与を与える。いくつかの時点で採取した血液サンプルを 2000 RPM で 5 分間遠心する。血漿を、抗体レベルのアッセイのために除去する。末梢血白血球および赤血球を含むペレットを、フローサイトメトリーによるリンパ球集団の定量のために、血漿と同等の容量のリン酸塩水 (Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline, Mediatech, Cat No. 21-030-CM) に再懸濁する。0.1 mL 容量の細胞調製物を、微量遠心管に分配する。イヌリンパ球表面マーカー CD21 に対する特異性を有する標識化モノクローナル抗体をバイアルに加え、B リンパ球細胞集団を同定する。自己蛍光の決定のために、試薬を加えないさらなるサンプルが含まれる。細胞を蛍光抗体と 30 分間インキュベートする。次に、赤血球を溶解バッファー (Red Blood Cell Lysis Buffer, Biolegend, Cat No. 420301) を使用して 15 分間で溶解し、次に洗浄し、Becton Dickinson FACS 装置にて分析する。

【0152】

興味深いことに、2.4 mg / kg の抗体 CD20-2 の単回投与は、投与前の 3.6 から 9.5 % の範囲である迅速かつ持続的 B 細胞枯渇を引き起す。2.4 mg / kg から 5.0 mg / kg の抗体 CD20-2 の 3 連続投与は、全ての試験された投与範囲にわたって処置後に B リンパ球細胞パーセントの減少を示し、枯渇が最後の投与後少なくとも 10 日間維持される。

【0153】

4 週間にわたる抗体 CD20-2 の週 1 回の投与は、局所的および全身的に耐容性が良く、臨床および行動観察または体重において副作用が見られない。

【0154】

実施例 5. 抗 CD20 抗体変異体での処置

I. イヌの処置

免疫状態、例えば、リンパ腫、再発性リンパ腫、白血病、肥満細胞腫瘍、溶血性貧血、関節炎、アトピー性皮膚炎と診断されたイヌに、抗 CD20 モノクローナル抗体での治療を与える。イヌに 1 - 5 mg / kg の抗体を静脈内または皮下に注入し、最初の処置後、処置を週に 1 回、4 - 8 週間繰り返す。最後の投与から 2 月後、患者は CD20 を発現する細胞の特定の型の減少したレベルを示す。次に、イヌを、8 - 12 週間毎に抗 CD2

10

20

30

40

50

0 抗体の投与での維持レジメン下で処置する。イヌは静脈内に、皮下に、筋肉内に、または腹腔内に注入され得ることが考慮される。イヌは 1 . 0 、 1 . 5 、 2 . 0 、 2 . 5 、 3 . 0 、 3 . 5 、 4 . 0 、 4 . 5 または 5 m g / k g の抗体で投与され得ることが考慮される。イヌは 1 m g / k g 体重より小さい用量で抗体を投与され得ることが考慮される。

#### 【 0 1 5 5 】

##### I I . 関節炎の処置

関節炎と確認されたイヌに、最初の 4 週間、週に 2 から 3 回、 1 m g / k g の抗 C D 2 0 抗体処置単独で、またはケアの標準処置と組み合わせて与える。処置に対する臨床反応を、試験エンドポイントでの改善について評価する。改善は以下の 1 つとして定義される : ( i ) 歩きまたは小走りでの跛行スコアにおける少なくとも 1 グレードの減少、および / または ( i i ) 触診もしくは操作における痛み、関節動作範囲および関節腫脹に対するスコアにおける少なくとも 2 グレードの複合減少。全体的跛行、触診もしくは操作における痛み、可動域および関節腫脹は、予定時間で観察し、以下のとおりにスコアリングする : ( i ) 全体的跛行スコアリング ( 歩きおよび小走りでスコアリングされる ) [ 0 = 跛行なし、 1 = 軽度の跛行 ( 全ての歩様で床につま先がタッチするイヌ ) 、 2 = 中程度の跛行 ( 全ての歩様で床につま先がタッチするイヌ ) 、 3 = 重度の跛行 ( 歩様の少なくとも 50 % で床につま先がタッチするイヌ ) 、 4 = 体重負荷の跛行なし ( 歩様の 50 % 未満で床につま先がタッチするイヌ ) ] ; ( i i ) 触診 / 操作における痛み ( 非常に大きく影響した肢 ) [ 0 = 痛みなし、または当てはまらない、 1 = わずかに痛み ( ほとんど引っ込めない肢 ) 、 2 = 中程度に痛み ( 限定的に引っめる肢 ) 、 3 = 重度に痛み ( 顕著に引っめる肢 ) ] ; ( i i i ) 可動域 ( 非常に大きく影響した肢 ) [ 0 = 正常可動域、 1 = わずかに減少 ( 範囲内で 25 % 未満の減少 ) 、 2 = 中程度の減少 ( 範囲内で 25 % から 50 % の減少 ) 、 3 = 重度の減少 ( 範囲内で 50 % 以上の減少 ) ] ; ならびに ( i v ) 関節腫脹 ( 非常に大きく影響した肢 ) [ 0 = 腫脹なし、または当てはまらない、 1 = 軽度の腫脹 ( 線維症または軽度の触診できる液体性膨張 ) 、 2 = 中程度の腫脹 ( 明白な触診できる中心が柔らかい液体性膨張 ) 、 3 = 重度の腫脹 ( 著しい触診できる中心が柔らかい液体性膨張 ) ] 。最後の投与の 2 月後、患者は全体的改善を示す。次に、イヌを 8 - 1 2 週毎に抗 C D 2 0 抗体の投与で維持レジメン下で処置する。

#### 【 0 1 5 6 】

##### I I I . ネコの処置

免疫状態、例えば、リンパ腫、再発性リンパ腫、白血病、肥満細胞腫瘍、溶血性貧血、関節炎、アトピー性皮膚炎と診断されたネコに、抗 C D 2 0 モノクローナル抗体での治療を与える。ネコに 1 - 5 m g / k g の抗体を静脈内または皮下に注入し、最初の処置後、処置を週に 1 回、 4 - 8 週間繰り返す。最後の投与から 2 月後、患者は C D 2 0 を発現する細胞の特定の型の減少したレベルを示す。次に、ネコを、 8 - 1 2 週間毎に抗 C D 2 0 抗体の投与での維持レジメン下で処置する。ネコは静脈内に、皮下に、筋肉内に、または腹腔内に注入され得ることが考慮される。ネコは 1 . 0 、 1 . 5 、 2 . 0 、 2 . 5 、 3 . 0 、 3 . 5 、 4 . 0 、 4 . 5 または 5 m g / k g の抗体で投与され得ることが考慮される。ネコは 1 m g / k g 体重より小さい用量で抗体を投与され得ることが考慮される。

#### 【 0 1 5 7 】

提供される実施例の代替的組合せおよび変化は、本明細書の記載に基づいて明らかである。記載されている態様の多数の可能な組合せおよび変化の全てに対して特定の実施例を提供することが不可能であるが、かかる組合せおよび変化は、やはり、本発明の範囲内であることが意図される。

#### 【 0 1 5 8 】

##### 配列表

【表 11】

配列番号	配列	
配列番号 .1	MTTPRNSMSGTLPVDPMSPTAMYPVQKIIIPKRMPSVVGPTQNNFRESKTLGAVQIMNGLFIALGSLIMIHTDVYAPICITMWYPLWGGIMFIISGSLLAAADKNPRKSLVKGKIMNSLSEAIISGIIIFLIMIDFNITISHFFKMEMLNLIKAPMPYVDIHNCDPANPSEKNSLSIQYCGSIRSFLGVFAVMVIFTFFQKLVTAGIVENEWKKLCSPKSDVVVLLAAEKKQPIETTEEMVELTIASQPKKEEDIEIIIPVQEEEEEELEINFAEPPQEQQESSPIENDSIP	
配列番号 .2	MTTPRNSMSGTLPADAMKSPTAMNPVQKIIIPKRMPSVVGPTQNNFRESKPLGAVQIMNGLFMAILGGLLMIHMEVYAPICMTVWYPLWGGIMYIISGSLLVAAEKNPRKSLVKGKIMNSLSEAIISGMILLIMIDFNIAISHFFKMEMLNLLKSPKPYIDIHTCQPEKSEKNSLSIKYCDSSIRVFLSIFAVMVVFQLVTAGIVENEWKKLCSPKADVVVLLAAEKKQPLVEITEEAVLEVSSQPKNEEDIEIIIPVQEEEEEEETEMNFPEPPQDQEPEPSLIENDSIP	10
配列番号 .3	5'-TGAGATGACAACACCCAGAAA-3'	
配列番号 .4	5'-TTAAGGGATGCTGTCGTTTC-3'	
配列番号 .5	5'-AATATTACCATTTCCCATTTTTA-3'	
配列番号 .6	5'-TATGCTGCCACAATATTGTATAG-3'	
配列番号 .7	5'-GGATCCTAAGGAATGCTATCGTTT-3'	
配列番号 :8	ASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSILQSSGISLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVKECECKCNCNNCPGCGLLGGPSVIFPPPKDILVTARTPTVTCVVVDLDPENPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYRVVSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIEEIIISKTPGQAHQPNVYVLPPSRDEMSKNTVTLTCVKDFFPPEIDVEWQSNGQQEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICAVAEALHNHYTQKSLSHSPGK	20
配列番号 :9	ASTTAPSVFPLAPSCGSQSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGISLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPFIFPPPKDILLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSCLIKDFFPIDDVEWQSNGQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICMHEALHNHYTQKSLSHSPGK	
配列番号 :10	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGISLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPFIFPPPKDILLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSCLIKDFFPIDDVEWQSNGQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICMHEALHNHYTQKSLSHSPGK	
配列番号 :11	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSGISLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPFIFPPPKDILLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRSVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSCLIKDFFPIDDVEWQSNGQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICMHEALHNHYTQKSLSHSPGK	30
配列番号 :12	ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVSWNSGSLTSGVHTFPSVLQSSG	

【表 1 2 】

	SLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPVRPPDCPKCPAPEMLGGPSV FIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVLDPEDPEVQISWFVFDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRV SVLPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSL CLIKDFFPPDIDVEWOSNGQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICA MHEALHNHYTQKSLSHSPKG	
配列番号 :13	ASTTAPSVPFLAPSCGSQGSTVALACLVSGYIPEPVTVWSNNSGSLTSGVHTFPSILQSSGL SLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPATNTKVDKPVVKECECKCNCNCPCPGCGLLGGPSV FPPPKPKDILVTTARTPTVTCVVVLDLPENPEVQISWFVFDGKQMQTAKTQPREEQFNGTYRV LPIGHQDWLKGKQFTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSL IKDFFPPDIDVEWQSNGQQEPESKYRTTPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICA ESLHNHYTQKSLSHSPKG	10
配列番号 :14	ASTTAPSVPFLAPSCGSTSGSTVALACLVSGYFPEPVTVWSNNSGSLTSGVHTYPSVLQSSGL SLSSMVTVPSSRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVPVRPPGCPKCPAPEMLGGPS FIFPPKPKDTLLIARTPEVTCVVVLDLPEDPEVQISWFVDSKQVQTANTQPREEQSNGTYRV SVLPIGHQDWLSGKQFKCKVNNKALPSPPIEEIIISKTPGQAHQPNVYVLPPSRDEMSKNTVTL CLVKDFFPPEIDVEWQSNGQQEPESKYRMTPPQLDEDGSYFLYSKLSVDKSRWQRGDTFICA MHEALHNHYTQKSLSHSPKG	
配列番号 :15	NDAQPAVYLFPSPDQLHTGSASVVCLNSFYPKDINVWKVVDGVIQDTGIQESVTEQDKDS YSLSSSTLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSFQRSECQRVD	
配列番号 :16	GQPKASPSVTLFPPSSEELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKADGSPITQGVETTKPSKQS NKYAASSYLSLTSDKWKSNSFCLVTHEGSTVVEKKVAPAEC	
配列番号 .17	EIQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGKIGPGSGRTYYNE FKGKATLTADKSSSTAYIQISSLTSEDSAVYFCAVLSWGQGTLTVSS	
配列番号 .18	EIQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGKIGPGSGRTYYNE FKGKATLTADKSSSTAYIQISSLTSEDSAVYFCAVLSWGQGTLTVSS	20
配列番号 .19	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGKIGPGSGRTYYNE FKGKATLTADKSSSTAYIQISSLTSEDSAVYFCAVLSWGQGTLTVSS	
配列番号 .20	DVQITQTPLTLSVTFGQPASISCKSSQSLLKSDGRTYLNWLLQRPGQSPKRLLYLVSKLDS PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKEIK	
配列番号 .21	DVQITQTPLTLSVTFGQPASISCKSSQSLLKSDGRTYLNWLLQRPGQSPKRLLYLVSKLDS PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTHTLTVL	
配列番号 .22	QSVLTQPASVSGSLGQRVTISCKSSQSLLKSDGRTYLNWLLQRPGQSPKRLLYLVSKLDS DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTHTLTVL	
配列番号 .23	QVQLQQSRAELVRPGASVTLSCPKPSGYTFTDYEVHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGTADN FKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTNFVDWGTGTTVSS	
配列番号 .24	DVVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNLYAWYQQKPGQSPRLIYWASTRE VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVFYCQQYYNPLTFGAGTKLELK	
配列番号 .25	DVVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSGNQKNLYAWYQQKPGQSPRLIYWASTRE VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVFYCQQYYNPLTFGAGTKLELK	30
配列番号 .26	DIVTSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNLYAWYQQKPGQSPKLIIYWASTRE VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVFYCQQYYNPLTFGAGTKLELK	
配列番号 .27	EVQLQQSVAELVRPGASVTLSCPKASGYTFTDYEYEMHWVKQTPVHGLEWIGEIDPETGGTAYN FKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTEYAMDYWGQGTLTVSS	
配列番号 .28	DIVTSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSSNQKNLYAWYQQKPGQSPKLIIYWASTRE VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVFYCQQYYNPLTFGAGTKLELK	
配列番号 .29	EVQLQQSVAELVRPGASVTLSCPKASGYTFTDYEYEMHWVKQTPVHGLEWIGEIDPETGGTAYN FKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTEYAMDYWGQGTSVTVSS	
配列番号 .30	RVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGKIGPRSGSIYYN FKGKATLTADKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYFCAVLKWGQGTLTVSS	
配列番号 .31	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWVKQRPGQGLEWIGKIGPRSGSIYYN FKGKATLTADKSSSTAYMQLRSLTSEDSAVYFCAVLKWGQGTLTVSS	
配列番号 .32	DAVMTQIPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLLIYLVSKLDS PDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTKEIK	40
配列番号 .33	DAVMTQIPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLLIYLVSKLDS	

【表 1 3】

配列番号 .34	PDRFTGSGSGTDFTLKRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTHLTVL EIQLQQSGAELVRPGASVTLSCASKASGYFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGGTAYNQ FKGKAILTADKSSSTVYMEMLRSLTSEDAVYYCTRDYGTSGYWGQGTLTVSS
配列番号 .35	EIQLQQSGAELVRPGASVTLSCASKASGYFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGGTAYNQ FKGKAILTADKSSSTVYMEMLRSLTSEDAVYYCTRDYGTSGYWGQGTLTVSS
配列番号 .36	DVVVTQTPLSLPVSFGDQVSISCRSSQSLANSYGNNTYLSWYLHKPGQSPQQLIYGISNRFSG PDRFTGSGSGTDFTLKRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKEIK
配列番号 .37	DVVVTQTPLSLPVSFGDQVSISCRSSQSLANSYGNNTYLSWYLHKPGQSPQQLIYGISNRFSG PDRFTGSGSGTDFTLKRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTKEIK
配列番号 .38	QVQLQQSRAELVRPGASVTLSCASKASGYFTDYEVHWVKQTPVHGLEWIGAIDPETGGTADNQ FKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDAVYYCTNFVDVWGTGTTVSSASTTAPSVFPLA SCGSQSGSTVALACLVSGYFPEPVTVWSNSGSLTSGVHTFPSVQLSSGGLYSLSSMVTVPSSR PSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPSVIFPPPKPKDTLL ARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMOTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLK KQFTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIE EWQSNQOQEPESKYRTTPQQLDEDGSYFLYSKLSVDSRWRQGDTFICAVMHEALHNHYTQK LSHSPKG
配列番号 .39	DVVMQSPPSLLAVSGEKGVTMSCKSSQSLLYSGNQKNYLAWYQQKPGQSPRLLIYWA VPDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVFYCQOQYYNPLTFGGGTHLTVLGQPKASPSVTLF PSSEELGANKATLVLCLISDFYPSGTVAWKADGSPITQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLT DKWKSNSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAEC
配列番号 .40	QVQLQQSRAELVRPGASVTLSCASKASGYFTDYINWVKQRPQGLEWIGKIGPRSGSIYNY FKGKATLTADKSSSTAYMQLRSLTSEDAVYYFCAVLKWGQGTLTVSSASTTAPSVFPLA GSQSGSTVALACLVSGYFPEPVTVWSNSGSLTSGVHTFPSVQLSSGGLYSLSSMVTVPSSR ETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPSVIFPPPKPKDTLL TPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMOTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQDWLK FTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFFPPDIDV QSNQOQEPESKYRTTPQQLDEDGSYFLYSKLSVDSRWRQGDTFICAVMHEALHNHYTQK HSPKG
配列番号 .41	DAVMTQIPLTSVТИQPAISCKSSQSLHSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLIYLVSKLDSC PDRFTGSGSGTDFTLKRVEAEDLGVYYCWQGTHFPQTFGGGTHLTVLGQPKASPSVTLF SSSEELGANKATLVLCLISDFYPSGTVAWKADGSPITQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLT KWKSHSSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAEC
配列番号 .42	EIQLQQSRAELVRPGASVTLSCASKASGYFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGGTAYN FKGKAILTADKSSSTVYMEMLRSLTSEDAVYYCTRDYGTSGYWGQGTLTVSSASTTAPS LAPSCGSQSGSTVALACLVSGYFPEPVTVWSNSGSLTSGVHTFPSVQLSSGGLYSLSSMVT SRWPSETFTCNVAHPASKTKVDKPVPKRENGRVRPPDCPKCPAPEMLGGPSVIFPPPK LLIARTPEVTCVVVDLDPEDPEVQISWFVDGKQMOTAKTQPREEQFNGTYRVVSVLPIGHQ LKGKQFTCKVNNKALPSPPIERTISKARGQAHQPSVYVLPPSREELSKNTVSLTCLIKDFF IDVEWQSNQOQEPESKYRTTPQQLDEDGSYFLYSKLSVDSRWRQGDTFICAVMHEALHN OKSLSHSPKG
配列番号 .43	DVVVTQTPLSLPVSFGDQVSISCRSSQSLANSYGNNTYLSWYLHKPGQSPQQLIYGISNRF PDRFTGSGSGTDFTLKRVEAEDLGVYFCSQSTHVPWTFGGGTHLTVLGQPKASPSVTLF SSSEELGANKATLVLCLISDFYPSGTVAWKADGSPITQGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLT KWKSHSSFSCLVTHEGSTVEKKVAPAEC
配列番号 .44	ASSTTAPSVPFLAPSCGTTSGATVALACLVLYFPEPVTVWSNSGALTSVHFTFPSVQLQAS SLSSMVTVPSSRWLSDFTCNVAHPPSNTKVDKTVRKTDHPPGPKCPDCPKCPPEMLGGP FIFPPPKPKDTLSISRTPEVTCVVVDLGDDSDVQITWFDNTQVYAKTSPREEQFNSTYR SVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPPIERTISKDKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVS CLIEGFYPSDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPQQLDSGTYFLYSRLSVDRSRWRQGNTYTC SHEALHSHHTQKSLTHSPKG
配列番号 .45	ASSTTAPSVPFLAPSCGTTSGATVALACLVLYFPEPVTVWSNSGALTSVHFTFPSVQLQAS SLSSMVTVPSSRWLSDFTCNVAHPPSNTKVDKTVRKTDHPPGPKCPDCPKCPPEMLGGP FIFPPPKPKDTLSISRTPEVTCVVVDLGDDSDVQITWFDNTQVYAKTSPREEQFNSTYR SVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPPIERTISKDKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVS
配列番号 .46	ASSTTAPSVPFLAPSCGTTSGATVALACLVLYFPEPVTVWSNSGALTSVHFTFPSVQLQAS SLSSMVTVPSSRWLSDFTCNVAHPPSNTKVDKTVRKTDHPPGPKCPDCPKCPPEMLGGP FIFPPPKPKDTLSISRTPEVTCVVVDLGDDSDVQITWFDNTQVYAKTSPREEQFNSTYR SVLPILHQDWLKGKEFKCKVNSKSLPSPPIERTISKDKGQPHEPQVYVLPPAQEELSRNKVS

【表 1 4】

	CLIKSFHPPDIAVEWEITGQPEPENNYRTTPQQLDSGTYFVYSKLSVDRSHWQRGNTYTC SHEALHSHHTQKSLTHSPKG
配列番号 .46	RSDAQPSVFLFQPSLDELHTGSASIVCILNDFYKPEVNVWKVWDGVVQNKGIQESTTEQNSKI STYSLSSSTLTMSSTEYQSHEKFSCEVTHKSLASTLVKSFNRSECQRE

【配列表】

10

20

30

40

50

0005911813000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 19/02
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00
	A 6 1 P 43/00 1 2 1

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

(72)発明者 ジェネビーブ・ハンセン

アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア州デル・マー、ビア・デ・ラ・バリエ 2 6 8 3 番、スウェーデン・ジー - 3 3 5、ベット・セラピューティクス・インコーポレイテッド

審査官 星 浩臣

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 0 5 / 0 2 7 1 6 6 2 ( U S , A 1 )

特表 2 0 0 5 - 5 1 4 0 6 3 ( J P , A )

特開平 0 6 - 2 1 7 7 8 6 ( J P , A )

特表 2 0 0 6 - 5 0 0 9 0 4 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 6 / 2 8 - 1 6 / 3 0

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

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