

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-526044

(P2005-526044A)

(43) 公表日 平成17年9月2日(2005.9.2)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395	A 6 1 K 39/395 T	4 C O 8 5
A 6 1 P 35/00	A 6 1 P 35/00	4 C O 9 6
G O 1 N 24/08	G O 1 N 24/08 5 1 O P	4 H O 4 5
// A 6 1 B 5/055	A 6 1 B 5/05 3 9 O	
C O 7 K 16/42	C O 7 K 16/42 Z N A	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁)		

(21) 出願番号	特願2003-570783 (P2003-570783)	(71) 出願人	504314122
(86) (22) 出願日	平成15年2月21日 (2003.2.21)		デューク ユニバーシティ
(85) 翻訳文提出日	平成16年9月27日 (2004.9.27)		アメリカ合衆国 27710 ノースカロ
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/005323		ライナ州, ダラム, ディーユーエムシー
(87) 国際公開番号	W02003/072036		ボックス 3664, ダヴィソンビルデ
(87) 国際公開日	平成15年9月4日 (2003.9.4)		イング エム454
(31) 優先権主張番号	60/359, 419	(71) 出願人	500093513
(32) 優先日	平成14年2月21日 (2002.2.21)		ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ
(33) 優先権主張国	米国 (US)		ティ オブ カリフォルニア
(31) 優先権主張番号	60/420, 472		アメリカ合衆国 94607-5200
(32) 優先日	平成14年10月21日 (2002.10.21)		カリフォルニア州 オークランド フラン
(33) 優先権主張国	米国 (US)		クリン ストリート 1111 フィフス
			フロア
		(74) 代理人	100091096
			弁理士 平木 祐輔
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CD22抗体を使用した治療方法

(57) 【要約】

本発明は、固有の生理学的性質を有する抗CD22モノクローナル抗体を使用した治療方法に関する。特に、本発明は、天然型ヒトCD22(hCD22)の最初の2つのIg様ドメイン、または最初の2つのIg様ドメイン内のエピトープに特異的に結合する有効量のブロック抗CD22モノクローナル抗体を投与することによりB細胞悪性腫瘍を治療する方法に関する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B 細胞悪性腫瘍と診断されたヒト患者を治療する方法であって、

(1) 配列番号 1 の天然型ヒト CD22(hCD22)の最初の 2 つの Ig 様ドメイン、または最初の 2 つの Ig 様ドメイン内のエピトープに結合する有効量のブロッキング抗 CD22 モノクローナル抗体を、該ヒト患者に投与すること、および (2) 該治療に対する該悪性腫瘍の反応をモニタリングすること、を含む方法。

【請求項 2】

前記抗体は、HB22-7(HB11347)、HB22-23(HB11349)、HB22-33、HB22-5、HB22-13、および HB22-196 からなる群より選択される抗体と本質的に同じエピトープに結合する、請求項 1 に記載の方法。 10

【請求項 3】

前記抗体は、HB22-7(HB11347)、HB22-23(HB11349)、および HB22-33 からなる群より選択される抗体と本質的に同じエピトープに結合する、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体は、HB22-7 と本質的に同じエピトープに結合する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記抗体は、HB22-33 と本質的に同じエピトープに結合する、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗体は、CD22 とそのリガンドとの結合を少なくとも約 70% ブロックする、請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 7】

前記抗体は、CD22 とそのリガンドとの結合を少なくとも約 80% ブロックする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

前記 B 細胞悪性腫瘍が局所的なものである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記 B 細胞悪性腫瘍は、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、および前リンパ球性白血病の B 細胞亜型からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。 30

【請求項 10】

前記治療は、悪性腫瘍 B 細胞のその他の治療を伴わない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記治療は、放射線療法を伴わない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記治療は、化学療法を伴わない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記治療は、放射免疫療法(RIT)、または併用放射免疫療法(CMRIT)を伴わない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記抗体を単独で使用する治療は、該抗体と放射免疫療法との併用治療と比べて、Raji リンパ腫異種移植モデルの治療率の改善をもたらすものである、請求項 10 に記載の方法。 40

【請求項 15】

前記抗体を単独で使用する治療は、該抗体と放射免疫療法との併用治療と比べて、Raji リンパ腫異種移植モデルの生存率が高まる、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 16】

前記抗体を単独で使用する治療は、該抗体と放射免疫療法との併用治療と比べて、Raji リンパ腫異種移植モデルの腫瘍容積の減少をもたらす、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 17】

前記抗体は、完全抗体のフラグメントである、請求項 1 に記載の方法。 50

【請求項 18】

前記抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント、二重特異性抗体、線状抗体、一本鎖抗体分子、および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体からなる群より選択される、請求項 17 に記載の方法。

【請求項 19】

前記抗体は、さらなる抗原特異性を有する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 20】

前記抗体は、二重特異性抗体である、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記抗体は、CD22の別のエピトープにさらに結合する、請求項 20 に記載の方法。

10

【請求項 22】

前記抗体はキメラである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 23】

前記抗体はヒト化である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 24】

前記抗体はヒトである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗体は静脈内投与される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 26】

前記抗体は、週ごとに、静脈内点滴により投与される、請求項 25 に記載の方法。

20

【請求項 27】

固型 B 細胞腫瘍の縮小を追跡することにより、前記治療に対する反応をモニタリングする、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 28】

前記縮小が、磁気共鳴画像法(MRI)によりモニタリングされる、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記抗体が、配列番号 9 (HB22-5 V_H 配列)のアミノ酸 1~100;または配列番号 11(HB22-7 V_H 配列)のアミノ酸 1~97;または配列番号 13(HB22-3 V_H 配列)のアミノ酸 1~100;または配列番号 15(HB22-23 V_H 配列)のアミノ酸 1~100;または配列番号 17(HB22-33 V_H 配列)のアミノ酸 1~98;または配列番号 19(HB22-196 V_H 配列)のアミノ酸 1~100の配列と少なくとも約 95%の配列同一性を有する V_H 配列を含む重鎖を含む、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 30】

前記抗体が、配列番号 11(HB22-7 V_H 配列)のアミノ酸 1~97;または配列番号 15(HB22-23 V_H 配列)のアミノ酸 1~100;または配列番号 17(HB22-33 V_H 配列)のアミノ酸 1~98の配列と少なくとも約 95%の配列同一性を有する V_H 配列を有する重鎖を含む、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記抗体が、配列番号 11(HB22-7 V_H 配列)のアミノ酸 1~97;配列番号 15(HB22-23 V_H 配列)のアミノ酸 1~100;および配列番号 17(HB22-33 V_H 配列)のアミノ酸 1~98からなる群より選択される V_H 配列を含む、請求項 30 に記載の方法。

40

【請求項 32】

前記抗体が、配列番号 21(HB22-5V 配列);または配列番号 23(HB22-7 V 配列);または配列番号 25(HB22-13 V 配列);または配列番号 27(HB22-23 V 配列);または配列番号 29(HB22-33 V 配列);または配列番号 31(HB22-196 V 配列)、のアミノ酸配列と少なくとも約 95%の配列同一性を有する V 配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 33】

前記抗体が、配列番号 23(HB22-7 V 配列);または配列番号 27(HB22-23 V 配列);または配列番号 29(HB22-33 V 配列)のアミノ酸配列と少なくとも約 95%の配列同一性を有する V 配列を含む軽鎖を含む、請求項 32 に記載の方法。

50

【請求項 3 4】

前記抗体が、配列番号23(HB22-7 V 配列)；配列番号27(HB22-23 V 配列)；および配列番号29(HB22-33 V 配列)のアミノ酸配列からなる群より選択されるV 配列を含む、請求項 3 3 に記載の方法。

【請求項 3 5】

前記抗体が、配列番号11(HB22-7 V_H配列)のアミノ酸1～97と配列番号23(HB22-7 V 配列)のアミノ酸配列；配列番号15(HB22-23 V_H配列)のアミノ酸1～100と配列番号27(HB22-23 V 配列)のアミノ酸配列；ならびに配列番号17(HB22-33 V_H配列)のアミノ酸1～98と配列番号29(HB22-33 V 配列)のアミノ酸配列からなる群より選択されるV_HとV 配列とを含む、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3 6】

前記抗体はキメラである、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 7】

前記抗体はヒト化である、請求項 3 5 に記載の方法。

【請求項 3 8】

前記抗体はヒトである、請求項 3 5 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、固有の生理学的性質を有する特定の抗CD22モノクローナル抗体の治療的用途に関する。特に、本発明は、固有のアポトーシス誘発性(pro-apoptotic)性質を有するブロッッキング抗CD22抗体で、リンパ腫および白血病等のB細胞悪性腫瘍、ならびに自己免疫疾患を治療する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

CD22は、ほぼ全てのBリンパ球およびほとんどのB細胞リンパ腫上に見とめられる膜グリコリントタンパク質(glycophosphoprotein)である。CD22の架橋は、CD22チロシンリン酸化を誘発し、ストレス活性化タンパク質キナーゼ(SAPK)経路を活性化するエフェクタータンパク質の複合体をアセンブルする。CD22架橋により、一次B細胞において可能性のある同時刺激シグナル、および新生物B細胞においてアポトーシス誘発性シグナルが得られる。構造的に、CD22は、単一アミノ末端VセットIgドメインおよび6つのC-2セットIgドメインからなる7つの細胞外Igドメインを有する、免疫グロブリン(Ig)遺伝子スーパーファミリーの「シアロ付着因子(sialoadhesin)」サブクラスのメンバーである。Wilsonら, J. Exp. Med. 173:137-146 (1991)；Engelら, J. Exp. Med. 181:1581-1586 (1995)；およびTorresら, J. Immunol. 149:2641-2649 (1992)。CD22は、生理学的に関連する部位にシグナリングエフェクター分子を補充することにより、Bリンパ球抗原受容体(BCR)シグナリングを正または負に調節する重要なリンパ球特異的シグナル形質導入分子である。Tedderら, Annu. Rev. Immunol. 15:481-504 (1997)；Satoら, Immunology 10:287-297 (1998)。

30

【0003】

抗CD22抗体は、例えば、米国特許第5,484,892号；同第6,183,744号；同第6,187,287号；同第6,254,868号、およびTuscanoら, Blood 94(4):1382-92 (1999)で説明されている。非ホジキンリンパ腫の治療において、抗CD22抗体を含むモノクローナル抗体を使用することは、例えば、Rennerら, Leukemia 11(Suppl. 2):S55-9 (1997)に概説されている。ヒト化抗CD22抗体であるLymphoCideTM(empatuzumab, Immunomedics, Inc.)は、不活性および侵襲性形態の非ホジキンリンパ腫の治療について第III期臨床試験にある。この抗体のイットリウム90標識化バージョンは、同じ兆候について現在第I期臨床試験にある。

40

【0004】

最近の癌治療の進歩にも関わらず、B細胞亜型の非ホジキンリンパ腫等のB細胞悪性腫瘍、および慢性リンパ性白血球は、癌に関連する死亡の主な引き金である。従って、B細胞

50

胞悪性腫瘍の治療のためのさらに改善された治療計画の必要性が高い。

【発明の開示】

【0005】

本発明は、特定のブロッキング抗CD22モノクローナル抗体の固有の性質を利用して、ヒト患者のB細胞悪性腫瘍を治療するための改善された臨床アプローチに関する。

【0006】

一態様では、本発明は、B細胞悪性腫瘍と診断されたヒト患者の治療方法に関し、該方法は、(1)配列番号1の天然型ヒトCD22(hCD22)の最初の2つのIg様ドメインまたは最初の2つのIg様ドメインと会合したエピトープに特異的に結合する有効量のブロッキング抗CD22モノクローナル抗体を患者に投与すること、および(2)治療に対する悪性腫瘍の反応をモニタリングすることを含む。

【0007】

特定の実施形態では、使用する抗体は、HB22-7(HB11347)、HB22-23(HB11349)、HB22-33、HB22-5、HB22-13およびHB22-196、好ましくはHB22-7、HB22-23またはHB22-33、より好ましくはHB22-7またはHB22-33からなる群より選択される抗体と本質的に同じエピトープに結合する。

【0008】

さらなる実施形態では、抗体は、CD22がそのリガンドに結合するのを、少なくとも70%、好ましくは少なくとも80%ブロックする。

【0009】

別の実施形態では、抗体は、配列番号9(HB22-5 V_H配列)のアミノ酸1~100；または配列番号11(HB22-7 V_H配列)のアミノ酸1~97；または配列番号13(HB22-13 V_H配列)のアミノ酸1~100；または配列番号15(HB22-23 V_H配列)のアミノ酸1~100；または配列番号17(HB22-23 V_H配列)のアミノ酸1~98；または配列番号19(HB22-196 V_H配列)のアミノ酸1~100、の配列と少なくとも約95%の配列同一性を有するV_H配列を含む重鎖を含む。

【0010】

さらに別の実施形態では、抗体は、配列番号11(HB22-7 V_H配列)のアミノ酸1~97；または配列番号15(HB22-23 V_H配列)のアミノ酸1~100；または配列番号17(HB22-33 V_H配列)のアミノ酸1~98、の配列と少なくとも約95%の配列同一性を有するV_H配列を含む重鎖を含む。

【0011】

さらに別の実施形態では、抗体は、配列番号11(HB22-7 V_H配列)のアミノ酸1~97；または配列番号15(HB22-23 V_H配列)のアミノ酸1~100の配列；および配列番号17(HB22-33 V_H配列)のアミノ酸1~98からなる群より選択されるV_H配列を含む。

【0012】

異なる実施形態では、抗体は、配列番号21(HB22-5V 配列)；または配列番号23(HB22-7 V 配列)；または配列番号25(HB22-13 V 配列)；または配列番号27(HB22-23 V 配列)；または配列番号29(HB22-33 V 配列)；または配列番号31(HB22-196 V 配列)、のアミノ酸配列と少なくとも約95%の配列同一性を有するV 配列を含む軽鎖を含む。

【0013】

特定の実施形態では、抗体は、配列番号23(HB22-7 V 配列)；または配列番号27(HB22-23 V 配列)；または配列番号29(HB22-33 V 配列)、のアミノ酸配列と少なくとも約95%の配列同一性を有するV 配列を含む軽鎖を含む。

【0014】

さらなる実施形態では、抗体は、配列番号23(HB22-7 V 配列)；配列番号27(HB22-23 V 配列)；および配列番号29(HB22-33 V 配列)、のアミノ酸配列からなる群より選択されるV 配列を含む。

【0015】

好適な実施形態では、抗体は、配列番号11(HB22-7 V_H配列)のアミノ酸1~97および配列番号23(HB22-7 V 配列)のアミノ酸配列；配列番号15(HB22-23 V_H配列)のアミノ酸1~100

10

20

30

40

50

および配列番号27(HB22-23 V 配列)のアミノ酸配列；ならびに配列番号17(HB22-33 V_H配列)のアミノ酸1～98および配列番号29(HB22-33 V 配列)のアミノ酸配列、からなる群より選択されるV_HおよびV 配列を含む。

【0016】

異なる態様では、本発明は、上記議論した抗体重鎖または軽鎖可変領域のいずれかをコードする核酸、またはその一部に関する。

【0017】

目的とする症状は、局所化B細胞悪性腫瘍を含む(ただし、これに限定されない)、あらゆる種類のB細胞悪性腫瘍であり得る。B細胞悪性腫瘍の典型的な代表例は、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、および前リンパ球性白血病のB細胞亜型のものである。 10

【0018】

本発明の治療方法は、悪性B細胞のそれ以上の治療(放射線療法、化学療法、併用放射免疫療法(CMRIT)等を含む)を伴わないで行うことができる。本発明の治療方法は、典型的に、未治療の場合、同抗体と放射免疫療法との併用治療の場合、または放射免疫療法のみの場合と比べて、治癒率の改善および/または生存率の上昇および/または腫瘍容積の優れた減少を提供する。

【0019】

抗体は、完全抗体、または例えばFab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメントを含む抗体フラグメント、二重特異性抗体、線状抗体、一本鎖抗体分子、ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体であり得る。従って、抗体は、追加の抗原特異性を有し得る(例えば、二重特異性抗体であり得る)。二重特異性抗体は、例えば、CD22に対する別のエピトープにさらに結合し得る。さらに、二重特異性抗体は、CD19、CD20、CD52、CD3、CD28、またはHLA-DR10(Lym-1)等の他の抗原；またはFc受容体(例えばCD16、CD64およびCD89)に対する結合特異性を有し得る。 20

【0020】

抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、霊長類化抗体、またはヒト抗体であり得る。

【0021】

抗体の投与は、静脈内点滴の繰返しによる静脈内(i.v.)投与等、あらゆる従来の経路で実施され得る。 30

【0022】

治療に対する反応は、例えば、磁気共鳴画像化(MRI)による固型腫瘍の縮小のモニタリングを含む当業者に周知の方法によりモニタリングし得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

好適な実施形態の詳細な説明

A. 定義

特に定義しない限り、本明細書で使用する技術的および科学的な用語は、本発明が属する分野の当業者に一般的に理解される用語と同じ意味を持つ。

【0024】

当業者には、本明細書に記載するものと同様または等価の、本発明を実施する上で使用され得る多くの方法および材料が明らかであろう。実際、本発明は、記載する方法および材料に決して限定されない。本発明の目的のために、以下の用語を定義する。 40

【0025】

「免疫グロブリン」(Ig)という用語は、血清のグロブリンタンパク質の免疫性授与部分、および自然には生じないが同じ機能的特徴を有するその他の糖タンパク質を指すために使用する。「免疫グロブリン」または「Ig」という用語は、特に「抗体」(Ab)を含む。抗体は、特定の抗原に対して結合特異性を示すが、免疫グロブリンは、抗体、および抗原特異性を欠くその他の抗体様分子の両方を含む。天然型免疫グロブリンは、形質細胞と呼ばれる分化B細胞により分泌され、抗原特異性を持たない免疫グロブリンは、リンパ系によ 50

り低レベルで、そして骨髓腫により高レベルで生成される。本明細書で使用する「免疫グロブリン」、「Ig」という用語、およびそれらの文法上の変形語は、(上記定義した)抗体、および抗原特異性を持たないIg分子を含むように使用する。

【0026】

天然型免疫グロブリンは、通常、2つの同一軽鎖(L)および2つの同一重鎖(H)からなる、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。軽鎖はそれぞれ、1つのジスルフィド共有結合により重鎖に連結しており、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖によりジスルフィド結合の数は異なる。重鎖および軽鎖はまた、それぞれ、規則的に間隔をあけられた鎖内ジスルフィド架橋を有する。重鎖はそれぞれ、一端において、可変ドメイン(V_H)とそれに後続するいくつかの定常ドメインを有する。軽鎖はそれぞれ、一端において可変ドメイン(V_L)を有し、他端において定常ドメインを有する；軽鎖の定常ドメインを重鎖の第1の定常ドメインとアラインさせ、軽鎖可変ドメインを重鎖の可変ドメインとアラインさせる。特定のアミノ酸残基は、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの接合部分を形成すると考えられている。

10

【0027】

血清において見とめられる主要Igアイソタイプ(クラス)、および対応するIg重鎖(括弧内に示す)を以下に一覧する：

IgG(鎖)：血清中の一次Ig、抗原に反応して生じる主要な抗体、この抗体は胎盤を通る；

IgE(鎖)：このIgは、マスト細胞および好塩基球に固く結合し、抗原に追加的に結合する場合には、ヒスタミンおよび即時過敏反応の他の仲介物質の放出を生じ；花粉症、喘息および過敏症を含むアレルギー反応において主要な役割を果たし；寄生動物に対する防御的役割を果たしうる；

20

IgA(鎖)：このIgは、唾液、涙、粘液および初乳等の外分泌液中に存在する；

IgM(μ 鎖)：抗原に対する反応において最初に誘発されるIg；その後生成される他の抗体アイソタイプよりも親和性が典型的に低く、典型的に五量体である；

IgD(鎖)：このIgは、臍帯血中で比較的高濃度で見とめられ、抗原に対する初期細胞受容体であり得、主要リンパ球細胞表面分子である。

【0028】

本明細書において「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、特に、モノクローナル抗体(完全長モノクローナル抗体が挙げられるがこれに限定されない)、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、および所望の生物学的活性を示せば抗体フラグメントを含む。

30

【0029】

「抗体フラグメント」は、完全長抗体の一部、概して抗原結合ドメインまたは可変(V)ドメイン、を含む。抗体フラグメントの例としては、Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ およびFvフラグメント；二重特異性抗体；線状抗体；一本鎖抗体分子；ならびに抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【0030】

本明細書で使用する「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同種の(すなわち、集合を構成する個々の抗体が、少量で存在し得る可能性のある天然型突然変異以外については同一である)抗体の集合から得た抗体を指す。モノクローナル抗体は、単一の抗原部位に方向付けられ、高度に特異的である。さらに、異なる決定基(エピトープ)に方向付けられた異なる抗体を典型的に含む従来の(ポリクローナル)抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体はそれぞれ、抗原上の単一の決定基に方向付けられる。

40

【0031】

本明細書のモノクローナル抗体は、特に、「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、および所望の生物学的活性を示せばそのような抗体のフラグメントを含む(米国特許第4,816,567号；Morrisonら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984)；Oiら, Biotechnologies 4(3):214-221 (1986)；およびLiuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-43 (1987

50

))。

【0032】

非ヒト(例えば、マウス)抗体の「ヒト化」または「CDR移植」形態は、レシピエントの超可変領域残基が、所望の特異性、親和性および能力を有するマウス、ラット、ウサギまたは非ヒト霊長類等の非ヒト種(ドナー抗体)由来の超可変領域残基で置き換えられたヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。一部の例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域(FR)残基も、対応する非ヒト残基により置き換えられている(いわゆる「逆突然変異」)。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中またはドナー抗体中に見とめられない残基を含んで、親和性等の抗体特性がさらに改善されるように改変され得る。一般的に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、そして典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、全てまたは実質的に全ての超可変領域が非ヒト免疫グロブリンのものに対応し、全てまたは実質的に全てのFRがヒト免疫グロブリン配列のものである。ヒト化抗体は、任意に、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部(典型的にヒト免疫グロブリンのもの)も含む。更なる詳細については、Jonesら, *Nature* 321:522-525 (1986); およびReichmannら, *Nature* 332:323-329 (1988)を参照のこと。

10

【0033】

「一本鎖Fv」または「sFv」抗体フラグメントは、1本のポリペプチド鎖中に存在する、抗体の V_H および V_L ドメインを含む。一般的に、Fvポリペプチドは、抗原結合のために望ましい構造をsFvに形成させる、 V_H ドメインと V_L ドメインとの間にポリペプチドリッガーをさらに含む。sFvの概要については、*The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, RosenbergおよびMoore編 Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)に掲載のPluckthunを参照のこと。

20

【0034】

「二重特異性抗体」という用語は、同じポリペプチド鎖(V_H - V_L)内で軽鎖可変ドメイン(V_L)に連結した重鎖可変ドメイン(V_H)を含む、2つの抗原結合部位を有する小さい抗体フラグメントを指す。同じ鎖上の2つのドメインを対合させるには短すぎるリンカーを使用することで、ドメインを強制的に、別の鎖の相補ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を作製する。二重特異性抗体は、例えば、EP 404,097; WO 93/11161; およびHollingerら, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)により詳細に記載されている。

30

【0035】

本出願を通じて使用する「線状抗体」という表現は、Zapataら *Protein Eng.* 8(10):1057-1062 (1995)に記載の抗体を指す。簡単に言うと、これらの抗体は、抗原結合領域の対を形成するタンデムなFdセグメントの対(V_H - C_H1 - V_H - C_H1)を含む。線状抗体は、二重特異的であっても、または単一特異的であってもよい。

【0036】

IgG、IgE、IgA、IgMおよびIgDアイソタイプの抗体は、重鎖の定常領域が異なるにもかかわらず、同じ可変領域(すなわち、同じ抗原結合空隙)を有し得る。免疫グロブリン(例えば、抗体)の定常領域は、抗体と抗原との結合に直接関与していないが、抗体依存型細胞毒性(ADCC)における抗体の関与等、様々なエフェクター機能を示す。

【0037】

主な抗体アイソタイプ(クラス)の一部は、さらにサブクラスに分けられる。IgGは4つの公知のサブクラス(すなわち、IgG1(1)、IgG2(2)、IgG3(3)、およびIgG4(4))を有し、IgAは、2つの公知のサブクラス(IgA1(1)およびIgA2(2))を有する。

40

【0038】

「エピトープ」という用語は、タンパク質抗原上の(モノクローナルまたはポリクローナル)抗体に対する結合部位を指すために使用する。

【0039】

天然型配列ヒトCD22のアミノ酸配列内のドメイン1および/もしくは2に結合する抗体、または本明細書に具体的に開示するモノクローナル抗体(HB22-7、HB22-23およびHB22-3等)に結合される本質的に同じエピトープに結合する抗体は、「エピトープマッピング」

50

により同定され得る。抗体-抗原複合体の結晶構造を解明すること、競合アッセイ、遺伝子断片発現アッセイ、および合成ペプチド利用型アッセイを含む、タンパク質上のエピトープの位置をマッピングおよび特徴決定するための多くの方法が、当該分野で知られている(例えば、HarlowおよびLane, Using Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1999の第11章に記載されている)。遺伝子断片発現アッセイによれば、タンパク質をコードするオープンリーディングフレームは、ランダムにまたは特定の遺伝子構築により断片化され、タンパク質の発現された断片とテストする抗体との反応性を測定する。遺伝子断片は、例えば、PCRにより生成されて、放射活性アミノ酸の存在下で、*in vitro*でタンパク質に転写および翻訳され得る。その後、抗体と放射活性標識化タンパク質断片との結合を、免疫沈降およびゲル電気泳動により測定する。特定のエピトープも、ファージ粒子の表面上に提示されるランダムペプチド配列の大規模なライブラリー(ファージライブラリー)を使用することにより、同定され得る。あるいはまた、重複するペプチド断片の定義されたライブラリーを、単純な結合アッセイにおいて、テスト抗体との結合についてテストできる。後者のアプローチは、約5~15アミノ酸の直線エピトープを定義するのに適している。

10

【0040】

抗体および参照抗体の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場合、該抗体は、該参照抗体と「実質的に同じエピトープ」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しているエピトープに結合するか否かを決定するのに最も幅広く使用されている迅速な方法は、標識化抗原または標識化抗体のいずれかを使用して、多数ある異なる形式で構成され得る競合アッセイ(例えば、競合ELISAアッセイ)である。通常、抗原が、96ウェルプレート上に固定化され、標識化抗体の結合をブロックする非標識化抗体の能力を、放射活性または酵素標識を使用して測定する。

20

【0041】

本明細書で使用するアミノ酸またはアミノ酸残基という用語は、変異体に関して以下にさらに記載するような天然型Lアミノ酸またはDアミノ酸を指す。一般的に使用されているアミノ酸の1文字および3文字略語を本明細書で使用する(Bruce Albersら, Molecular Biology of the Cell, Garland Publishing, Inc., New York (第3版 1994))。

【0042】

「配列同一性」は、配列をアラインし、必要であれば、保存的置換は配列同一性の一部であると考慮せずに、最大配列同一性%を得るために、ギャップを挿入した後の、天然型ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一の候補配列中アミノ酸残基の%と定義する。配列同一性%値は、Altschulら(1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", *Nucleic Acids Res.*, 25:3389-3402に定義されるようなNCBI BLAST2.0ソフトウェアにより生成される。パラメータは、ミスマッチのペナルティー(-1に設定)以外は、デフォルト値に設定される。

30

【0043】

本明細書で使用する「治療」とは、有益なまたは所望の臨床結果を得るためのアプローチである。本発明の目的のために、有益なまたは所望の臨床結果としては、検出可能または検出不可能に関わらず、症状の緩和、疾患の範囲の縮小、疾患の安定した(すなわち、悪化しない)状態、疾患進行の遅延または減速、疾患症状の改善または軽減、および(部分的または完全な)回復が挙げられるがこれらに限定されない。「治療」とは、治療を受けない場合に予測される生存率と比べて延長した生存率も意味する。「治療」とは、障害の発達を予防すること、または病変を変えることを意図して実施する介入である。従って、「治療」とは、治療的処置、および予防または防止処置の両方を指す。治療を必要とするものとしては、既に障害を持つもの、および障害を予防するものが挙げられる。B細胞悪性腫瘍については、本治療により、悪性腫瘍細胞の数が低下する；腫瘍容積が減少する；周囲器官(例えば、軟組織または骨)への侵入を含む、悪性腫瘍細胞の広がりが阻止(減速または停止)される；転移が阻止(減速または停止)される；腫瘍成長が阻止される；B細胞悪性腫瘍に付随する症状から解放される；死亡率が低下する；生活の質が改善される；

40

50

等する。本明細書の抗体での治療は、細胞増殖抑制および/または細胞毒性の効果を生じ得る。

【0044】

「B細胞悪性腫瘍」およびその文法上の変形語は、典型的にはリンパ系組織(骨髄またはリンパ節等)中で生じるが、非リンパ系組織(甲状腺、胃腸管、唾液腺および結膜等)でも生じ得る、B細胞の悪性腫瘍または新生物を指すように、最も広い意味で使用される。本発明の治療方法は、特に、CD22陽性B細胞悪性腫瘍に関し、B細胞亜型の非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、および前リンパ球性白血病が挙げられるがこれらに限定されない。

【0045】

B. 詳細な説明

1. 抗体

HB22-7、HB22-23、HB22-33、HB22-5、HB22-13、およびHB22-196と称されるブロッッキング抗CD22モノクローナル抗体が知られており、米国特許第5,484,892号、Tuscanoら, Eur. J. Immunol. 26:1246 (1996)、およびTuscanoら, Blood 94(4), 1382-1392 (1999)に開示されている。HB22-7およびHB22-23は、American Type Culture Collection (ATCC), 12302 Parklawn Drive, Rockville, Md. 20852から、それぞれ、受託番号HB22347およびHB11349として入手可能である。これらの抗体の調製は、以下の実施例1にも記載している。CD22のエピトープマッピングにより、これらのブロッッキングモノクローナル抗体が、ヒトCD22の最初の2つのIg様ドメイン、または最初の2つのIg様ドメインと会合するエピトープに結合することが示された(米国特許第5,484,892号およびTedderら, Annu. Rev. Immunol. 15:481-504 (1997))。抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列も、本出願において開示している。

【0046】

本発明は、B細胞型非ホジキンリンパ腫(NHL)の異種移植モデルにおいて得られた結果に基づき、B細胞悪性腫瘍の治療におけるHB22-7、HB22-23、HB22-33、HB22-5、HB22-13およびHB22-196の全体的な特徴を有するブロッッキング抗CD22抗体の予想外に優れた特性に基づく。

【0047】

抗CD22モノクローナル抗体は、例えば、ハイブリドーマ法(KoehlerおよびMilstein, Nature 256:495-497 (1975)); ならびにGoding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59-103, (Academic Press, 1986))、または例えば米国特許第4,816,567号およびWoodら, Nature 314:446-9 (1985)に開示されている組換え技術等の当該分野で公知の任意の標準的方法により作製され得る。

【0048】

免疫化の際に、内因性免疫グロブリン生成の不在下でヒト抗体のレパートリーを生成可能なトランスジェニック動物(例えば、マウス)を作製することも可能である。例えば、キメラおよび生殖細胞変異型マウスにおける抗体重鎖接合領域(J_H)遺伝子のホモ接合欠失により、内因性抗体生成が完全に阻害されることが説明されている。このような生殖細胞変異型マウスにおけるヒト生殖細胞免疫グロブリン遺伝子アレイの移動(transfer)は、抗原感作(antigen challenge)の際にヒト抗体の生成をもたらす。例えば、Jakobovitsら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 2551-255 (1993); Jakobovitsら, Nature 362, 255-258 (1993)を参照のこと。

【0049】

Mendezら(Nature Genetics 15:146-156 (1997))は、技術をさらに改善し、抗原で感作すると高親和性完全ヒト抗体を生成する「異種マウス(Xenomouse)II」と称するトランスジェニックマウスの系統を作製した。これは、メガ塩基(megabase)ヒト重鎖および軽鎖遺伝子座を、マウスに生殖細胞取込みさせて、上述したように、内因性 J_H セグメントに欠失を生じさせることにより達成された。異種マウスIIは、約66の V_H 遺伝子、完全な D_H および H_J 領域、ならびに3つの異なる定常領域(μ 、 δ および ϵ)を含む1,020kbのヒト重鎖遺伝

10

20

30

40

50

子座を含み、32のV 遺伝子、J セグメントおよびC 遺伝子を含む800 kbのヒト 遺伝子座も含む。これらのマウスにおいて生成される抗体は、遺伝子再配列、アセンブリおよびレパートリーを含むあらゆる点でヒトにおいて見とめられるものに酷似している。マウス遺伝子座における遺伝子再配列を抑制する内因性J_Hセグメントにおける欠失により、ヒト抗体が内因性抗体よりも優先的に発現される。

【0050】

あるいはまた、ファージ提示技術(McCaffertyら, *Nature* 348, 552-553 (1990))を使用して、非免疫化ドナー由来の免疫グロブリン可変(V)ドメイン遺伝子レパートリーから、ヒト抗体および抗体フラグメントをin vitroで生成できる。この技術によれば、抗体Vドメイン遺伝子は、M13またはfd等の繊維状バクテリオファージの主要または主要でない(minor)コートタンパク質遺伝子のいずれかにインフレームでクローニングされ、ファージ粒子の表面上に機能性抗体フラグメントとして提示される。繊維状粒子は、ファージゲノムの一本鎖DNAコピーを含むために、抗体の機能特性に基づく選択により、同じくそれらの特性を示す抗体をコードする遺伝子が選択される。従って、ファージは、B細胞の特性の一部を模倣する。ファージ提示は、様々な形式で実施できる；これらの概要については、例えば、Johnson, Kevin S.およびChiswell, David J., *Current Opinion in Structural Biology* 3, 564-571 (1993)を参照のこと。V 遺伝子セグメントのいくつかの由来源をファージ提示のために使用できる。Clacksonら, *Nature* 352, 624-628 (1991)は、免疫化マウスの脾臓に由来するV 遺伝子の小さなランダム組合せライブラリーから、様々なアレイの抗オキサゾロン抗体を単離した。非免疫化ヒトドナーに由来するV 遺伝子のレパートリーを構築し、様々なアレイの抗原(自己抗原を含む)に対する抗体を、Marksら, *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991)、またはGriffithsら, *EMBO J.* 12, 725-734 (1993)により記載される技術に本質的に従って単離できる。自然の免疫反応では、抗体遺伝子は、高い率で突然変異を蓄積する(体細胞超変異)。導入される変化の一部は、高い親和性を授与し、高親和性表面免疫グロブリンを提示するB細胞は、その後の抗原感作の間に優先的に複製および分化される。この自然のプロセスは、「鎖シャッフリング(chain shuffling)」として知られる技術(Marksら *Bio/Technol.* 10, 779-783 [1992])を採用することにより、模倣できる。この方法では、重鎖および軽鎖V領域遺伝子を非免疫化ドナーから得たVドメイン遺伝子の天然型変異体のレパートリー(レパートリー)に順次置き換えることにより、ファージ提示により得られる「一次」ヒト抗体の親和性を改善できる。この技術により、nM範囲内に親和性を有する抗体および抗体フラグメントが生成される。非常に大きいファージ抗体レパートリーを作製する戦略は、Waterhouseら, *Nucl. Acids Res.* 21, 2265-2266 (1993)に記載されている。

【0051】

モノクローナル抗体の生成に関する更なる情報については、Goding, J.W., *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, 第3版, Academic Press, Inc., London, San Diego, 1996; LiddellおよびWeeks: *Antibody Technology: A Comprehensive Overview*, Bios Scientific Publishers: Oxford, UK, 1995; BreitlingおよびDubel: *Recombinant Antibodies*, John Wiley and Sons, New York, 1999; ならびにPhage Display: *A Laboratory Manual*, Barbasら編, Cold Springs Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, 2001も参照のこと。

【0052】

抗体フラグメントの作製のために、様々な技術が開発されている。従来、これらのフラグメントは無傷抗体のタンパク質分解性消化を介して誘導される(例えば、Morimotoら, *J. Biochem. Biophys. Methods* 24:107-117 (1992)、およびBrennanら, *Science* 229:81 (1985)を参照のこと)。しかし、本発明により、これらのフラグメントは、組換え宿主細胞により直接生成できる。例えば、Fab'-SHフラグメントを、大腸菌から直接回収し、化学的に共役させてF(ab')₂フラグメントを形成させる(Carterら, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。別の実施形態では、ロイシンジッパーGCN4を使用してF(ab')₂を形成して、F(ab')₂分子のアセンブリを促す。別のアプローチによれば、Fv、FabまたはF(ab')₂フラグ

メントが、組換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。抗体フラグメントの生成のためのその他の技術は、当業者に明らかであろう。

【0053】

2つの共有結合した抗体からなるヘテロ共役(heteroconjugate)抗体も、本発明の範囲内にある。このような抗体は、例えば、免疫系細胞に望ましくない細胞を標的させること(米国特許第4,676,980号)、およびHIV感染を治療すること(PCT出願公報W0 91/00360および同W0 92/200373)が示唆されてきた。ヘテロ共役抗体は、周知の市販の架橋剤を使用して、任意の都合のよい架橋法を使用して作製され得る。

【0054】

げっ歯類、ヒトまたはヒト化に関わらず、本発明の抗体は、更なる抗原特異性を有して二重抗体を形成し得る。第2の結合特異性は、例えば、更なるB細胞抗原(CD19、CD20、CD52およびB細胞上で発現されるその他のCD抗原等)、特に標的化B細胞悪性腫瘍に付随する抗原を標的とし得る。例えば、CD20は、90%を上回る非ホジキンリンパ腫において発現されることが知られている。抗CD20抗体(Rituxan(登録商標)、IDEC Pharmaceuticals)は、非ホジキンリンパ腫を治療するために臨床的に使用されている。CAMPATH-1H(抗CD52w)は、B細胞悪性腫瘍を治療するために開発された別の抗体である。CD20またはCD52抗原に対する結合特異性を含む二重特異性抗体が、特に、本明細書の範囲内に含まれる。本発明の二重特異性抗体が結合できる別のB細胞抗原は、非ホジキンリンパ腫の公知マーカーであるHLA-DR10(Lym-1)である。二重特異性抗体は、腫瘍局所化を増強するため、ならびに腫瘍特異的免疫反応を強化および/または増強するために生成され得る。その他の抗原標的の例としては、CD3、CD28およびFc受容体(CD16、CD64およびCD89)が挙げられる。二重特異性抗体は、細胞毒性を増強し、その結果、緩和速度および生存率を改善すると予想される。

【0055】

HB22-7、HB22-23、HB22-33、HB22-5、BH22-13および/またはHB22-196と本質的に同じエピトープに結合する抗体は、エピトープマッピングにより同定され得る。2つの異なる抗体が同じエピトープを認識するか否かを判断する最も簡単な方法は、競合結合アッセイである。この方法は、抗体が、互いの抗原への結合を妨害できるかを判断し、立体配座エピトープおよび線状エピトープの両方に有効である。競合結合アッセイは、標識化抗原または標識化抗体のいずれかを使用して、多数の異なる形式で構成され得る。このアッセイの最も一般的なバージョンでは、抗原が、96ウェルプレート上に固定化される。次いで、標識化抗体が抗原に結合するのをブロックする非標識化抗体の能力を、放射活性または酵素標識を使用して測定する。更なる詳細については、例えば、Wagenerら, J. Immunol., 130:2308-2315 (1983); Wagenerら, J. Immunol. Methods, 68:269-274 (1984); Kurokiら, Cancer Res. 50:4872-4879 (1990); Kurokiら, Immunol. Invest. 21:523-538 (1992); Kurokiら, Hybridoma 11:391-407 (1992)、およびUsing Antibodies: A Laboratory Manual, Ed HarlowおよびDavid Lane編, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, New York, 1999, pp. 386-389を参照のこと。

【0056】

あるいはまた、またはさらに、エピトープマッピングは、ランダムなまたは特定の遺伝子構築のいずれかによる抗体が結合する抗原の断片化に基づく技術を使用し、抗体から得られる断片の反応性を決定することにより、実施できる。断片化は、例えばPCR技術、その後の放射活性アミノ酸の存在下におけるin vitroでのタンパク質に転写および翻訳により、核酸レベルで実施してもよい。更なる詳細については、例えば、HarlowおよびLane(前掲、pp.390-392)を参照のこと。

【0057】

エピトープマッピングの別の方法によれば、タンパク質抗原の小さい線状セグメントにそれぞれ対応する重複ペプチドのセットを合成し、固相上にアレイ化させる。次いで、ペプチドのパネルを、テスト抗体でプロービングし、酵素標識化二次抗体を使用して結合した抗体を検出する。(HarlowおよびLane、前掲、pp.393-396)。

【0058】

エピトープマッピングの分野で周知の更なる方法は、ランダムな合成またはファージ提示ペプチドライブラリーからの抗体選択である。ファージ提示ライブラリーは、ペプチドコードオリゴヌクレオチドの複合混合物を、f1型ssDNAファージの主要でないコートタンパク質遺伝子のアミノ末端に入れてクローニングすることにより構築する。このようなファージ提示ライブラリーは、例えば、New England Biolabsから市販されている。ライブラリーをストックとして増幅させ、個々のクローンの複数コピーを代表するのに十分なアリコート、目的の抗体と混合させる。抗体結合ファージを、「バイオパンニング(biopanning)」と呼ばれる手順により回収し、結合しなかったファージを除去する。結合したファージを溶出し、細菌を感染させるために使用し、選択したストックを増幅させる。最終的に選択したストックの個々のプラークを成長させ、例えばELISAにより特定の抗体反応性についてチェックし、挿入部位周囲のDNAを配列決定する。抗体が結合するペプチドをコードする配列の分析により、抗体の特異性が定義される。更なる詳細については、例えば、SmithおよびScott, *Methods Enzymol.* 217:228-257 (1993)、ならびにHarlowおよびLane(前掲), pp. 397-398を参照のこと。

10

【0059】

非ヒト(げっ歯類)抗体をさらに改変して、ヒト臨床用途により適するようにできる。キメラ抗体を、ヒト定常ドメイン遺伝子セグメントにスプライシングした所望の特異性を有するマウス可変領域遺伝子セグメントで作製する(例えば、米国特許第4,816,567号を参照のこと)。

20

【0060】

抗体をヒト療法に使用する場合は抗原性の問題を回避するために、非ヒト(げっ歯類)抗体をヒト化してもよい。一般的に、ヒト化抗体は、非ヒト由来源に由来する1つ以上のアミノ酸残基を挿入されている。これらの非ヒトアミノ酸残基は、「インポート」残基とよく呼ばれ、典型的に「インポート」可変ドメインから得られる。ヒト化は、Winterおよび共同研究者ら(Jonesら, *Nature* 321:522-525(1986); Riechmannら, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyenら, *Science*, 239:1534-1536 (1988))の方法に従って、ヒト抗体の対応する配列を、げっ歯類CDRまたはCDR配列に置き換えることにより、本質的に実施され得る。抗体ヒト化の比較的単純な性質にも関わらず、げっ歯類CDRをヒトフレームワーク(FR)へ単純に移植することにより、元のげっ歯類モノクローナル抗体の結合親和性および特異性が必ず再構成されとは限らない。ヒト化抗体の特性は、例えば、ヒトフレームワークに入れたげっ歯類抗体由来の残基を置換させること(逆突然変異)を含む適切な設計により改善できる。このような逆突然変異の位置は、配列および構造分析、または可変領域の三次元モデルの分析により決定され得る。さらに、ファージ提示ライブラリーを使用して、抗体配列内の選択した位置のアミノ酸を変化させることができる。ヒト化抗体の性質は、ヒトフレームワークの選択によっても影響を受け得る。初期実験では、げっ歯類モノクローナル抗体に対する配列同一性とは無関係に、よく特徴決定されたヒトモノクローナル抗体の限定されたサブセットを使用した(いわゆる固定フレームワークアプローチ)。さらに最近では、一部のグループが、げっ歯類可変領域に対して高いアミノ酸配列同一性を有する可変領域を使用している(相同性マッチングまたはベストフィット(best-fit)法)。別のアプローチによれば、コンセンサスまたは生殖細胞配列を使用するか、または各軽鎖もしくは重鎖可変領域中のフレームワーク配列の断片をいくつかの異なるヒトモノクローナル抗体から選択する。

30

40

【0061】

上記議論した技術のいずれかにより調製したかまたは入手した抗体のアミノ酸変異体は、適切なヌクレオチド変化を抗CD22-DNAに導入するか、例えばペプチド合成により調製され得る。アミノ酸変化により、グリコシル化部位の数または位置の変化等、ヒト化または変異型抗CD22抗体の翻訳後プロセッシングも変化し得る。

【0062】

抗体は、定常領域内の保存された位置においてグリコシル化される(JefferisおよびLun

50

d, Chem, Immunol. 65:111-128 (1997); WrightおよびMorrison, TibTECH 15:26-32 (1997))。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能(Boydら, Mol. Immunol. 32:1311-1318 (1996); WittweおよびHoward, Biochem. 29:4175-4180 (1990))、ならびに立体構造に影響を及ぼし得る糖タンパク質の部分と糖タンパク質の提示される(presented)三次元表面との分子内相互作用(JefferisおよびLund, 前掲; WyssおよびWagner, Current Opin. Biotech. 7:409-416 (1996))に影響を及ぼす。オリゴ糖類はまた、特定の認識構造に基づいて、所与の糖タンパク質に特定の分子を標的とするようにも作用し得る。例えば、ガラクトシル化IgGでは、オリゴ糖部分がCH₂内スペース(inter-CH₂ space)から「フリップ(flip)」し、末端Nアセチルグルコサミン残基がマンノース結合タンパク質に結合可能になることが報告されている(Malhotraら, Nature Med. 1:237-243 (1995))。グリコペプチダーゼによる、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞中で生成されるCAMPATH-1H(ヒトリンパ球のCDw52抗原を認識する組換えヒト化マウスモノクローナルIgG1抗体)からのオリゴ糖の除去により、補体仲介型溶解(CMCL)の完全な減少が生じ(Boydら, Mol. Immunol. 32:1311-1318 (1996))、ノイラミニターゼを使用したシアル酸の選択的な除去ではCMCLは無くならなかった。抗体のグリコシル化が、抗体依存型細胞毒性(ADCC)に影響を及ぼすことも報告されている。特に、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼII(GnTII)のテトラサイクリンで調節された発現、両断GlcNAcのグリコシルトランスフェラーゼ触媒形成を有するCHO細胞は、ADCC活性を改善したことが報告されている(Umanaら, Mature Biotech. 17:176-180 (1999))。

10

20

30

40

50

【0063】

抗体のグリコシル化変異体は、基礎を成すヌクレオチド配列中のグリコシル化部位を変換することにより調製され得る。さらに、抗体のグリコシル化は、基礎を成すヌクレオチド配列を変えることなく変換することもできる。グリコシル化は、抗体を発現させるために使用する宿主細胞に大きく依存する。可能性のある治療薬として組換え糖タンパク質(例えば、抗体)の発現のために使用する細胞型は、滅多に天然型細胞であることはないため、抗体のグリコシル化パターンの有意な変化が予想される(例えば、Hseら, J. Biol. Chem. 272:9062-9070 (1997)を参照のこと)。選択した宿主細胞に加えて、抗体の組換え生成の間のグリコシル化に影響を及ぼす因子としては、成長モード、培地の処方、培養密度、酸化、pH、精製スキーム等が挙げられる。オリゴ糖生成に関与する特定の酵素を導入または過剰発現させることを含めて、特定の宿主生物中で得られるグリコシル化パターンを変換するための様々な方法が提案されている(米国特許第5,047,335号; 同第5,510,261号; および同第5,278,299号)。グリコシル化、または特定の種類のグリコシル化を、例えば、エンドグリコシダーゼH(Endo H)を使用して、糖タンパク質から酵素的に除去することができる。さらに、組換え宿主細胞は、遺伝子操作(例えば、特定の種類の多糖類をプロセッシング不可能に)され得る。上記および同様の技術は当該分野で周知である。

【0064】

本発明の抗体は、抗体指令型酵素プロドラッグ療法(ADEPT)によっても使用され得る。ADEPTは、腫瘍抗原を標的とするモノクローナル抗体の特異性を利用して、触媒酵素に、癌細胞の表面を標的化させる技術である。ここで、酵素は、プロドラッグ形態の抗癌薬(例えば、ペプチジル化学療法薬、W081/01145を参照)を活性化させて、完全活性形態にする役目を果たす。例えば、W088/07378および米国特許第4,975,278号を参照のこと。

【0065】

本発明の方法において有用な酵素としては、リン酸含有プロドラッグを遊離型薬物(free drugs)に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ; 硫酸含有プロドラッグを遊離型薬物に変換するのに有用なアリアルスルファターゼ; 非毒性5-フルオロシトシンを抗癌薬である5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ; ペプチド含有プロドラッグを遊離型薬物に変換するのに有用な、セラチアプロテアーゼ、サーモリシン、スブチリシン、カルボキシペプチダーゼおよびカテプシン(カテプシンBおよびL等)等のプロテアーゼ; D-アミノ酸置換基を含むプロドラッグを遊離型薬物に変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ; グリコシル化プロドラッグを遊離型薬物に変換する

のに有用な、 α -ガラクトシダーゼおよびノイラミニダーゼ等の炭水化物切断酵素； β -ラクタムで誘導体化された薬剤を遊離型薬物に変換するのに有用な β -ラクタマーゼ；ならびにアミン窒素においてフェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基でそれぞれ誘導体化された薬剤を遊離型薬物に変換するのに有用な、ペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼ等のペニシリンアミダーゼ、が挙げられるがこれらに限定されない。あるいはまた、当該分野において「アブザイム」としても知られる酵素活性を有する抗体を使用して、本発明のプロドラッグを遊離型活性薬剤に変換できる(例えば、Massey, Nature 328:457-458 (1987)を参照のこと)。本明細書に記載するように、抗体-アブザイムコンジュゲートを調製して、アブザイムを腫瘍細胞集合に送達できる。

【0066】

本明細書に記載する抗体の免疫コンジュゲートも、本発明によりはっきりと包含される。免疫コンジュゲートは、化学療法剤、毒素またはラジオアイソトープ等の細胞毒性剤にコンジュゲートした抗体を含む。

【0067】

具体的には、細胞毒性ラジオアイソトープにコンジュゲートさせて、放射線療法に標的的部位を特異的に標的化させること(放射免疫治療)で、本発明の抗CD22抗体の効力を更に増強させることができる。適切なラジオアイソトープとしては、例えば、 I^{131} および Y^{90} (両方とも臨床的な実践で使用されている)が挙げられる。その他の適切なラジオアイソトープとしては、 In^{111} 、 Cu^{67} 、 I^{131} 、 As^{211} 、 Bi^{212} 、 Bi^{213} および Re^{186} が挙げられるがこれらに限定されない。

【0068】

免疫コンジュゲートの生成において有用な化学療法剤としては、例えば、アドリアマイシン、ドキソルビシン、エピルビシン、5-フルオロウラシル、シトシンアラビノシド(「Ara-C」)、シクロホスファミド、チオテパ、ブスルファン、サイトキシン(cytosin)、タキソイド、例えば、パクリタキセル(Taxol, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, NJ)、およびドキシセタキセル(Taxotere, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, France)、トキシテル(toxotere)、メトトレキサート、シスプラチン、メルファラン、ビンブラスチン、ブレオマイシン、エトポシド、イホスファミド(ifosfamide)、マイトマイシンC、ミトザントロン、ビンクリスチン、ビノレルビン(vinorelbine)、カルボプラチン、テニポシド、ダウノマイシン、カルミノマイシン(carminomycin)、アミノプテリン、ダクチノマイシン、マイトマイシン、エスペラマイシン(esperamicin)(米国特許第4,675,187号を参照)、5-FU、6-チオグアニン、6-メルカプトプリン、アクチノマイシンD、VP-16、クロラムブシル、メルファラン、およびその他の関連するナイトロジェン・マスタードが挙げられる。

【0069】

本明細書の免疫コンジュゲートに使用される毒素としては、例えば、ジフテリアA鎖、外毒素、リシンA鎖、イノマイシン(enomycin)、およびトリコテセン(tricothecene)が挙げられる。特に、抗体-メイタンシノイド(maytansinoid)、および抗体-カリケマイシン(calicheamicin)コンジュゲートが挙げられる。メイタンシノイドを含む免疫コンジュゲートは、例えば、米国特許第5,208,020号、同第5,416,020号、および欧州特許EP 0 425 235号に開示されている。Liuら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623 (1996)も参照のこと。抗体-カリケマイシンコンジュゲートは、例えば、米国特許第5,712,374号；同第5,714,586号；同第5,739,116号；同第5,767,285号；同第5,770,701号；同第5,770,710号；同第5,773,001号；および同第5,877,296号に開示されている。

【0070】

抗体と細胞毒性薬とのコンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオン酸塩(SPDP)、イミノチオレン(IT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジピン酸ジメチルHCl等)、活性エステル(スベリン酸ジスクシンイミジル(disuccinimidyl succinate))、アルデヒド(グルタルアルデヒド等)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミン等)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等)、ジイソシアナート(トルエン(toluene)2,6-ジイソシアネート

10

20

30

40

50

等)、およびビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等)等の様々な二官能性タンパク質結合剤を使用して作製される。例えば、リシン免疫毒素を、Vitettaら, Science, 238:1098 (1987)に記載されるように調製できる。炭素-14-標識化1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドと抗体とをコンジュゲートさせるためのキレート剤の一例である。W094/11026を参照のこと。

【0071】

抗CD22抗体の共有結合修飾も本発明の範囲内にある。これらは、適切であれば、化学合成、または抗体の酵素的もしくは化学的切断により実施され得る。抗体の他の種類の共有結合修飾は、抗体の標的化アミノ酸残基と、選択された側鎖またはN-もしくはC-末端残基と反応可能な有機誘導体化剤とを反応させることにより、分子に導入される。抗体の好ましい種類の共有結合修飾は、当該分野で周知の手法により、抗体を、様々な非タンパク質性高分子(例えば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールまたはポリオキシアルキレン)のひとつと連結させることを含む。

10

【0072】

2. 医薬製剤および治療方法

B細胞型非ホジキンリンパ腫とは、悪性(癌性)B細胞リンパ球を原因とする大きいグループ(29を超える種類)のリンパ腫を含む用語であり、知られている種類のリンパ腫の大きなサブセットを占める。B細胞は、そのライフサイクルにおいて、複雑な細胞内シグナリングプロセスに応じて多くの変化を経ることが知られており、B細胞のライフサイクルの異なる段階において異なる種類のB細胞悪性腫瘍が生じ得ることがはっきりとしている。幹細胞段階では、急性リンパ球性白血病(ALL)またはリンパ芽球性リンパ腫/白血病が典型的に発達し得る。前駆B細胞は、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫/白血病を発達し得る。未熟B細胞の典型的な悪性腫瘍としては、非核切れ込み小細胞リンパ腫、および場合によりバーキット/非バーキットリンパ腫が挙げられる。抗原暴露前のB細胞は、典型的に、慢性リンパ球性白血病(CLL)または小リンパ球性リンパ腫を発達し、抗原暴露後は、典型的に、濾胞性リンパ腫、大細胞リンパ腫および免疫芽球性リンパ腫が見とめられる。侵襲性(成長が速い)および無痛性(indolent)(成長の遅い)リンパ腫を区別して、成長率によりB細胞リンパ腫を特徴付ける分類系もある。例えば、バーキット/非バーキットリンパ腫およびLCLリンパ腫は侵襲性グループに属し、無痛性リンパ腫としては、濾胞中心細胞リンパ腫(FCCL)、濾胞大細胞リンパ腫、および濾胞性核切れ込み小細胞リンパ腫が挙げられる。

20

30

【0073】

非ホジキンリンパ腫も、発達段階により特徴付けられる。段階I: 1つのリンパ節領域でのみ、またはリンパ節外の1つの領域もしくは器官のみで癌が見とめられる。ステージII: (1)横隔膜(呼吸を助ける肺下にある薄い筋肉)の同じ側にある2つ以上のリンパ節領域で癌が見とめられるか、または(2)リンパ節外の1つの領域もしくは器官およびその周辺のリンパ節においてのみ癌が見とめられるか、または(3)横隔膜の同じ側にある他のリンパ節領域も癌にかかっているかもしれない。段階III: 横隔膜の両側のリンパ節領域において癌が見とめられる。リンパ節領域付近の領域もしくは器官、および/または脾臓に広がっているかもしれない。段階IV: (1)リンパ系の外にある1つ以上の器官に広がっている;これらの器官付近のリンパ節において癌細胞が見とめられても見とめられなくてもよいが、または(2)リンパ系の外の1つの器官にのみ癌が広がるが、その器官から遠く離れているリンパ節が関与している。

40

【0074】

非ホジキンリンパ腫を含むB細胞悪性腫瘍の現行の治療オプションは、悪性腫瘍の種類および段階に依存する。典型的な治療計画としては、放射線療法(外部ビーム療法とも呼ばれる)、化学療法、免疫療法、およびこれらのアプローチの併用が挙げられる。有望なアプローチの1つは放射免疫療法(RIT)である。外部ビーム療法によれば、身体の限られた領域が照射される。化学療法では、治療は全身性であり、正常細胞に有害な影響を及ぼ

50

し、重度な毒性副作用を生じることが多い。標的化RITは、B細胞特異的抗体が、腫瘍の部位に毒性物質を送達するアプローチである。B細胞NHLを患う患者におけるRITの治療能力は、CD20、CD19、CD22およびHLA-DR10(Lym-1)を含む異なる標的を使用して示されてきた。より最近では、併用療法(CMT)が、固型腫瘍の治療のための技術として頻度が高まっており、薬剤による癌細胞の放射線感受性増強(radiosensitization)、および化学療法の直接的な細胞毒性影響を含む。NHLを治療するための最も一般的な化学療法計画は、シクロホスファミド-ヒドロキシドキシソルピシン-オンコピン(ビンクリスチン)-プレドニゾン(CHOP)併用療法である。侵襲性であるが初期のNHLのランダムな調査では、CHOP単独での治療と比べて、CHOPおよび区域照射で優れた結果が示された。その有望性に関わらず、外部ビーム照射が関与する治療の欠点は、NHLがほとんど場合に広く広がっているのに対して、外部ビーム照射が、身体の限られた領域にしか高い線量で送達されないことである。従って、CMTは、局所的に進行した悪性腫瘍に対して臨床的に有用であることが分かっている。

10

【0075】

別の現行アプローチは、NHLに対する全身照射の特定の送達(例えば、 ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1)を、追加の化学療法剤による全身照射感受性増強効果と組み合わせた併用放射免疫療法(CMRIT)である。CMRITでは、照射が連続的に送達されるため、低酸素な癌細胞は、治療の過程において、再度酸素を取り込むか、細胞サイクルの放射感受性 G_2/M 期を経て、治療の可能性をより高くし得る。さらに、CMRITは、第1にLym-1によるNHLの特異的標的化により、第2にタイミングにより特異性を提供する。これにより、増感剤が、RITにより標的化される部位においてのみ潜在的に相乗効果を与えて、従って、効力を最大化し、かつ毒性を最小化する。これまでのいくつかの異種移植研究から、RITの後に放射線合成機(Taxol)に24~48時間かけることで、相乗効果が改善したことが実証されている。

20

【0076】

CMRITは、NHLの治療のための最も有利な治療アプローチであると現在考えられているが、本発明の抗体は、単独で、よく許容されているRajiおよびRamosリンパ腫異種移植モデルにおいてテストした場合、腫瘍容量減少、治療率および全体的な生存率の点において優れた結果を生じることが実証されている。

【0077】

本明細書に記載する抗CD22抗体は、典型的に、全ての薬剤師に周知の医薬製剤の形態で投与される。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, (第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975)), 特に、Blaug, Seymourによる第87章を参照のこと。これらの製剤としては、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、オイル、脂質、無水吸収基質、水中油型または油中水型エマルジョン、エマルジョンカーボワックス(様々な分子量のポリエチレングリコール)、半固体ゲル、およびカーボワックスを含む半固体混合物が挙げられる。典型的な投薬形態は、静脈内(i.v.)経路による投与に適した滅菌かつ等張性の水性溶液である。医薬製剤中の本発明の抗体の濃度は、幅広く(すなわち、重量が、約0.1%未満から、通常、少なくとも約2%~最大20%~50%以上であり)、選択した特定の投与モードに応じて、液量、粘性等により主に選択される。

30

【0078】

本発明の組成物は、リポソームを介しても投与され得る。リポソームとしては、エマルジョン、発砲体、ミセル、不溶性単層、液晶、リン脂質分散液、ラメラ層(lamellar layer)等が挙げられる。これらの剤形では、送達する本発明の組成物は、リポソームの一部として、単独で、または所望の標的に結合する分子(抗体等)もしくはその他の治療的あるいは免疫原性組成物と共に取り込まれる。本明細書で使用するリポソームは、中性および負に荷電されたリン脂質ならびにステロール(コレステロール等)を一般的に含む標準的な小胞形成脂質から形成される。脂質の選択は、一般的に、例えば、血流中のリポソームの大きさ、酸不安定性、およびリポソームの安定性を考慮することにより導かれる。リポソームを調製するための様々な方法が利用可能であり、例えば、Szokaら *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 9:467 (1980)、米国特許第4,235,871号、同第4,501,728号、同第4,837,028号、

40

50

および同第5,019,369号に記載されている。

【0079】

本発明の抗体は、単独で、または他の治療計画(化学療法、放射免疫療法(RIT)、化学療法および外部ビーム照射(併用療法、CMT)、併用放射免疫療法(CMRIT)、または単独のものしくは組合せられたサイトカイン等)と組み合わせられて投与され得る。従って、本発明の抗CD22抗体は、非ホジキンリンパ腫を治療するための最も一般的な化学療法計画であるCHOP(シクロホスファミド-ヒドロキシドキシソルビシン-オンコピン(ビンクリスチン)-プレドニゾロン)と組み合わせられ得る。さらに、本明細書の抗CD22抗体は、抗CD19、抗CD20および他の抗CD22抗体を含む他の抗体(LymphoCideTM(Immunomedics, Inc.)またはLymphoCide Y-90等)と組み合わせられて投与され得る。例えば、Steinら, *Drugs of the Future* 18:997-1004 (1993); Behrら, *Clinical Cancer Research* 5:3304s-33314s, 1999(suppl.); Juweidら, *Cancer Res.* 55:5899s-5907s, 1995; Behrら, *Tumor Targeting* 3:32-40 (1998)、および米国特許第6,183,744号、同第6,187,287号、および同第6,254,868号を参照のこと。

【0080】

本発明により治療する患者は、悪性B細胞上でCD22を発現される。CD22抗原の存在は、免疫組織化学、FACS、標識化(例えば、放射標識化)抗-CD22抗体での結合アッセイ等の標準的な技術により確認できる。

【0081】

好ましい投与経路は、一定の期間にわたるボラスまたは持続点滴を介したものである(例えば、週に1度か2度の持続またはボラス点滴)。別の好ましい経路は、皮下注射である。投薬量は、標的とするB細胞悪性腫瘍の性質、形態、および段階、患者の性別、年齢、状態、これまでの治療経歴、他に使用している抗癌治療(例えば、放射能、化学療法、免疫療法等が挙げられる)、ならびに当業者に典型的に考えられる他の要因に応じる。例えば、非ホジキンリンパ腫患者は、本明細書に記載の抗CD22抗体を、約50~約1500 mg/m²/週、具体的には約100~約1000mg/m²/週、より具体的には約150~約500 mg/m²/週で受けられ得る。

【0082】

患者は、抗CD22抗体を使用して、腫瘍退化(例えば、固型腫瘍の場合には腫瘍の大きさ)、循環B細胞の表現型、または生検組織の表現型をモニタリングする等、標準的な技術によりモニタリングされ得る。

【0083】

本発明は、ヒト治療に言及して議論してきたが、本発明の抗体は、獣医学においても使用され得ることが理解されよう。例えば、ネコ悪性リンパ腫は、飼い猫に起こることが多く、ヒト非ホジキンリンパ腫と似た特徴を示す(Bertoneら, *Am. J. Epidemiol.* 156:268-73 (2002))。同様に、イヌは、様々なリンパ腫を発達することが知られている。従って、本明細書の抗体を使用して、ネコおよびイヌ悪性リンパ腫を治療できる。投薬量、および投与経路は、治療する動物種に応じ、それらの決定は十分に獣医の技術範囲内にある。

【0084】

本発明の更なる詳細を、以下の限定しない実施例に記載する。

【0085】

実施例

実施例で言及する市販の試薬は、特に示さない限り製造元の指示書に従って使用した。以下の実施例に開示する生成に加えて、モノクローナル抗体HB22-7(ATCC受託番号HB11349)を作製するハイブリドーマは、American Type Culture Collection, Rockville, MDから得ることができる。

【0086】

実施例 1

抗CD22モノクローナル抗体の作製

モノクローナル抗体(mAb)、HB22-7(IgG2b)、HB22-23(IgG2a)、HB22-33(IgM)、HB22-5(I

gG2a)、HB22-13(IgG2a)、HB22-22(IgA)、およびHB22-196を、Engelら、J Immunol 15:4710 (1993)、および米国特許第5,484,892号の方法に従って作製した。Tuscanoら、Blood 94:1382-1392 (1999)も参照のこと。しかし、他の方法を使用してもよい。簡単に言うと、HB22 mAbを、完全長CD22 cDNAで安定してトランスフェクトさせたマウス前B細胞系統300.19を免疫原として使用したハイブリドーマ技術により作製した。より具体的には、NS-1骨髓腫細胞と、完全長CD22cDNAで安定してトランスフェクトしたマウス前B細胞系300.19で3回免疫化したBalb/cマウス由来の脾臓細胞とを融合させて、CD22と反応する33のmAbを作製した。CD22cDNAでトランスフェクトされたマウスL細胞とは反応するが、非トランスフェクト細胞とは反応しないmAbを作製するハイブリドーマを、2回クローニングし、上清または腹水を生成するために使用した。マウスモノクローナル抗体アイソタイプ決定キット(Amersham, Arlington Heights, Ill)を使用して、mAbアイソタイプを決定した。Affi-GelプロテインA MAPS IIキット(Bio-Rad, Richmond, Calif.)を使用してIgGmAbを精製した。腹水のオイグロブリン分画を含むHB22-33 mAb(IgM)を、蒸留水に対する大々的な透析により沈降させ、SDS-PAGE分析により本質的に純粋なmAbであることが示された。米国特許第5,484,892号の表IIに開示するように、mAbであるHB22-7、HB22-22、HB22-23およびHB22-33は、Daudi、RajiおよびJurkat細胞とCD22トランスフェクトCOS細胞との結合を完全にブロックした(80~100%)。mAbであるHB22-5、HB22-13、HB22-24、およびHB22-28は、付着を部分的にブロックした(20~80%)。

10

【0087】

リガンド結合を仲介するCD22上の領域を、「ワークショップ(Workshop)」CD22ブロッキングmAb、ならびにCD22上の5つの異なるエピトープ(エピトープA、B、C、DおよびE)を識別するmAbのパネルを使用したmAb交差阻害調査により特徴決定した(Schwartz-Albiezら、"The carbohydrate moiety of the CD22 antigen can be modulated by inhibitors of the glycosylation pathway")。ワークショップmAbの結合特異性は、図3に図示している。Leukocyte Typing IVに掲載のWhite Cell Differentiation Antigens, Knappら編、Oxford University Press, Oxford, p. 65 (1989)。本明細書のモノクローナル抗体のうちの3つ、HB22-7、HB22-22およびHB22-23が、CD22上の非常に近いまたは同じエピトープに結合することが分かった。これらおよびその他のブロッキング抗体のエピトープマッピングの結果は、Tedderら、Annu. Rev. Immunol. 15:481-504 (1997)に開示されている。治療として提案されている他の抗CD22抗体とは異なり、本発明のブロッキング抗体は、hCD22アミノ酸配列の最初の2つのIg様ドメイン内のエピトープに結合する。

20

30

【0088】

実施例2

RajiおよびRamosリンパ腫異種移植実験

本実施例は、個々のRajiおよびRamosリンパ腫異種移植実験から得た結果を説明する。ヌードマウス異種移植片は、前臨床評価のための重要なツールである。リンパ腫細胞系であるRajiおよびRamosを利用した、ヒト非ホジキンリンパ腫(NHL)異種移植片を担持するヌードマウスは、NHLの治療の効力を評価するのに有益であることが分かっている。(Buchsbäumら、Cancer Res. 52(23):6476-6481 (1992)、およびFlavellら、Cancer Res. 57:4824-4829 (1997))

40

材料および方法

試薬 . キャリアを含まない⁹⁰Y(Pacific Northwest National Laboratory, Richland, WA)および¹¹¹In(Nordion, Kanata, Ontario, Canada)を、希釈HCl中の塩化物として購入した。Lym-1(Tecniclone, Inc Tustin, CA)は、ヒトパーキットリンパ腫細胞核で免疫化されたマウスにおいて生成されるIgG_{2a} mAbである。Lym-1は、悪性腫瘍B細胞上の細胞表面31-35 kD抗原を認識し、80%を上回るヒトB細胞NHLと反応する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、95%を上回る純度の単量体IgGを必要とする事項(specifications)に従って、Lym-1純度を評価した。先に記載されているように(O'Donnellら、Cancer. Biother. Radiopharm. 13:251-361 (1998))、⁹⁰Y-DOTA-ペプチド-Lym-1を調製した。HPLC、TLCおよび酢酸セルロース電気泳動による評価により、凝集内容物が5%未満で放射化学的純

50

度が98%の ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1が調製されたことが明らかになった。

【0089】

先に記載されているように(Tuscanoら, Blood 94:1382-1392 (1999)), プロテインAセファロースFast Flowカラム(Pharmacia)を使用して、抗CD22 mAb、HB22-7を調製した。HB22-7純度は、HPLCおよびフローサイトメトリーで測定し、純度が>95%であることが分かった。生理学的性質を、アポトーシス誘導のフローサイトメトリー利用型分析(Apo-Tag, Pharmacia)により決定し、先に公開されている結果(Tuscanoら、前掲)と一致することが分かった。ActiClean ET0Xカラム(Sterogene)を使用して内毒素除去を達成し、最終的に測定された内毒素レベルは<0.15内毒素ユニット(EU)/mg mAb(Bio Whitaker)であった。Lym-1およびHB22-7 mAbは、マウス、ウイルス、マイコプラズマ、真菌および細菌汚染、ならびに内毒素、発熱物質およびDNA内容物、ならびに動物における全般的に安全なテストについて、MAP(マウス抗体生成)ガイドラインと合致した。

【0090】

細胞系およびスキッチャード分析. American Type Culture Collection (ATCC, Gaithersburg, MD)から、RajiおよびRamosバーキットリンパ腫細胞系を購入した。両方の細胞系を、先に記載されているように(Tuscanoら、前掲)、HB22-7 mAbを利用したフローサイトメリー法により、CD22発現について染色した。細胞系は、10%ウシ胎仔血清を 0.5×10^6 細胞/mlで補充したRPMI 1640中に維持させた。RajiおよびRamos細胞を使用したスキッチャード分析は、先に記載されるように実施した(Scatchard, G., Ann. of NY Acad Sci. 51:660 (1947))。簡単に言うと、HB22-7を、クロラミンT方法により ^{125}I で標識化した(比活性は $1.1 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$)。順次希釈した非標識化HB22-7を利用して、競合結合アッセイを実施した。

【0091】

マウス調査. 7~9週齢のメス胸腺欠損BALB/c nu/nuマウス(Harlan Sprague-Dawley)を、University of California, Davis動物ケアガイドラインに従い、通常食餌を自由に与え、病原体の無い条件下で維持させた。1つのケージにつき5匹のマウスをハウジングした。対数増殖期にRajiまたはRamos細胞を収穫した； $2.5 \sim 5.0 \times 10^6$ 細胞を、各マウスの腹部の両側に皮下注射した。腫瘍が $28 \sim 328 \text{ mm}^3$ になった移植の3週間後に調査を開始した。グループは、未処置、 $125 \mu\text{Ci}$ のRITのみ、 1.4 mg のHB22-7のみ、またはRITおよびHB22-7の組合せ(HB22-7を、RITの24時間前、RITと同時に、もしくはRITの24時間後に投与)で構成した。周囲照射を最小限にするために、 ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1での処置の後、1週間は毎日、その後は週に2回、床(bedding)を変えた。

【0092】

抗腫瘍(tumoricidal)効果. 半楕円体(hemielipsoids)の公式(DeNardoら, Clin. Cancer Res. 3:71-79 (1997))に記載されるように、腫瘍容積を計算した。最初の腫瘍容積は、処置前日の容積と規定した。各グループについて、測定日に毎回、平均腫瘍容積を計算した；完全に退化した腫瘍は容量が0であるとした。腫瘍反応は以下のように分類した：C、治癒(腫瘍が消え、84日間の調査の終了時に再成長しなかった)；CR、完全退化(腫瘍は少なくとも7日間消えたが、その後再成長した)；PR、部分的退化(腫瘍容積が少なくとも7日間50%以上減少したが、その後再成長した)。

【0093】

統計的分析. Kruskal-Wallis順位和テストを使用し、反応を「無し」、「PR」、「CR」および「治癒」として順位付けて、処置グループ間の反応の差を評価した。Kruskal-Wallisテストを使用して生存時間も評価した。腫瘍容積は、3つの時点で比較した：すなわち、1月目(26~9日目)；2月目(54~57日目)；および調査終了時(84日目)。腫瘍に関連した原因により動物を屠殺した場合、最後の容量を繰り越して、その後の時点の分析において使用した。分散分析を使用して、処置グループ間の差をテストした。p値は、両側名目(nominal)p値を表す。統計的に有意に異なることが分かったグループのサブセット内においてのみテストすることにより、多重比較を防ぐ。

【0094】

10

20

30

40

50

結果スキャッチャード分析

スキャッチャード分析を利用して、HB22-7の結合親和性、およびRamosおよびRaji細胞上のCD22受容体の数をア評価した。最大結合% (Bmax)、解離定数 (Ka)、および細胞あたりの結合抗体数について細胞をアッセイした。表 1 に示す結果は、2つの実験の平均である。

【表 1】

表 1

I. パラメータ	細胞系統	
	Raji	Ramos
Bmax	53.5±0.9%	21.0±1.3%
R ²	0.954	0.926
Ka	1.3±0.08×10 ⁹	5.95±1.0×10 ⁸
抗体/細胞	118,000	43,000

10

【0095】

スキャッチャード分析(表 1)は、Raji細胞対Ramos細胞についてそれぞれ、細胞あたりに結合したHB22-7抗体の数およびBmaxがほぼ2.5倍増加したことを示し、Kaが2倍増加したことを示した。

【0096】

20

全身オートラジオグラフィー

HB22-7特異的腫瘍ターゲッティングを評価するために、¹¹¹In-2IT-BAD-抗-CD22(HB22-7)を注射した腫瘍担持ヌードマウスの全身オートラジオグラフィーを実施した。先に記載されるように(DeNardoら, Cancer 3:71-79 (1997))、注射の48時間後、マウスを屠殺し、切断し、オートラジオグラフィーにかけた(図 2)。オートラジオグラフィーにより、Raji腫瘍化マウスにおける集中的な腫瘍局所化、およびRamos腫瘍化マウスにおける中度の局所化が明らかになった。このターゲッティング調査は、Rajiと比較して、Ramos細胞に対するHB22-7の結合がより少ないことを示したスキャッチャード分析と一致する。しかし、Ramos腫瘍の迅速な成長、および中心壊死と思われるものも、Ramosのターゲッティングが明らかに劣ることの原因であり得る。

30

【0097】

RITおよびCMRITの効力

初期治験(081500)では、125μCiの⁹⁰Y-DOTA-ペプチド-Lym-1を単独で、またはHB22-7(1.4 mg)との組合せで、RITの24時間前、RITと同時、またはRITの24時間後に添加して利用した(図 3)。本治験では、RITのみで処置したグループ(9匹のマウス)以外は、1グループにつき5匹のマウス、および5匹の未処置対照とした(マウスの頭数は表 2 に示す)。

【表 2】

表 2

治験	処置グループ					
	No Tx	HB22-7	RIT	-24	@RIT	+24
081500	5	4	9	5	5	5
101600	5	6	5	5	3	5
011601	-	5	4	-	9	7
032701	-	5	2	-	3	12
052401	3	-	3	-	-	-
060401	5	5	-	-	-	-
071701	7	5	-	-	-	4
092101	4	-	-	-	-	-
102401	13	-	-	-	-	-
合計	42	30	23	10	20	33

40

50

【0098】

⁹⁰Y-2IT-BAD-Lym-1での同様のRaji異種移植調査から予測されるように、RITのみの場合は、21日目までに最大平均腫瘍容積減少が生じ、その後腫瘍容積が増加した。⁹⁰Y-2IT-BAD-Lym-1(RIT)およびHB22-7(CMRIT)で処置した異種移植片は、より大きくより持続した平均腫瘍容積減少を示し、これは、HB22-7がRITと同時に、およびRITの24時間後に投与された場合に最大であった。驚くべきことに、単独で投与されたHB22-7は、2～3週間目に平均腫瘍容積の安定化を生じ、その後緩やかで持続した腫瘍容積減少を生じた。

【0099】

いくつかの追加の複製試験を実施し、高度に再現可能な結果を得た(表2)。全ての試験から得たデータを編纂し、画像的に比較した場合、最初の調査と大きく一致した結果を示した(図4)。初期腫瘍容積減少は、同じく、RITと同時にまたはRITの24時間後にHB22-7が投与された場合に21日目ごろに最大であった。HB22-7のみで処置したマウスでも、処置の2週間後に始まる腫瘍成長の安定化、その後の緩やかな持続性の腫瘍容積減少が、全ての後続試験において繰り返された。分散分析を使用して、30日目の処置グループを全て検査した場合、差が非常に有意であった($p < 0.001$)。60日目の全ての処置グループの容積減少の分析では、有意な差は見とめられなかったが($p = 0.39$)、84日目における差異は同じく有意であった($p = 0.0003$)。画像的に見とめられた結果は、RIT/CMRITグループにおける容積減少の差が高度に再現可能であること、ならびにHB22-7単独の場合および未処置対照の場合と異なることは示したが、RITのみの処置グループ(CMRITを含む)の場合との全ての評価時点(30、60および84日目)における容積減少の比較では、有意な差は示さなかった($p \geq 0.5$)。追加のCMRIT試験を、HB22-7をRITの48時間後および72時間後に投与して実施した。RITとHB22-7との投与の間隔が開いても、HB22-7がRITと同時におよびRITの24時間後に投与された試験と比べて、腫瘍容積減少は改善されなかった(データは図示せず)。

【0100】

反応および治癒率は、腫瘍容積に対する治療効果と一致していた(図5)。⁹⁰Y-DOTA-ペプチド-Lym-1のみでの処置では、48%PR、13%CR、および13%の治癒率が得られた。CMRITグループでは、全体的な反応速度は、HB22-7およびRITが同時に投与された場合に最大となり、45%PR、15%CRおよび25%の治癒が得られた。しかし、CMRITグループにおいては、RITの24時間後にHB22-7が投与された場合に治癒率が最大(39%)であり、これは、未処置の場合(29%)、RITのみの場合(13%)、24時間前の場合(10%)、および同時の場合(25%)の処置グループにおいて見とめられた治癒率に有利に匹敵した。Kruskal Wallisテストを使用して、全ての処置グループにおいて(治癒はCRよりも上位、CRはPRよりも上位として順位付けして)反応の程度を検査した場合、差異は統計的に有意であった($p = 0.01$)。未処置対照に対する個々の比較は、RITのみの場合($p = 0.06$)およびRITの24時間前にHB22-7を投与する場合($p = 0.16$)以外は、全て統計的に有意であった($p < 0.05$)。積極的処置グループ(RITのみ、CMRIT、およびHB22-7)のみを比較した場合には有意な差は無かったが($p = 0.18$)、同時および24時間後にHB22-7で処置したCMRITグループは、最良な観察反応パターンを有していた。興味深いことに、HB22-7のみで処置したグループは、最も高い治癒率を有し(47%)、これは、未処置対照と比べて有意な改善である($p < 0.05$)。

【0101】

腫瘍容積退化および治癒率は、同様パターンの生存率に反映された。84日間の調査期間の終了時には、38および42%の未処置およびRITのみのグループがそれぞれ生存していた(図6)。CMRIT処置グループでは、HB22-7が、RITと同時にまたはRITの24時間後に投与された場合にそれぞれ、生存率が67および50%に上昇した。Kruskal Wallisを使用した生存率分析は、全てのグループの比較について有意であった($p < 0.05$)。反応速度分析と同様に、RITグループにおける生存率の比較は、有意な差($p = 0.41$)を明らかにしただけではなく、RITと同時にまたはRITの24時間後にHB22-7を投与した場合に一貫して見とめられるこれらのグループにおける最良の生存率を明らかにした。

【0102】

最良の全体生存率である76%は、HB22-7のみで処置したグループにおいて見とめられ、

10

20

30

40

50

未処置対照と比較した場合に有意な差があった ($p=0.02$)。

【 0 1 0 3 】

毒性

血球数およびマウス体重によりそれぞれ、血液および非血液毒性を評価した(図 7 a ~ c)。RIT処置グループにおけるWBCおよび血小板の底値はそれぞれ、14~20および10~14日目であった。WBCおよび血小板復帰はそれぞれ、処置後28および21日後であった。WBCおよび血小板の底値は、150 μ Ciの ^{90}Y -2IT-BAD-Lym-1を利用した先の調査における観察と一致していた。RITの血液毒性は、HB22-7の同時投与により変化しなかった。HB22-7のみで処置したマウスにおいては、血液毒性は検出されなかった。全ての処置グループにおける単核細胞計数の分析から、HB22-7がRIT仲介型単核細胞底値に対して影響がないことが明らかになった(データは図示せず)。非血液毒性はマウス体重の変化により評価し、全ての処置グループにおいて等しいことが分かった(図 8)。いずれの処置グループにおいても毒性による死亡はなかった。

10

【 0 1 0 4 】

^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1薬物動態学

HB22-7を有するかまたは持たないRaji腫瘍化マウスにおける ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1の血液および全身クリアランスは同様であった(図 9)。血液生物学的 $T_{1/2}$ は、RITのみの場合には1.4時間であり、24時間前、同時および24時間後のグループの場合にはそれぞれ2.2、2.4および2.0時間であった。血液生物学的 $T_{1/2}$ は、RITのみのグループの場合には127時間であり、24時間前、同時および24時間後のグループの場合にはそれぞれ133、87および103時間であった。全身 $T_{1/2}$ は、RITの場合には246時間であり、24時間前、同時および24時間後のグループの場合にはそれぞれ207、207および196時間であった。HB22-7をRITに添加しても、 ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1の薬物動態は変化しなかった。

20

【 0 1 0 5 】

議論

Raji異種移植調査は、抗CD22 mAb(HB22-7)が、アポトーシスを増強するためにRITと組み合わせられた場合に追加的なもしくは相乗作用的な影響を生成するか否か、および/または低線量率の照射によりDNAダメージが誘導されるか否かを判断するように設計した。Raji異種移植ヌードマウスモデルは、 ^{90}Y -2IT-BAD-Lym-1 RITのみを使用した場合のRITの毒性およびRITの効力を評価する際に有用であることが分かった(O'Donnellら, Cancer Biotechnology and Radiopharmaceuticals 13:351-361 (1998))。この前臨床モデルにおける反応は、ヒト臨床試験における有意な効力に反映された(O'Donnellら, Anticancer Res. 20:3647-55 (2000); O'Donnellら, J. Nucl. Med. 40:216 (1999)(Abstract))。

30

【 0 1 0 6 】

本実施例に記載した調査では、 ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1(125 μ Ci)への抗CD22 mAb HB22-7の添加により、毒性を全く変えることなくRITの効力が増強した。150および200 μ Ciの ^{90}Y -2IT-BAD-Lym-1での先のRaji異種移植調査では、本調査において見とめられた反応および治癒率に匹敵する反応および治癒率が生成された(O'Donnellら、前掲)。2IT-BADリンカーでのこれらの先の調査に基づき125 μ Ci用量の ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1を選択した。2IT-BADでの先の調査では200 μ Ci用量において最大の効力が示されたが、125 μ Ciを選択したのは、HB22-7がRITに対して相乗作用的または追加的であり、低い用量によりこれらの効果のより良い評価が得られるという仮説に基づいている。本実施例の調査では、リンパ腫異種移植モデルにおいてこれまで検査されていない新規リンカー(DOTA-ペプチド)を利用した。DOTA-ペプチドリナーは、結合していない放射性医薬品の肝臓分解が増強されて、より都合の良い生物分布が得られるように設計した。腫瘍特異的摂取は、本調査において詳細には評価しなかったが、125 μ Ciの ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1のみの場合に見とめられた毒性プロファイルは許容可能であり、処置に関連した死亡も無く、白血球および血小板の底値は予測可能であった。

40

【 0 1 0 7 】

アポトーシス誘発およびシグナリング効果を示すin vitro調査に基づいてHB22-7を選択

50

した(Tuscanoら, Blood 94:1382-1392 (1999))。利用したHB22-7の治療用量は、経験的なものであるが、アポトーシスをin vitroで誘発するのに有効であることが示された量に基づき、これをマウスモデルに外挿した。さらに、HB22-7の用量を公式化する際には、ヒト臨床試験において使用される等量(ヒト対マウスの体表面積の差について調整した量)のRituximab(登録商標)を考慮した。Rituximab(登録商標)の最適用量は現時点で定義されていないとはいえ、これがリンパ腫の治療に対して効力が示された唯一の入手可能なネイキッドmAbであるという事実に基づき、Rituximab(登録商標)用量への近似化を利用した。

【0108】

HB22-7のみ、RITおよびHB22-7の組合せの効力、ならびに3つの異なる配列組合せの効果を評価するように調査を設計した。⁹⁰Y-DOTA-ペプチド-Lym-1のみの場合に見とめられた腫瘍容積減少は、タイミング、大きさ、および反応持続期間の点で、⁹⁰Y-2IT-BAD-Lym-1での先の調査と一致していた(O'Donnellら, 1998、前掲)。RITのみの場合には、治療の14日後に腫瘍容積に約50%の減少が生じた。最大容積減少のおよその時点(21~30日目)において評価する場合、HB22-7をRITに添加することで、配列特異的に、反応の大きさが有意に増強した。RITと同時にまたはRITの24時間後に投与された場合に、HB22-7の添加は最も有効であると思われる。容積減少の特徴的なパターンは高度に再現可能であった。個々の複製試験により、腫瘍容積減少の同様のパターンおよび大きさが示された。腫瘍容積の改善された減少は、優れた反応速度および生存率に反映された。RITのみの場合には13%CRおよび13%治癒率が得られ、HB22-7を添加した場合には、RITと同時に投与した際には治癒率が25%まで上昇し、HB22-7をRITの24時間後に投与した際には39%まで上昇した。

【0109】

第2のモノクローナル抗体をRITと組み合わせたのはこれが最初であり、毒性を上昇させることなく効力を増強するよく定義された生理学的性質を有するモノクローナル抗体または他の剤に利用性がある可能性を示す。

【0110】

驚くべきことに、HB22-7のみで処置したマウスは、他の全ての処置グループと比較して、目覚しい腫瘍容積減少、ならびに優れた治癒率および生存率を示した。同じく、いくつかの個々の試験が、初期腫瘍容積安定化が持続し、腫瘍容積減少が処置の約14日後に開始するという、高度に一致する結果を生じた。これは、いずれの処置グループにおいても見とめられる最良治癒率および全体生存率に反映した。

【0111】

結果的に、本発明の抗体は、単独で投与された場合、現在NHLの治療のために最も進化した治療アプローチであると考えられているCMRITを含む他の治療計画と比べて、腫瘍容積減少、治癒率および全体生存率の点で優れた結果を提供することが実証された。

【0112】

実施例3

抗CD22抗体の配列分析

V_Hおよび軽鎖遺伝子利用

RNeasyミニキット(Qiagen Chatsworth, CA)を使用して、 $1 \sim 10 \times 10^5$ ハイブリドーマ細胞から、細胞質RNAを抽出した。まずオリゴ-dTプライマー(dT₁₈)およびSuperscriptキット(Gibco BRL, Gaithersburg, MD)を使用して、細胞質RNAから鎖cDNAを合成した。1 μ lのcDNA溶液を、V_H遺伝子のPCR増幅用の鋳型として使用した。10 mM Tris-HCl(pH 8.3)、50 mM KCl、1.5 mM MgCl₂、200 μ M dNTP(Perkin Elmer, Foster City, CA)、50 pmolの各プライマー、および5UのTaqポリメラーゼ(ISC Bioexpress, Kaysville, UT)からなる100 μ l容量の反応混合液中でPCR反応を実施した。増幅は、30サイクル(94℃にて1分間、58℃にて1分間、72℃にて1分間；サーモサイクラー(Perkin Elmer))で行った。先に記載された(Kantorら, J. Immunol. 158:1175-86 (1996))無差別なセンス5'V_Hプライマー(Ms V_HE: 5' GGG AAT TCG AGG TGC AGC TGC AGG AGT CTG G 3'; 配列番号2)、およびC μ コード領域(プライマーC μ -in: 5' GAG GGG GAC ATT TGG GAA GGA CTG 3'; 配列番号3)またはC₁領域(プライマーC₁: 5' GAG TTC CAG GTC ACT GTC ACT GGC 3'; 配列番号4)に相

補的なアンチセンスプライマーを使用して、 V_H 遺伝子を増幅した。

【0113】

センス V プライマー[5' ATG GGC (AT)TC AAG ATG GAG TCA CA(GT) (AT)(CT)(CT) C(AT)G G 3'; 配列番号5]、およびC アンチセンスプライマー(5' ACT GGA TGG TGG GAA GAT G 3'; 配列番号6)を使用して、軽鎖cDNAを増幅した。

【0114】

異なるセンス V プライマー(5' ATG AAG TTG CCT GTT AGG CTG TTG GTG CTG 3'; 配列番号7)を使用して、HB22-33軽鎖配列を増幅した。

【0115】

増幅したPCR生成物を、QIAquickゲル精製キット(Qiagen)を使用してアガロースゲルから精製し、AmpliTaQ DNAポリメラーゼ、および初期PCR増幅と同じプライマーで、Perkin Elmer Dye Terminator配列決定システムを使用して増幅した後に、ABI 377 PRISM DNAシーケンサーを使用して両方向に直接配列決定した。 V_H および軽鎖領域を全て、センスおよびアンチセンスDNA鎖の両方について完全に配列決定した。

【0116】

抗CD22モノクローナル抗体HB22-5、HB22-7、HB22-13、HB22-23、HB22-33およびHB22-196についての、 V_H および V アミノ酸配列のアライメントはそれぞれ、図10および17に示す。図11~16は、ハイブリドーマHB22-5(配列番号8および9)、HB22-7(配列番号10および11); HB22-13(配列番号12および13); HB22-23(配列番号14および15); HB22-33(配列番号16および17); ならびにHB22-196(配列番号18および19)から得た抗CD22 Abについての重鎖 V_H -D- J_H 接合配列のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を示す。図18~23は、ハイブリドーマHB22-5(配列番号20および21); HB22-7(配列番号22および23); HB22-13(配列番号24および25); HB22-23(配列番号26および27); HB22-33(配列番号28および29); ならびにHB22-196(配列番号30および31)から得た抗CD22 Abについての軽鎖V-J定常領域接合配列についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列を示す。

【図面の簡単な説明】

【0117】

【図1】Ig様ドメイン(ドメイン1~7)の境界を示した、ヒトCD22(hCD22)のアミノ酸配列を示す。

【図2】 ^{111}In -2IT-BAD-抗CD22(HB22-7)を注射したRajiおよびRamos腫瘍担持ヌードマウスの全身オートラジオグラフィー。注射して48時間後にマウスを屠殺し、オートラジオグラフィーにかけた。上部画像は、Raji腫瘍化マウス、下部画像はRamos腫瘍化マウスである。

【図3】未処置の、または125 μCi ^{90}Y -DOTA-ペプチド-Lym-1(RIT)単独、抗CD22単独(HB22-7)、もしくは治験081500におけるRITおよびHB22-7(CMRIT)の3つの異なる配列で処置した、Raji異種移植マウスにおける腫瘍容積の時間的評価。腫瘍容積は、週に3回評価した。各処置グループについてマウスの頭数は表にした(表2)。

【図4】全ての個々の異種移植治験において見とめられた腫瘍容積の総括的な分析。治験は、図2に示すように実施した。各治験についてのマウスの頭数は表にした(表2)。

【図5】図2に示すように処置したRaji異種移植マウスについての反応および治癒率。腫瘍反応は以下の通りに分類した: C、治癒(腫瘍が消え、84日間の調査の終了時まで再成長しなかった); CR、完全退化(regression)(腫瘍は少なくとも7日間消えたが、その後再成長した); PR、部分的退化(腫瘍容積が少なくとも7日間50%以上減少したが、その後再成長した)。データは、全ての個々の治験の結果を表す。

【図6】図2に示すように処置したRaji異種移植マウスについて、全体的な生存率を評価した。腫瘍量(tumor burden)が2000 mgを超えた場合に、または84日間の治験の終了時に、マウスを安楽死させた。データは、全ての個々の治験の結果を表す。

【図7】図2に示すように処置したRaji異種移植マウスにおける白血球(WBC)(図7b)、赤血球(RBC)(図7c)および血小板計数(図7a)を週に2回測定することにより、血液学的毒性を評価した。RITのみの場合と比較すると、CMRITグループに血液学的毒性の差は無

10

20

30

40

50

かった。さらに、HB22-7のみで処置されたマウスでは血液学的毒性は見とめられなかった。

【図 8】図 2 に示すように処置したRaji異種移植マウスの体重を週に 2 回測定することにより、非血液学的毒性を評価した。5 つ全ての異種移植治療における治療グループのいずれにおいても有意な体重の差はなかった。

【図 9】RITでの治療開始後 5 日間の毎日、全身(WB)および血液中の放射活性を測定することにより、RITクリアランスを評価した。結果は、 ^{90}Y の $T_{1/2}$ に基づく遅延について調節した後に報告した。CMRIT処置グループのいずれにおいても有意なRITクリアランスの差はなかった。

【図 10】リガンド結合をブロックする抗CD22抗体(Ab)の V_H アミノ酸配列分析。各Abについての、アミノ酸番号付け、およびコード配列の由来源の特定は、Kabatら(Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Government Printing Office, Bethesda, MD, 1991)の慣例によるものであり、ここでアミノ酸1~94位、CDR1および2、ならびにFR1、2および3は、 V_H 遺伝子にコードされる。5'PCRプライマーと重複する配列は図示していない。点は、類似アミノ酸配列のアライメントを最大化するために配列に挿入されたギャップを示す。配列中のギャップは、明確化のために、 V_H 、DおよびJセグメントの間に導入した。図示した配列のランク順は、HB22-5配列に対する関連性に基づいた。

【図 11】ハイブリドーマHB22-5(配列番号 8 および 9)から得た抗CD22 Abについての重鎖 V_H -D-J $_H$ 接合配列のヌクレオチド配列およびコードアミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は二重下線で示している。D領域配列は下線で示している。

【図 12】ハイブリドーマHB22-7(配列番号10および11)から得た抗CD22 Abについての重鎖 V_H -D-J $_H$ 接合配列のヌクレオチド配列およびコードアミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は二重下線で示している。D領域配列は下線で示している。

【図 13】ハイブリドーマHB22-13(配列番号12および13)から得た抗CD22 Abについての重鎖 V_H -D-J $_H$ 接合配列のヌクレオチド配列およびコードアミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は二重下線で示している。D領域配列は下線で示している。

【図 14】ハイブリドーマHB22-23(配列番号14および15)から得た抗CD22 Abについての重鎖 V_H -D-J $_H$ 接合配列のヌクレオチド配列およびコードアミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は二重下線で示している。D領域配列は下線で示している。

【図 15】ハイブリドーマHB22-33(配列番号16および17)から得た抗CD22 Abについての重鎖 V_H -D-J $_H$ 接合配列のヌクレオチド配列およびコードアミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は二重下線で示している。D領域配列は下線で示している。

【図 16】ハイブリドーマHB22-196(配列番号18および19)から得た抗CD22 Abについての重鎖 V_H -D-J $_H$ 接合配列のヌクレオチド配列およびコードアミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は二重下線で示している。D領域配列は下線で示している。

【図 17】リガンド結合をブロックする抗CD22 Abの軽鎖 V_L アミノ酸配列分析。各Abについての、アミノ酸番号付け、およびコード配列の由来源の特定は、Kabatら(前掲)の慣例によるものである。予測したシグナル配列切断部位に続くアミノ酸を1と番号付けた。点は、類似アミノ酸配列のアライメントを最大化するために配列に挿入されたギャップを示す。明確化のために、配列中のギャップを V_L 、Jセグメント、および定常領域(二重下線)配列の間に導入した。

【図 18】ハイブリドーマHB22-5(配列番号20および21)から得た抗CD22 Abについての軽鎖 V_L -J定常領域接合配列についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は、二重下線で示している。

【図 19】ハイブリドーマHB22-7(配列番号22および23)から得た抗CD22 Abについての軽鎖 V_L -J定常領域接合配列についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は、二重下線で示している。

【図 20】ハイブリドーマHB22-13(配列番号24および25)から得た抗CD22 Abについての軽鎖 V_L -J定常領域接合配列についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は、二重下線で示している。

【図21】ハイブリドーマHB22-23(配列番号26および27)から得た抗CD22 Abについての軽鎖V-J定常領域接合配列についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は、二重下線で示している。

【図22】ハイブリドーマHB22-33(配列番号28および29)から得た抗CD22 Abについての軽鎖V-J定常領域接合配列についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は、二重下線で示している。

【図23】ハイブリドーマHB22-196(配列番号30および31)から得た抗CD22 Abについての軽鎖V-J定常領域接合配列についてのヌクレオチド配列および推定アミノ酸配列。5'PCRプライマーと重複する配列は、二重下線で示している。

【配列表】

10

SEQUENCE LISTING

<110> THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA
TUSCANO, Joseph
TEDDER, Thomas

<120> TREATMENT METHODS USING ANTI-CD22
ANTIBODIES

<130> 39754-0951

<140> unassigned

<141> 2003-02-21

<150> US 60/420,472

<151> 2002-10-21

20

<150> US 60/359,419

<151> 2002-02-21

<160> 31

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 847

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 1

```

Met His Leu Leu Gly Pro Trp Leu Leu Leu Val Leu Glu Tyr Leu
 1      5      10      15
Ala Phe Ser Asp Ser Ser Lys Trp Val Phe Glu His Pro Glu Thr Leu
 20      25      30
Tyr Ala Trp Gly Gly Ala Cys Val Trp Ile Pro Cys Thr Tyr Arg Ala
 35      40      45
Leu Asp Gly Asp Leu Glu Ser Phe Ile Leu Phe His Asn Pro Glu Tyr
 50      55      60
Asn Lys Asn Thr Ser Lys Phe Asp Gly Thr Arg Leu Tyr Glu Ser Thr
 65      70      75      80
Lys Asp Gly Lys Val Pro Ser Glu Gln Lys Arg Val Gln Phe Leu Gly
 85      90      95
Asp Lys Asn Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile His Pro Val His Leu Asn
100      105      110
Asp Ser Gly Gln Leu Gly Leu Arg Met Glu Ser Lys Thr Glu Lys Trp
115      120      125
Met Glu Arg Ile His Leu Asn Val Ser Glu Arg Pro Phe Pro Pro His
130      135      140
Ile Gln Leu Pro Pro Glu Ile Gln Glu Ser Gln Glu Val Thr Leu Thr
145      150      155      160
Cys Leu Leu Asn Phe Ser Cys Tyr Gly Tyr Pro Ile Gln Leu Gln Trp
165      170      175
Leu Leu Glu Gly Val Pro Met Arg Gln Ala Val Thr Ser Thr Ser
180      185      190
Leu Thr Ile Lys Ser Val Phe Thr Arg Ser Glu Leu Lys Phe Ser Pro
195      200      205
Gln Trp Ser His His Gly Lys Ile Val Thr Cys Gln Leu Gln Asp Ala
210      215      220
Asp Gly Lys Phe Leu Ser Asn Asp Thr Val Gln Leu Asn Val Lys His
225      230      235      240
Thr Pro Lys Leu Glu Ile Lys Val Thr Pro Ser Asp Ala Ile Val Arg
245      250      255

```

30

40

Glu Gly Asp Ser Val Thr Met Thr Cys Glu Val Ser Ser Ser Asn Pro
 260 265 270
 Glu Tyr Thr Thr Val Ser Trp Leu Lys Asp Gly Thr Ser Leu Lys Lys
 275 280 285
 Gln Asn Thr Phe Thr Leu Asn Leu Arg Glu Val Thr Lys Asp Gln Ser
 290 295 300
 Gly Lys Tyr Cys Cys Gln Val Ser Asn Asp Val Gly Pro Gly Arg Ser
 305 310 315 320
 Glu Glu Val Phe Leu Gln Val Gln Tyr Ala Pro Glu Pro Ser Thr Val
 325 330 335
 Gln Ile Leu His Ser Pro Ala Val Glu Gly Ser Gln Val Glu Phe Leu
 340 345 350
 Cys Met Ser Leu Ala Asn Pro Leu Pro Thr Asn Tyr Thr Trp Tyr His
 355 360 365
 Asn Gly Lys Glu Met Gln Gly Arg Thr Glu Glu Lys Val His Ile Pro
 370 375 380
 Lys Ile Leu Pro Trp His Ala Gly Thr Tyr Ser Cys Val Ala Glu Asn
 385 390 400
 Ile Leu Gly Thr Gly Gln Arg Gly Pro Gly Ala Glu Leu Asp Val Gln
 405 410 415
 Tyr Pro Pro Lys Lys Val Thr Thr Val Ile Gln Asn Pro Met Pro Ile
 420 425 430
 Arg Glu Gly Asp Thr Val Thr Leu Ser Cys Asn Tyr Asn Ser Ser Asn
 435 440 445
 Pro Ser Val Thr Arg Tyr Glu Trp Lys Pro His Gly Ala Trp Glu Glu
 450 455 460
 Pro Ser Leu Gly Val Leu Lys Ile Gln Asn Val Gly Trp Asp Asn Thr
 465 470 475 480
 Thr Ile Ala Cys Ala Arg Cys Asn Ser Trp Cys Ser Trp Ala Ser Pro
 485 490 495
 Val Ala Leu Asn Val Gln Tyr Ala Pro Arg Asp Val Arg Val Arg Lys
 500 505 510
 Ile Lys Pro Leu Ser Glu Ile His Ser Gly Asn Ser Val Ser Leu Gln
 515 520 525
 Cys Asp Phe Ser Ser Ser His Pro Lys Glu Val Gln Phe Phe Trp Glu
 530 535 540
 Lys Asn Gly Arg Leu Leu Gly Lys Glu Ser Gln Leu Asn Phe Asp Ser
 545 550 555 560
 Ile Ser Pro Glu Asp Ala Gly Ser Tyr Ser Cys Trp Val Asn Asn Ser
 565 570 575
 Ile Gly Gln Thr Ala Ser Lys Ala Trp Thr Leu Glu Val Leu Tyr Ala
 580 585 590
 Pro Arg Arg Leu Arg Val Ser Met Ser Pro Gly Asp Gln Val Met Glu
 595 600 605
 Gly Lys Ser Ala Thr Leu Thr Cys Glu Ser Asp Ala Asn Pro Pro Val
 610 615 620
 Ser His Tyr Thr Trp Phe Asp Trp Asn Asn Gln Ser Leu Pro His His
 625 630 635 640
 Ser Gln Lys Leu Arg Leu Glu Pro Val Lys Val Gln His Ser Gly Ala
 645 650 655
 Tyr Trp Cys Gln Gly Thr Asn Ser Val Gly Lys Gly Arg Ser Pro Leu
 660 665 670
 Ser Thr Leu Thr Val Tyr Tyr Ser Pro Glu Thr Ile Gly Arg Arg Val
 675 680 685
 Ala Val Gly Leu Gly Ser Cys Leu Ala Ile Leu Ile Leu Ala Ile Cys
 690 695 700
 Gly Leu Lys Leu Gln Arg Arg Trp Lys Arg Thr Gln Ser Gln Gln Gly
 705 710 715 720
 Leu Gln Glu Asn Ser Ser Gly Gln Ser Phe Phe Val Arg Asn Lys Lys
 725 730 735
 Val Arg Arg Ala Pro Leu Ser Glu Gly Pro His Ser Leu Gly Cys Tyr
 740 745 750
 Asn Pro Met Met Glu Asp Gly Ile Ser Tyr Thr Thr Leu Arg Phe Pro

10

20

30

755 760 765
 Glu Met Asn Ile Pro Arg Thr Gly Asp Ala Glu Ser Ser Glu Met Gln
 770 775 780
 Arg Pro Pro Arg Thr Cys Asp Asp Thr Val Thr Tyr Ser Ala Leu His
 785 790 795 800
 Lys Arg Gln Val Gly Asp Tyr Glu Asn Val Ile Pro Asp Phe Pro Glu
 805 810 815
 Asp Glu Gly Ile His Tyr Ser Glu Leu Ile Gln Phe Gly Val Gly Glu
 820 825 830
 Arg Pro Gln Ala Gln Glu Asn Val Asp Tyr Val Ile Leu Lys His
 835 840 845

<210> 2
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

10

<400> 2
 gggaattcga ggtgcagctg caggagtctg g

31

<210> 3
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 3
 gagggggaca tttgggaagg actg

24

<210> 4
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 4
 gagttccagg tcactgtcac tggc

24

20

<210> 5
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 5
 atgggcwtca agatggagtc acakwyycwg g

31

<210> 6
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 6
 actggatggt gggaagatg

19

30

<210> 7
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 7
 atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg

30

<210> 8
 <211> 357

<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 8
gagggtgcagc tgcaggagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggagcttc aatgaagata 60
tcctgcaagg cttctgggta ctcattcact gactacacca tgaactgggt gaagcagagc 120
catggaaaga accttgagtg gattggactt cttcatcctt tcaatgggtg tactagctac 180
aaccagaagt tcaagggcaa ggccacatta tctgtagaca agtcatccag cacagccttc 240
atggagctcc tcagtctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagagggaca 300
ggtcggaact atgctatgga ctactggggt caaggaacct cagtcaccgt ctctca 357

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 9
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Thr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Leu Leu His Pro Phe Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Thr Ala Phe
65 70 75 80
Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Thr Gly Arg Asn Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115

10

<210> 10
<211> 351
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 10
gagggtgcagc tgcaggagtc tggacctggc ctggtggcgc cctcacagag cctgtccatc 60
acatgcaccg tctcagggtt ctcattaagc gactatgggt taaactgggt tcgccagatt 120
ccaggaaagg gtctggagtg gctgggaata atatggggtg atggaaggac agactataat 180
tcagctctca aatccagact gaacatcagc aaggacaact ccaagagcca agttttcttg 240
aaaatgaaca gtctgaaagc tgatgacaca gccaggtact actgtgccag agcccccgg 300
aatagggcta tggagtactg gggtaagga acctcagtca ccgtctctc a 351

<210> 11
<211> 117
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 11
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Ala Pro Ser Gln
1 5 10 15
Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr
20 25 30
Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ile Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45
Gly Ile Ile Trp Gly Asp Gly Arg Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60
Ser Arg Leu Asn Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Leu

30

```
<210> 12
<211> 363
<212> DNA
<213> homo sapiens
```

10

20

30

<210>	15
<211>	119
<212>	PRT

<213> homo sapiens

<400> 15
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Gly Ala Thr Trp Arg
 1 5 10 15
 Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Tyr
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Ala Glu Ile Arg Leu Lys Ser Asn Asn Tyr Ala Thr His Tyr Ala Glu
 50 55 60
 Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
 65 70 75 80
 Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Gly Ile Tyr
 85 90 95
 Tyr Cys Thr Arg Tyr Asp Gly Ser Ser Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

10

<210> 16

<211> 354

<212> DNA

<213> homo sapiens

<400> 16
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctggc ctctgtgaaac cttctcagtc tctgtctctc 60
 acctgctctg tcaciggcta ctccatcacc agtgggttatt actggaactg gatccggcag 120
 ccaggaaaca aactggaatg gatgggctac attaggtacg acggtagcaa taactaccga 180
 tctctcaaaa atcgaatctc catcactcgt gacacatcta agaaccagtt ttccaagttg 240
 ctgaagttga attctgtgac tactgaggac acagctacat attactgtgc aagagggggg 300
 attacggttg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 17

<211> 118

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 17
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 20 25 30
 Tyr Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 35 40 45
 Met Gly Tyr Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60
 Lys Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Leu Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Gly Ile Thr Val Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

30

<210> 18

<211> 366

<212> DNA

<213> homo sapiens

<220>
 <221> misc_feature
 <222> 173
 <223> n=I

<400> 18
 gaggtgcagc tgcaggagtc tggacctgac ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60
 tcctgtaagg cttctgggta ctcatcatt ggctattaca tgcactggct gaagcagagc 120
 catggaaaga gccttgagtg gattggagct gtaatccta acactgctgg tcntacctac 180
 aaccagaggt tcaaggacaa ggccatatta actgtagaca agtcatccaa cacagcctat 240
 atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgttc aagagtggac 300
 tatgatgact acgggtactg gttcttcgat gtctggggcg cagggaccac ggtcaccgtc 360
 tcctca

<210> 19
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

10

<400> 19
 Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ile Gly Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Leu Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Val Asn Pro Asn Thr Ala Gly Leu Thr Tyr His Gly Lys Ser
 50 55 60
 Leu Glu Trp Ile Gly Arg Val Asn Pro Asn Thr Ala Gly Leu Thr Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ser Arg Val Asp Tyr Asp Asp Tyr Gly Tyr Trp Phe Phe Asp Val Trp
 100 105 110
 Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

20

<210> 20
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 20
 aagatggagt cacagaccca ggtcttcgta tttctactgc tctgtgtgtc tgggtgctcat 60
 gggagtattg tgatgaccca gactcccaaa ttcttgcttg tatcaacagg agacagggtt 120
 accattacct gcaaggccag tcagactgtg actaatgatt tagcttggtg ccaacagaag 180
 ccagggcagt ctccctaaact gctgatatac tatgcatcca atcgctacac tggagtcctt 240
 gatcgcttca ctggcagtgg atatgggacg gacttcactt tcaccatcaa cactgtgcag 300
 gctgaagacc tggcagttta tttctgtcag caggattata gctctcctct cacgttcggt 360
 gctgggacca agctggaact gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 410

<210> 21
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

30

<400> 21
 Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
 1 5 10 15
 Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
 20 25 30
 Val Ser Thr Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Thr

```

      35          40          45
Val Thr Asn Asp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
      50          55          60
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
      65          70          75          80
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Asn
      85          90          95
Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
      100          105          110
Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
      115          120          125
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
      130          135

```

<210> 22
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

10

```

<400> 22
aagatggagt cacagaccca ggtcttcgta tttctactgc tctgtgtgtc tgggtgctcat 60
gggagtattg tgatgaccca gactcccaaa ttctgtcttg tatcagcagg agacaggatt 120
accttaacct gcaaggccag tcagagtgtg actaatgatg tagcttggtta ccaacagaag 180
ccagggcagt ctctaaact gctgatatac tatgcatcca atcgctacac tggagtccct 240
gatcgcttca ctggcagtgg atatgggacg gatttcactt tcaccatcag cactgtgcag 300
gctgaagacc tggcagttta tttctgtcag caggattata ggtctccgtg gacgttcggt 360
ggaggcacca agctggaaat caaacgggct gatgctgcac caactgtatc 410

```

<210> 23
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

```

<400> 23
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
  1          5          10          15
Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
      20          25          30
Val Ser Ala Gly Asp Arg Ile Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
      35          40          45
Val Thr Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
      50          55          60
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
      65          70          75          80
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
      85          90          95
Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
      100          105          110
Arg Ser Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      115          120          125
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
      130          135

```

20

<210> 24
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

```

<400> 24
aagatggagt cacagaccca ggtcttcgta tttctactgc tctgtgtgtc tgggtgctcat 60
gggagtattg tgatgaccca gactcccaaa ttctgtcttg tatcagcagg agacagggtt 120

```

30

```

tccataacct gcaaggccag tcagagtgtg actaatgatg taacttggta ccaacagaag 180
ccagggcagt ctctaaatt gctgatatac ttgcatcca atcgctacac tggagtcctt 240
gatcgcttca ctggcagtg atatgggacg gatttcactt tcaccatcag cactgtgcag 300
gctgaagacc tggcagttta tttctgtcag caggattata gctctccgct cacgttcggt 360
gctgggacca agctggagct gaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 410

```

<210> 25
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

```

<400> 25
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
1      5      10      15
Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
20     25     30
Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35     40     45
Val Thr Asn Asp Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50     55     60
Lys Leu Leu Ile Tyr Phe Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65     70     75     80
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
85     90     95
Thr Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
100    105    110
Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
115    120    125
Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
130    135

```

10

<210> 26
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

20

```

<400> 26
aagatggagt cacagaccca ggtcttcgta tttctactgc tctgtgtgtc tgggtgctcat 60
gggagtattg tgatgaccca gactcccaaa ttctgtgttg tatcagcagg agacaggggtc 120
accataagct gcaaggccag tcagagtgtg agtaatgatg tagcttggta ccaacagaag 180
ccagggcagt ctctaaact gctgatatac tatgcatcca agcgtatata tggagtcctt 240
gatcgcttca ctggcagtg atatgggacg gatttcactt tcaccatcag cactgtgcag 300
gctgaagacc tggcagttta tttctgtcag caggatcata gctatccgtg gacgttcggt 360
ggagggacca agctggagat caaacgggct gatgctgcac caactgtatc 410

```

<210> 27
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

```

<400> 27
Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
1      5      10      15
Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
20     25     30
Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser
35     40     45
Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50     55     60
Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Lys Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
65     70     75     80
Arg Leu Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser

```

30

Thr Val Gln Ala⁸⁵ Glu Asp Leu Ala⁹⁰ Val Tyr Phe Cys Gln Gln⁹⁵ Asp His
 Ser Tyr Pro¹⁰⁰ Trp Thr Phe Gly Gly¹⁰⁵ Gly Thr Lys Leu Glu¹¹⁰ Ile Lys Arg
 Ala Asp Ala¹¹⁵ Ala Pro Thr Val¹²⁰
 Ala¹³⁰ Ala¹³⁵

<210> 28
 <211> 419
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 28
 atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttctgtcttc cagcagtgat 60
 gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtccagag ccttgtacac agtaatggaa acacctatctt acattgggtac 180
 ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgactcaca aagtttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccg ataggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgtcttc aaagtacaca tgttccgtac 360
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgggctg atgctgcacc aactgtatc 419

<210> 29
 <211> 139
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

<400> 29
 Met Lys Leu Pro Val⁵ Arg Leu Leu Val¹⁰ Leu Met Phe Trp Ile¹⁵ Pro Ala
 Ser Ser Ser Asp Val²⁰ Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val²⁵
 Ser Leu Gly³⁰ Asp Gln Ala Ser Ile³⁵ Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu
 Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys
 Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu
 Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val¹³⁰
 135

<210> 30
 <211> 410
 <212> DNA
 <213> homo sapiens

<400> 30
 aagatggagt cacagaccca ggtcttcata tccatactgc tctgggtata tggagctgat 60
 ggggaacattg taatgaccca atctcccaaa tccatgtcca tgtcagtagg agagaggggtc 120
 accttgacct gcaaggccag tgagaatgtg gttacttatg ttctctggta tcaacagaaa 180
 ccagagcagt ctctaaact gctgatatac ggggcatcca accgggtacac tgggggtcccc 240
 gatcgcttca caggcagtggt atctgcaaca gatttcactc tgaccatcag cagtgtgcag 300
 gctgaagacc ttgcagattt tcaactgtgga cagggttaca gctatccgta cacgttcgga 360
 gggggggacca agctggaaat aaaacgggct gatgctgcac caactgtatc 410

10

20

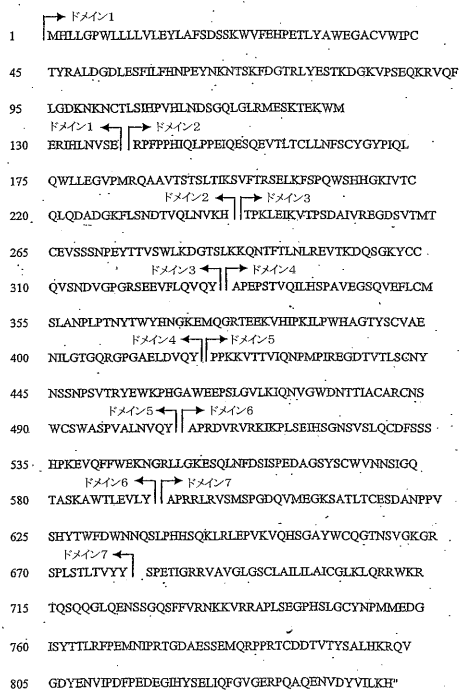
30

<210> 31
 <211> 135
 <212> PRT
 <213> homo sapiens

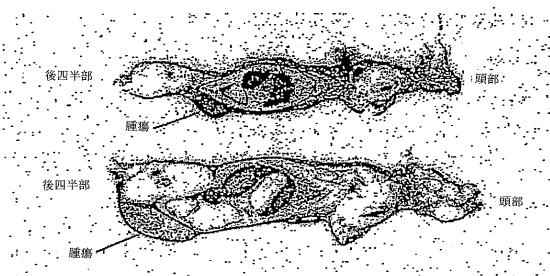
<400> 31
 Met Glu Ser Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Ile Leu Leu Trp Leu Tyr
 1 5 10 15
 Gly Ala Asp Gly Asn Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Ser Met Ser
 20 25 30
 Met Ser Val Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Ala Ser Glu Asn
 35 40 45
 Val Val Thr Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Gln Ser Pro
 50 55 60
 Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Ala Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
 85 90 95
 ser val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Asp Tyr His Cys Gly Gln Gly Tyr
 100 105 110
 Ser Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 115 120 125
 Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val
 130 135

10

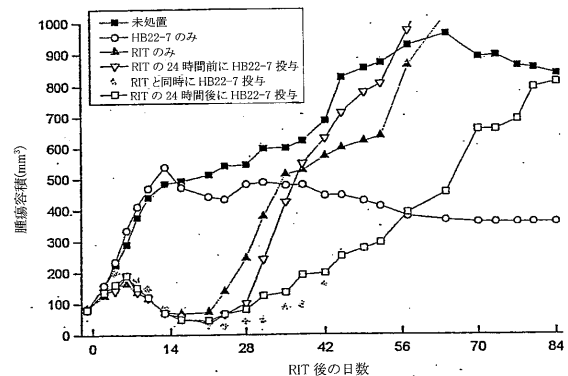
【図 1】



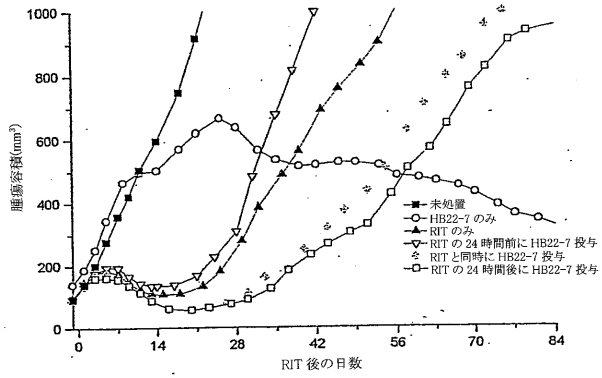
【図 2】



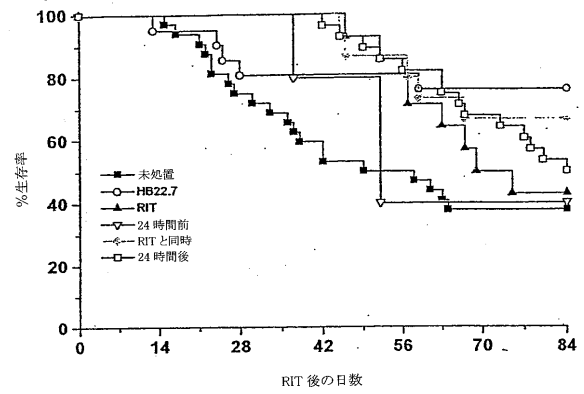
【図 3】



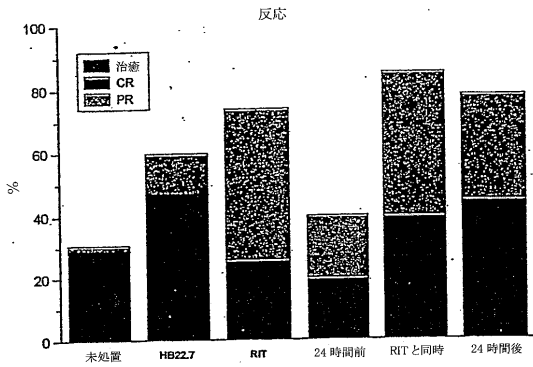
【図 4】



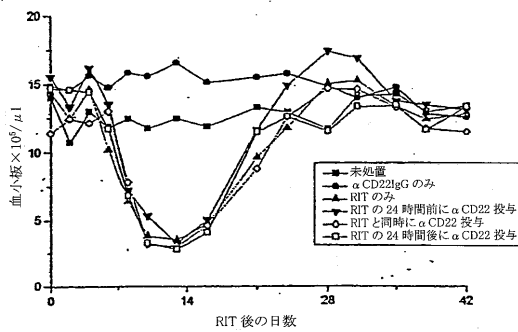
【図 6】



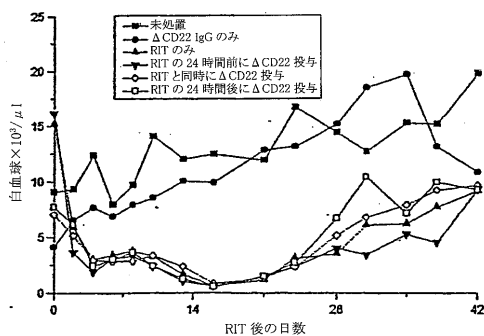
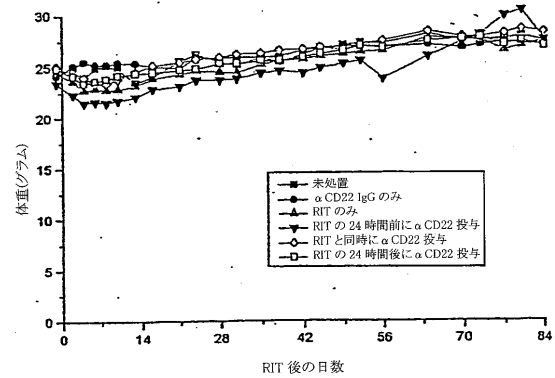
【図 5】



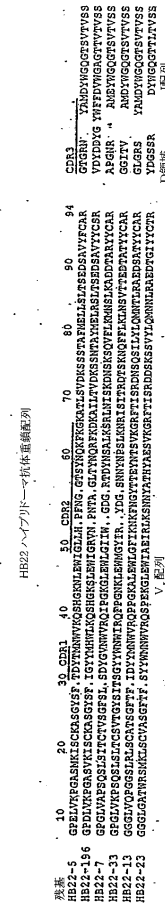
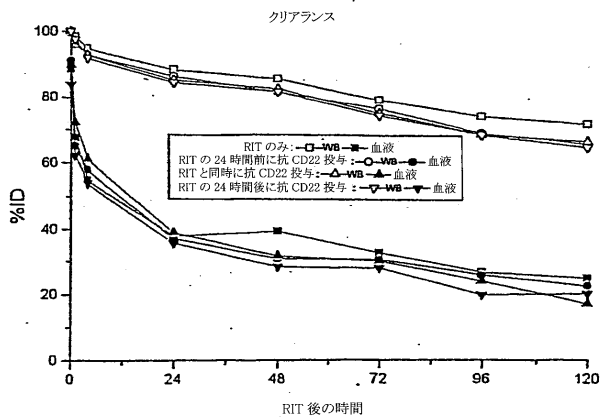
【図 7】



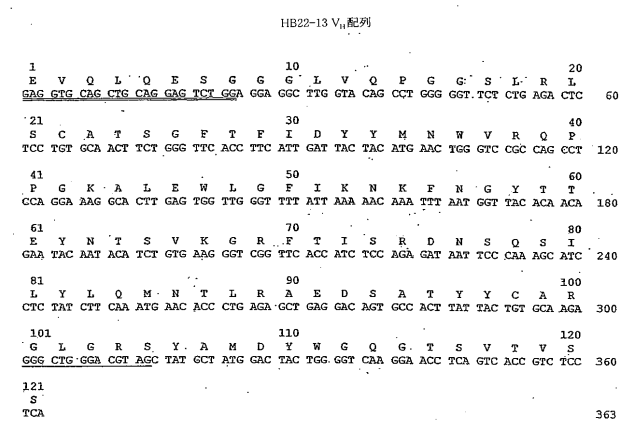
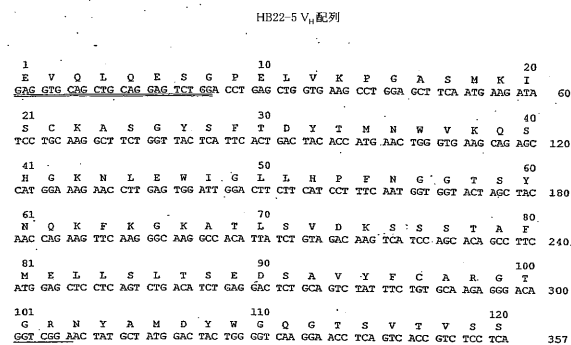
【図 8】



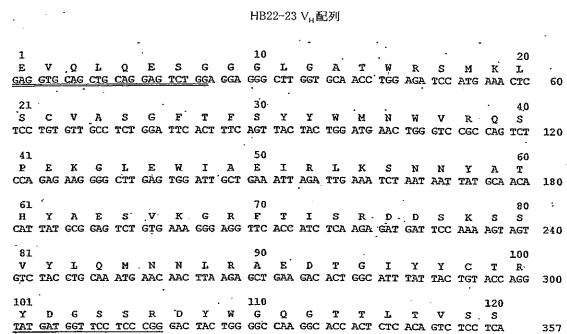
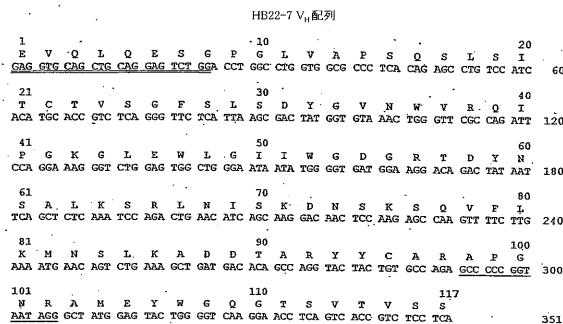
【 図 1 0 】



【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】

HB22-33 V_H 配列

1	E	V	Q	L	Q	E	S	G	P	10	G	L	V	K	P	S	Q	S	L	S	20	
<u>GAG</u>	<u>GTG</u>	<u>CAG</u>	<u>CTG</u>	<u>CAG</u>	<u>GAG</u>	<u>TCT</u>	<u>GGA</u>	CCT	GCC	CTC	GTG	AAA	CCT	TCT	CAG	TCT	CTG	TCT	CTC	60		
21	T	C	S	V	T	G	Y	S	I	30	S	G	V	Y	N	N	W	I	L	Q		
ACC	TGC	TCT	GTC	ACT	GGC	TAC	TCC	ATC	ACC	AGC	GCT	TAT	TAC	TGG	ACG	TGG	ATC	CGG	CAG	120		
41	F	P	G	A	N	K	L	E	W	M	G	Y	I	R	Y	D	G	S	N	N	Y	60
TTT	CCA	GGA	AAA	CAA	CTG	GAA	TGG	ATG	GGC	TAC	ATT	AGG	TAC	GCG	AGC	ATC	AAC	ATC	TAC	180		
61	N	P	S	L	K	N	R	I	S	70	I	T	R	D	T	S	K	N	Q	F	80	
AAC	CCA	TCT	CTC	AAA	AAC	CGA	ATC	TCC	ATC	ACT	CST	GAC	ACA	TCT	AAG	AAC	CAG	TTT	TTC	240		
81	L	K	L	N	S	V	T	F	E	90	D	T	A	T	Y	Y	C	A	R	G	100	
CTC	AAG	TTG	AAT	ACT	GTG	ACT	ACT	GAG	GAC	ACA	GCT	ACA	TAT	TAT	TCT	GCA	AGA	<u>GGG</u>	<u>GGG</u>	300		
101	I	T	C	V	A	M	D	Y	W	G	110	Q	G	T	S	V	T	V	S	118		
<u>ATT</u>	<u>AGC</u>	<u>GTT</u>	<u>GCT</u>	<u>ATT</u>	<u>ATG</u>	<u>GAC</u>	<u>TAC</u>	<u>TGG</u>	<u>GGT</u>	CAA	GGA	ACA	TCA	GTG	ACC	CTG	TCC	TCA	360			

【 図 1 6 】

HB22-196 V_H配列[illegible]

【 図 1 8 】

HB22-5 V_κ配列[illegible]

【 図 1 9 】

HB22-7 V₈ 配列

M	E	S	T	Q	V	F	V	F	L	C	V	S	G	A	H	
ATG	ATG	CAG	TCA	CAG	ACC	CAG	GTC	GTG	TTA	TTT	CTA	CTC	TGT	GTG	TCT	GCT
G	S	I	V	M	T	T	T	F	K	F	L	L	V	S	A	G
GGG	AGT	ATT	ATG	ATG	ACC	CAG	ATC	CCC	AAA	TTG	CTT	GTA	TCA	GCA	GGA	AGG
T	L	T	C	K	A	S	C	S	V	T	N	D	V	A	Y	Q
ACC	TTA	ACC	TGC	ATG	CAG	AGT	CAG	ATC	ATC	ATC	GAT	GTA	CTC	TGG	TAC	CAG
P	G	C	S	P	K	L	L	I	Y	Y	A	S	N	R	T	G
CCA	GGG	CAG	TCT	CTT	AAA	CTG	CTA	ATG	TAC	TAT	GCA	TCC	ATC	CGT	TAC	ACT
D	R	F	T	C	S	E	V	T	G	T	F	T	C	T	T	T
GAT	CCC	TTT	ACT	GCC	AGT	GAA	TAT	GAG	ACG	GAT	TTT	ACT	TTT	ACC	ATC	AGC
A	E	D	L	A	V	Y	F	C	Q	Q	D	Y	R	S	P	W
GCT	GAA	GAC	CTG	GCA	ATT	TAT	TGT	TCT	CAG	CAG	GAT	ATG	TCT	CGC	TGG	ACG
G	G	T	K	L	E	I	K	R	A	D	A	P	T	V	T	F
GGA	GCG	ACC	AGG	CAT	GAA	ATC	AAA	CAG	CGT	GAT	GCT	GCA	CCA	ACT	GTA	TC

【 図 1 7 】

[illegible]

【 図 2 0 】

HB22-13 V_x配列[illegible]

【 ㊦ 2 1 】【

HB22-23 V₂配列

<u>M</u>	<u>E</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>C</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>A</u>	<u>H</u>		
24G	AGT	GGG	TGA	ACC	CAG	GTC	TTA	TTT	CTA	CTG	CTC	TGT	GCT	GCT	CAT	50	
<u>G</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>I</u>	<u>V</u>	<u>M</u>	<u>T</u>	<u>Q</u>	<u>T</u>	<u>F</u>	<u>K</u>	<u>F</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>A</u>	
GGG	AGT	AGT	ATG	AGC	ACC	CAG	ATC	CCC	AAA	TTC	CTG	CTT	GTA	TCA	GCA	GGG	100
<u>T</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>K</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>C</u>	<u>S</u>	<u>V</u>	<u>S</u>	<u>N</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>W</u>	<u>Y</u>	<u>Q</u>	
ACC	ATG	AGC	TGC	AGG	GCC	ATG	CAG	ATG	GCT	AGT	AAT	GAT	GTA	GCT	TGG	TAC	150
<u>R</u>	<u>T</u>	<u>A</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>P</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	<u>I</u>	<u>Y</u>	<u>A</u>	<u>S</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>G</u>	
CCA	GGG	CAG	TCT	CCT	AAA	CTG	CTG	ATA	TAT	TAT	GCA	TTC	AGC	CGC	TAT	ACT	200
<u>G</u>	<u>A</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>S</u>	<u>G</u>	<u>G</u>	<u>T</u>	<u>D</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>I</u>	<u>S</u>	
DAT	CGC	CTC	ACT	GGC	AGT	GGA	TAT	GGG	ACG	GAT	TTT	ACT	TTC	ACC	ATG	AGC	250
<u>A</u>	<u>E</u>	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>A</u>	<u>V</u>	<u>F</u>	<u>T</u>	<u>C</u>	<u>Q</u>	<u>Q</u>	<u>G</u>	<u>D</u>	<u>H</u>	<u>S</u>	<u>Y</u>	<u>F</u>	
GCT	AAA	GAC	CTG	AGA	GTT	TAT	TGT	TGT	CAG	CAG	GAT	ACG	TAT	CCG	TGG	ACG	300
<u>G</u>	<u>T</u>	<u>K</u>	<u>L</u>	<u>E</u>	<u>I</u>	<u>K</u>	<u>R</u>	<u>A</u>	<u>D</u>	<u>A</u>	<u>A</u>	<u>P</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	<u>T</u>	
GGA	GGC	ACC	AGG	CTG	CAG	ATC	AAA	CGG	GCT	GCT	GCA	CCA	ACT	GTA	TC		350

【図 22】

HB22-33 V_H配列

```

M K L P V R L L V L M F W I P A S S S S D
ATG AAG TTG CCT GTC AGG CTG TTG GTG CTG 60
V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I
GTT GTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCC CTG CCT GTC AGT CTT GGA GAT CAA GCC TCC ATC 120
S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W Y
TCT TGC AGA TCT AGT CAG AGC CTT GTA CAC AGT AAT GGA AAC ACC TAT TTA CAT TGG TAC 180
L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S
CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT CCA AAG CTC CTG ATC TAC AAA GTT TCC AAC CGA TTT TCT 240
G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S
GGG GTC CCA GAT AAG TTC AGT GGC AGT GGA TCA GGG ACA GAT TTC ACA CTC AAG ATC AGC 300
R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P Y
AGA GTG GAG GCT GAG GAT CTG GGA GTT TAT TTC TGC TCT CAA AGT ACA CAT GTT CCG TAC 360
T F G G G T K L E I K R A D A A P T V
ACG TTC GGA GGG GGC ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 419

```

【図 23】

HB22-196 V_H配列

```

M E S Q T Q V F I S I L L N L Y G A D
AAG ATG GAG TCA CAG ACC CAG GTC TTC ATA TCC ATA CTC CTC TGG TTA TAT GGA GCT GAT 60
G N I V M T Q S P K S M S H S V G E R V
GGG AAC ATT GTA AAG ACC CAA TCT CCC AAA TCC ATG TCC ATG TCA GTA GGA GAG AGG GTC 120
T L T C K A S E N V V T Y V S W Y Q Q K
ACC TTG ACC TCC AAG GCC AGT GAG AAT GTG GTT ACT TAT GTT TCC TGG TAT CAA CAG AAA 180
P E Q S P K L L I Y G A S N R Y T G V P
CCA GAG CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA TAC GGG GCA TCC AAC CGG TAC ACT GGG GTC CCC 240
D R F T G S S A T D F T L T I S S V Q
GAT CGC TTC ACA GGC AGT GGA TCT GCA ACA GAT TTC ACT CTG ACC ATC ACG AGT GTG CAG 300
A E D L A D Y H C G Q G Y S Y P Y T F G
GCT GAA GAC CTT GCA GAT TAT CAC TGT GGA CAG GGT TAC AGC TAT CCG TAC ACG TTC GGA 360
G G T K L E I K R A D A A P T V
GGG GGC ACC AAG CTG GAA ATA AAA CGG GCT GAT GCT GCA CCA ACT GTA TC 419

```

【手続補正書】

【提出日】平成16年10月22日(2004.10.22)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

配列番号1の天然型ヒトCD22(hCD22)の最初の2つのIg様ドメインまたは最初の2つのIg様ドメイン内のエピトープに結合可能なブロッキング抗CD22モノクローナル抗体の、B細胞悪性腫瘍と診断されたヒト患者を治療するための医薬品を製造するための使用。

【請求項2】

前記抗体は、HB22-7(HB11347)、HB22-23(HB11349)、HB22-33、HB22-5、HB22-13、およびHB22-196からなる群より選択される抗体と本質的に同じエピトープに結合する、請求項1に記載の使用。

【請求項3】

前記抗体は、HB22-7(HB11347)、HB22-23(HB11349)、およびHB22-33からなる群より選択される抗体と本質的に同じエピトープに結合する、請求項2に記載の使用。

【請求項4】

前記抗体は、HB22-7と本質的に同じエピトープに結合する、請求項3に記載の使用。

【請求項5】

前記抗体は、HB22-33と本質的に同じエピトープに結合する、請求項3に記載の使用。

【請求項6】

前記抗体は、CD22とそのリガンドとの結合を少なくとも約70%ブロックする、請求項1に

記載の使用。

【請求項 7】

前記抗体は、CD22とそのリガンドとの結合を少なくとも約80%ブロックする、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 8】

前記 B 細胞悪性腫瘍が局所的なものである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 9】

前記 B 細胞悪性腫瘍は、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、多発性骨髄腫、慢性リンパ球性白血病、有毛細胞白血病、および前リンパ球性白血病の B 細胞亜型からなる群より選択される、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 10】

前記医薬品は、悪性腫瘍 B 細胞のその他の治療を伴わない治療への使用に適したものである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 11】

前記医薬品は、放射線療法を伴わない治療への使用に適したものである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 12】

前記医薬品は、化学療法を伴わない治療への使用に適したものである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 13】

前記医薬品は、放射免疫療法(RIT)、または併用放射免疫療法(CMRIT)を伴わない治療への使用に適したものである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 14】

前記医薬品は、前記抗体を単独で使用する治療への使用に適しており、該医薬品により、該抗体と放射免疫療法との併用治療と比べて、Rajiリンパ腫異種移植モデルの治癒率が改善されることを特徴とする、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 15】

前記医薬品は、前記抗体を単独で使用する治療への使用に適しており、該医薬品により、該抗体と放射免疫療法との併用治療と比べて、Rajiリンパ腫異種移植モデルの生存率が向上することを特徴とする前記抗体を単独で使用する治療への使用に適したものである、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 16】

前記医薬品は、前記抗体を単独で使用する治療への使用に適しており、該医薬品により、該抗体と放射免疫療法との併用治療と比べて、Rajiリンパ腫異種移植モデルの腫瘍容積の減少がもたらされることを特徴とする前記抗体を単独で使用する治療への使用に適したものである、請求項 10 に記載の使用。

【請求項 17】

前記抗体は、完全抗体のフラグメントである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 18】

前記抗体が、Fab、Fab'、F(ab')₂およびFvフラグメント、二重特異性抗体、線状抗体、一本鎖抗体分子、および抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体からなる群より選択される、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】

前記抗体は、さらなる抗原特異性を有する、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 20】

前記抗体は、二重特異性抗体である、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

前記抗体は、CD22の別のエピトープにさらに結合する、請求項 20 に記載の使用。

【請求項 22】

前記抗体はキメラである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 23】

前記抗体はヒト化である、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 24】

前記抗体はヒトである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 25】

前記抗体を含む医薬品は、静脈内投与されるものである、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 26】

前記抗体を含む医薬品は、週ごとに、静脈内点滴により投与されるものである、請求項 25 に記載の使用。

【請求項 27】

固型 B 細胞腫瘍の縮小を追跡することにより、前記治療に対する反応をモニタリングすることを特徴とする、請求項 6 に記載の使用。

【請求項 28】

前記縮小が、磁気共鳴画像法 (MRI) によりモニタリングされる、請求項 27 に記載の使用。

【請求項 29】

前記抗体が、配列番号 9 (HB22-5 V_H 配列) のアミノ酸 1~100 ; または配列番号 11 (HB22-7 V_H 配列) のアミノ酸 1~97 ; または配列番号 13 (HB22-3 V_H 配列) のアミノ酸 1~100 ; または配列番号 15 (HB22-23 V_H 配列) のアミノ酸 1~100 ; または配列番号 17 (HB22-33 V_H 配列) のアミノ酸 1~98 ; または配列番号 19 (HB22-196 V_H 配列) のアミノ酸 1~100 の配列と少なくとも約 95% の配列同一性を有する V_H 配列を含む重鎖を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 30】

前記抗体が、配列番号 11 (HB22-7 V_H 配列) のアミノ酸 1~97 ; または配列番号 15 (HB22-23 V_H 配列) のアミノ酸 1~100 ; または配列番号 17 (HB22-33 V_H 配列) のアミノ酸 1~98 の配列と少なくとも約 95% の配列同一性を有する V_H 配列を含む重鎖を含む、請求項 29 に記載の使用。

【請求項 31】

前記抗体が、配列番号 11 (HB22-7 V_H 配列) のアミノ酸 1~97 ; 配列番号 15 (HB22-23 V_H 配列) のアミノ酸 1~100 ; および配列番号 17 (HB22-33 V_H 配列) のアミノ酸 1~98 からなる群より選択される V_H 配列を含む、請求項 30 に記載の使用。

【請求項 32】

前記抗体が、配列番号 21 (HB22-5 V 配列) ; または配列番号 23 (HB22-7 V 配列) ; または配列番号 25 (HB22-13 V 配列) ; または配列番号 27 (HB22-23 V 配列) ; または配列番号 29 (HB22-33 V 配列) ; または配列番号 31 (HB22-196 V 配列) のアミノ酸配列と少なくとも約 95% の配列同一性を有する V 配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 33】

前記抗体が、配列番号 23 (HB22-7 V 配列) ; または配列番号 27 (HB22-23 V 配列) ; または配列番号 29 (HB22-33 V 配列) のアミノ酸配列と少なくとも約 95% の配列同一性を有する V 配列を含む軽鎖を含む、請求項 32 に記載の使用。

【請求項 34】

前記抗体が、配列番号 23 (HB22-7 V 配列) ; 配列番号 27 (HB22-23 V 配列) ; および配列番号 29 (HB22-33 V 配列) のアミノ酸配列からなる群より選択される V 配列を含む、請求項 33 に記載の使用。

【請求項 35】

前記抗体が、配列番号 11 (HB22-7 V_H 配列) のアミノ酸 1~97 と配列番号 23 (HB22-7 V 配列) のアミノ酸配列 ; 配列番号 15 (HB22-23 V_H 配列) のアミノ酸 1~100 と配列番号 27 (HB22-23 V 配列) のアミノ酸配列 ; ならびに配列番号 17 (HB22-33 V_H 配列) のアミノ酸 1~98 と配列番号 29 (HB22-33 V 配列) のアミノ酸配列からなる群より選択される V_H と V 配列とを含む、請求項 1 に記載の使用。

【請求項 36】

前記抗体はキメラである、請求項 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 7】

前記抗体はヒト化である、請求項 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 8】

前記抗体はヒトである、請求項 3 5 に記載の使用。

【請求項 3 9】

配列番号 1 の天然型ヒト CD22(hCD22)の最初の 2 つの Ig 様ドメインまたは最初の 2 つの Ig 様ドメイン内のエピトープに結合可能なブロッキング抗 CD22 モノクローナル抗体の、医薬品を製造するための使用。

【請求項 4 0】

配列番号 9 (HB22-5 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 100 ; または配列番号 11 (HB22-7 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 97 ; または配列番号 13 (HB22-13 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 100 ; または配列番号 15 (HB22-23 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 100 ; または配列番号 17 (HB22-33 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 98 ; または配列番号 19 (HB22-196 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 100 の配列と少なくとも約 95 % の配列同一性を有する V_H 配列を含む抗体重鎖可変領域をコードする核酸を含む、単離された核酸分子。

【請求項 4 1】

配列番号 21 (HB22-5V 配列) ; または配列番号 23 (HB22-7 V 配列) ; または配列番号 25 (HB22-13 V 配列) ; または配列番号 27 (HB22-23 V 配列) ; または配列番号 29 (HB22-33 V 配列) ; または配列番号 31 (HB22-196 V 配列) のアミノ酸配列と少なくとも約 95 % の配列同一性を有する V 配列を含む抗体軽鎖可変領域をコードする核酸を含む、単離された核酸分子。

【請求項 4 2】

配列番号 11 (HB22-7 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 97 ; 配列番号 15 (HB22-23 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 100 ; および配列番号 17 (HB22-33 V_H 配列) のアミノ酸 1 ~ 98 からなる群より選択された V_H 配列をコードする核酸を含む、単離された核酸分子。

【請求項 4 3】

配列番号 23 (HB22-7 V 配列) ; 配列番号 27 (HB22-23 V 配列) ; および配列番号 29 (HB22-33 V 配列) のアミノ酸配列からなる群より選択された V 配列をコードする核酸を含む、単離された核酸分子。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/05323

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 39/395

US CL : 424/130.1, 133.1, 135.1, 136.1, 139.1, 143.1, 144.1, 153.1, 156.1, 174.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/130.1, 133.1, 135.1, 136.1, 139.1, 143.1, 144.1, 153.1, 156.1, 174.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
Please See Continuation Sheet

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5484892 A (TEDDER et al.) 16 January 1996, see entire document.	1-38

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"B" earlier application or patent published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 May 2003 (08.05.2003)

Date of mailing of the international search report

08 SEP 2003

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US

Commissioner for Patents

P.O. Box 1450

Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. (703)305-3230

Authorized officer

Ron Schwadron, Ph.D.

Telephone No. 703 3080196

Janice Fowl
for

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/05323

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST 2.1, MEDICINE/BIOTECH (compendium databases on DIALOG) search terms: inventor names, cd22, antcd22, hcd22, hb22?, b cell, lymphoma, myeloma, leukemia, cancer, tumor

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN, GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC, EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,M X,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100096183

弁理士 石井 貞次

(74)代理人 100118773

弁理士 藤田 節

(72)発明者 テダー, トーマス

アメリカ合衆国 2 7 7 0 5 ノースカロライナ州, ダラム, ワイルド メドウ ドライブ 3 0
0 0

(72)発明者 チュスカノ, ジョセフ

アメリカ合衆国 9 5 6 3 0 カリフォルニア州, フォルソム, トーンダイク ウェイ 1 5 0

F ターム(参考) 4C085 AA14 AA16 BB11 BB31 BB41 BB43 CC03 CC23 EE01 GG02

4C096 AA20 AB50

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA75 DA76 EA28 FA72 FA74