

(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2015-501146

(P2015-501146A)

(43) 公表日 平成27年1月15日(2015.1.15)

(51) Int.Cl.	F 1	テーマコード (参考)
C 12 N 15/09 (2006.01)	C 12 N 15/00	Z N A A 2 G 04 5
C 12 N 1/15 (2006.01)	C 12 N 1/15	4 B 02 4
C 12 N 1/19 (2006.01)	C 12 N 1/19	4 B 06 5
C 12 N 1/21 (2006.01)	C 12 N 1/21	4 C 08 5
C 12 N 5/10 (2006.01)	C 12 N 5/00	1 O 1 4 H 04 5
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 63 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2014-535165 (P2014-535165)	(71) 出願人	513279423 エヌヴィーアイピー プロプライエタリー リミテッド オーストラリア 3000 ヴィクトリア メルボルン クイーン ストリート 3 1 レヴェル 8
(86) (22) 出願日	平成24年10月12日 (2012.10.12)	(74) 代理人	100092093 弁理士 辻居 幸一
(85) 翻訳文提出日	平成26年6月10日 (2014.6.10)	(74) 代理人	100082005 弁理士 熊倉 賢男
(86) 國際出願番号	PCT/GB2012/052532	(74) 代理人	100084663 弁理士 箱田 篤
(87) 國際公開番号	W02013/054127	(74) 代理人	100093300 弁理士 浅井 賢治
(87) 國際公開日	平成25年4月18日 (2013.4.18)		
(31) 優先権主張番号	61/546,865		
(32) 優先日	平成23年10月13日 (2011.10.13)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】イヌ／ネコCD20の結合エピトープ及び前記と結合する組成物

(57) 【要約】

本発明は、(i) アミノ酸残基SEKNS(配列番号: 67)から成る連続するアミノ酸配列、(ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び(iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、を含むCD20の環状ポリペプチドフラグメントを提供する。該環状ポリペプチドフラグメントは、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される。さらに、CD20と特異的に結合する抗体の作出における該環状ペプチドフラグメントの使用が開示される。ネコ及びイヌのB細胞媒介症状の治療で使用される、該環状ペプチドフラグメントと特異的に結合する抗体もまた開示される。

。

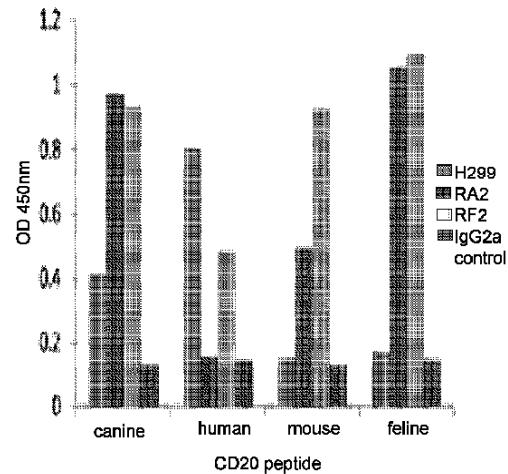


Figure 9

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

B細胞によって媒介される症状の治療又は予防の必要があるイヌ又はネコ対象動物でB細胞によって媒介される症状の治療又は予防で使用される、CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、該環状ポリペプチドフラグメントが、

- (i) アミノ酸残基SEKNS (配列番号：67) から成る連続するアミノ酸配列、
- (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
- (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、

を含み、該環状ポリペプチドフラグメントが、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される、前記抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 2】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基SEKNSL (配列番号：68) から成る、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基PSEKNS (配列番号：69) から成る、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 4】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基PSEKNSL (配列番号：1) から成る、請求項1に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号：2又は配列番号：2と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成り、かつ対象動物がイヌ対象動物である、請求項4に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 6】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号：4又は配列番号：4と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成り、かつ対象動物がネコ対象動物である、請求項4に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 7】

抗体がII型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体に由来する、請求項1から6のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 8】

II型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体がB1-H299、GA101及びB1y1から成る群から選択される、請求項7に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

抗体がGA101に由来する、請求項8に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 10】

対象動物がイヌであり、かつ抗体又は抗原結合フラグメントが、

配列番号：7のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：7のアミノ酸配列を含むFR1フレームワーク領域、

配列番号：8のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：8のアミノ酸配列を含むFR2フレームワーク領域、

配列番号：9のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：9のアミノ酸配列を含むFR3フレームワーク領域、及び、

配列番号：10のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：10のアミノ酸配列を含むFR4フレームワーク領域、

の少なくとも1つを含む軽鎖可変領域、及び／又は、

配列番号：11のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：11のアミノ酸配列を含むFR1フレームワーク領域、

40

50

配列番号：12のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：12のアミノ酸配列を含むFR2フレームワーク領域、

配列番号：13のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：13のアミノ酸配列を含むFR3フレームワーク領域、及び配、

配列番号：14のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：14のアミノ酸配列を含むFR4フレームワーク領域、

の少なくとも1つを含む重鎖可変領域、

を含む、請求項9に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項11】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：15のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び／又は配列番号：16のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項10に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項12】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：18のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖、及び／又は配列番号：17のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項11に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項13】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：55のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：56のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：57のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：58のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：59のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：60のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1から6のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項14】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：37のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：38のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項13に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項15】

重鎖が、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41及び配列番号：42、又は配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41若しくは配列番号：42と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項14に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項16】

軽鎖が、配列番号：43のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項14又は15に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項17】

対象動物がネコであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：51のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：52のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項13に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項18】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29及び配列番号：30、又は配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29若しくは配列番号：30と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項13に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項19】

対象動物がイヌであり、かつ軽鎖が、配列番号：31のアミノ酸配列又は前記と少なくと

10

20

30

40

50

も85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項13又は18に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項20】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：61のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：62のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：63のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：64のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：65のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：66のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1から6のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項21】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：44のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は軽鎖可変領域が、配列番号：45のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項22】

重鎖が、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48及び配列番号：49、又は配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48若しくは配列番号：49と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項21に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項23】

軽鎖が、配列番号：50のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項21又は22に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項24】

対象動物がネコであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：53のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は軽鎖可変領域が、配列番号：54のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項25】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖が、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34及び配列番号：35、又は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34若しくは配列番号：35と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項20に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項26】

対象動物がイヌであり、かつ軽鎖が、配列番号：36のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項20又は25に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項27】

B細胞によって媒介される症状がCD20+ B細胞リンパ腫である、請求項1から26のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項28】

B細胞によって媒介される症状が免疫媒介疾患である、請求項1から26のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項29】

免疫媒介疾患が自己免疫疾患である、請求項28に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項30】

自己免疫疾患が以下から成る群から選択される、請求項29に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント：慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、ショーグレン症候群、血管炎、多発性硬化症、グレーヴズ病、特発性血小板減少症、皮膚筋炎、免疫媒介血小板減少症、多発性筋細胞症、天疱瘡、免疫媒介溶血性貧血及び水疱性類天疱瘡。

10

20

30

40

50

【請求項 3 1】

CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量を投与する工程を含む、B細胞によって媒介される症状を治療又は予防する必要があるイヌ又はネコ対象動物でB細胞によって媒介される症状を治療又は予防する方法であって、該環状ポリペプチドフラグメントが、

- (i) アミノ酸残基SEKNS (配列番号：67) から成る連続するアミノ酸配列、
- (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
- (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、

を含み、該環状ポリペプチドフラグメントが、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される、前記治療又は予防方法。

10

【請求項 3 2】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基SEKNSL (配列番号：68) から成る、請求項31に記載の方法。

【請求項 3 3】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基PSEKNS (配列番号：69) から成る、請求項31に記載の方法。

【請求項 3 4】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基PSEKNSL (配列番号：1) から成る、請求項31に記載の方法。

20

【請求項 3 5】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号：2又は配列番号：2と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成り、かつ対象動物がイヌ対象動物である、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 6】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号：4又は配列番号：4と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成り、かつ対象動物がネコ対象動物である、請求項34に記載の方法。

【請求項 3 7】

抗体がII型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体に由来する、請求項31から36のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項 3 8】

II型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体がB1-H299、GA101及びB1y1から成る群から選択される、請求項37に記載の方法。

【請求項 3 9】

抗体がGA101に由来する、請求項38に記載の方法。

【請求項 4 0】

対象動物がイヌであり、かつ抗体又は抗原結合フラグメントが、

配列番号：7のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：7のアミノ酸配列を含むFR1フレームワーク領域、

配列番号：8のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：8のアミノ酸配列を含むFR2フレームワーク領域、

配列番号：9のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：9のアミノ酸配列を含むFR3フレームワーク領域、及び、

配列番号：10のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：10のアミノ酸配列を含むFR4フレームワーク領域、

の少なくとも1つを含む軽鎖可変領域、及び／又は、

配列番号：11のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：11のアミノ酸配列を含むFR1フレームワーク領域、

配列番号：12のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：12のアミノ酸配列を含むFR2フレームワーク領域、

40

50

配列番号：13のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：13のアミノ酸配列を含むFR3フレームワーク領域、及び、

配列番号：14のアミノ酸配列から成るか又は配列番号：14のアミノ酸配列を含むFR4フレームワーク領域、

の少なくとも1つを含む重鎖可変領域、
を含む、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：15のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び／又は配列番号：16のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項40に記載の方法。 10

【請求項42】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：18のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖、及び／又は配列番号：17のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項41に記載の方法。

【請求項43】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：55のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：56のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：57のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：58のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：59のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：60のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、請求項31から36のいずれか1項に記載の方法。 20

【請求項44】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：37のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：38のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項45】

重鎖が、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41及び配列番号：42、又は配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41若しくは配列番号：42と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項44に記載の方法。 30

【請求項46】

軽鎖が、配列番号：43のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項44又は45に記載の方法。

【請求項47】

対象動物がネコであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：51のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：52のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項43に記載の方法。 40

【請求項48】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29及び配列番号：30、又は配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29若しくは配列番号：30と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項43に記載の方法。

【請求項49】

対象動物がイヌであり、かつ軽鎖が、配列番号：31のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項43又は48に記載の方法。

【請求項50】

10

20

30

40

50

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：61のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：62のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：63のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：64のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：65のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：66のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、請求項31から36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項51】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：44のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は軽鎖可変領域が、配列番号：45のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の方法。

10

【請求項52】

重鎖が、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48及び配列番号：49、又は配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48若しくは配列番号：49と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項51に記載の方法。

20

【請求項53】

軽鎖が、配列番号：50のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項51又は52に記載の方法。

【請求項54】

対象動物がネコであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：53のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は軽鎖可変領域が、配列番号：54のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の方法。

【請求項55】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖が、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34及び配列番号：35、又は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34若しくは配列番号：35と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項50に記載の方法。

30

【請求項56】

対象動物がイヌであり、かつ軽鎖が、配列番号：36のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項50又は55に記載の方法。

【請求項57】

B細胞によって媒介される症状がCD20+ B細胞リンパ腫である、請求項31から56のいずれか1項に記載の方法。

【請求項58】

B細胞によって媒介される症状が免疫媒介疾患である、請求項31から56のいずれか1項に記載の方法。

【請求項59】

免疫媒介疾患が自己免疫疾患である、請求項58に記載の方法。

40

【請求項60】

自己免疫疾患が以下から成る群から選択される、請求項59に記載の方法：慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス(SLE)、ショーグレン症候群、血管炎、多発性硬化症、グレーヴズ病、特発性血小板減少症、皮膚筋炎、免疫媒介血小板減少症、多発性筋細胞症、天疱瘡、免疫媒介溶血性貧血及び水疱性類天疱瘡。

【請求項61】

B細胞によって媒介される症状を治療又は予防する必要があるイヌ又はネコ対象動物でB細胞によって媒介される症状を治療又は予防する医薬の調製における、CD20の環状ポリペチドフラグメントと特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの使用であって、該環状ポリペチドフラグメントが、

50

(i) アミノ酸残基SEKNS (配列番号: 67) から成る連続するアミノ酸配列、
 (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
 (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、
 を含み、該環状ポリペプチドフラグメントが、該第一及び第二のシステイン残基間で形成
 されるジスルフィド結合の存在によって酸化される、前記抗体又はその抗原結合フラグメ
 ントの使用。

【請求項 6 2】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基SEKNSL (配列番号: 68) から成る、請求項61に記載の
 使用。

【請求項 6 3】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基PSEKNS (配列番号: 69) から成る、請求項61に記載の
 使用。

【請求項 6 4】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基PSEKNSL (配列番号: 1) から成る、請求項61に記載の
 使用。

【請求項 6 5】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号: 2又は配列番号: 2と少なくとも85%の配
 列同一性を有するアミノ酸配列から成り、かつ対象動物がイヌ対象動物である、請求項64
 に記載の使用。

【請求項 6 6】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号: 4又は配列番号: 4と少なくとも85%の配
 列同一性を有するアミノ酸配列から成り、かつ対象動物がネコ対象動物である、請求項64
 に記載の使用。

【請求項 6 7】

抗体がII型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体に由来する、請求項61から66のいずれか
 1項に記載の使用。

【請求項 6 8】

II型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体がB1-H299、GA101及びB1y1から成る群から選択
 される、請求項67に記載の使用。

【請求項 6 9】

抗体がGA101に由来する、請求項68に記載の使用。

【請求項 7 0】

対象動物がイヌであり、かつ抗体又は抗原結合フラグメントが、

配列番号: 7のアミノ酸配列から成るか又は配列番号: 7のアミノ酸配列を含むFR1フ
 レームワーク領域、

配列番号: 8のアミノ酸配列から成るか又は配列番号: 8のアミノ酸配列を含むFR2フ
 レームワーク領域、

配列番号: 9のアミノ酸配列から成るか又は配列番号: 9のアミノ酸配列を含むFR3フ
 レームワーク領域、及び、

配列番号: 10のアミノ酸配列から成るか又は配列番号: 10のアミノ酸配列を含むFR4
 フレームワーク領域、

の少なくとも1つを含む軽鎖可変領域、及び/又は、

配列番号: 11のアミノ酸配列から成るか又は配列番号: 11のアミノ酸配列を含むFR1
 フレームワーク領域、

配列番号: 12のアミノ酸配列から成るか又は配列番号: 12のアミノ酸配列を含むFR2
 フレームワーク領域、

配列番号: 13のアミノ酸配列から成るか又は配列番号: 13のアミノ酸配列を含むFR3
 フレームワーク領域、及び、

配列番号: 14のアミノ酸配列から成るか又は配列番号: 14のアミノ酸配列を含むFR4
 フレームワーク領域、

10

20

30

40

50

の少なくとも1つを含む重鎖可変領域、
を含む、請求項69に記載の使用。

【請求項 7 1】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：15のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び／又は配列番号：16のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む、請求項70に記載の使用。

【請求項 7 2】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：18のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖、及び／又は配列番号：17のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖を含む、請求項71に記載の使用。

10

【請求項 7 3】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：55のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：56のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：57のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：58のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：59のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：60のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、請求項61から66のいずれか1項に記載の使用。

20

【請求項 7 4】

対象動物がイヌであり、重鎖可変領域が、配列番号：37のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：38のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項73に記載の使用。

【請求項 7 5】

重鎖が、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41及び配列番号：42、又は配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41若しくは配列番号：42と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項74に記載の使用。

30

【請求項 7 6】

軽鎖が、配列番号：43のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項74又は75に記載の使用。

【請求項 7 7】

対象動物がネコであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：51のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：52のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項73に記載の使用。

【請求項 7 8】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29及び配列番号：30、又は配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29若しくは配列番号：30と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項73に記載の使用。

40

【請求項 7 9】

対象動物がイヌであり、かつ軽鎖が、配列番号：31のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項73又は78に記載の使用。

【請求項 8 0】

抗体又はその抗原結合フラグメントが、配列番号：61のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：62のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：63のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：64のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：65のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：66のアミノ酸配列

50

を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、請求項61から66のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 8 1】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：44のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：45のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項80に記載の使用。

【請求項 8 2】

重鎖が、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48及び配列番号：49、又は配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48若しくは配列番号：49と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項81に記載の使用。

10

【請求項 8 3】

軽鎖が、配列番号：50のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項81又は82に記載の使用。

【請求項 8 4】

対象動物がネコであり、かつ重鎖可変領域が、配列番号：53のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：54のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項80に記載の使用。

20

【請求項 8 5】

対象動物がイヌであり、かつ重鎖が、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34及び配列番号：35、又は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34若しくは配列番号：35と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項80に記載の使用。

【請求項 8 6】

対象動物がイヌであり、軽鎖が、配列番号：36のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項80又は85に記載の使用。

【請求項 8 7】

B細胞によって媒介される症状がCD20+ B細胞リンパ腫である、請求項61から86のいずれか1項に記載の使用。

30

【請求項 8 8】

B細胞によって媒介される症状が免疫媒介疾患である、請求項61から86のいずれか1項に記載の使用。

【請求項 8 9】

免疫媒介疾患が自己免疫疾患である、請求項88に記載の使用。

【請求項 9 0】

自己免疫疾患が以下から成る群から選択される、請求項89に記載の使用：慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、ショーグレン症候群、血管炎、多発性硬化症、グレーヴズ病、特発性血小板減少症、皮膚筋炎、免疫媒介血小板減少症、多発性筋細胞症、天疱瘡、免疫媒介溶血性貧血及び水疱性類天疱瘡。

40

【請求項 9 1】

CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合するイヌ化若しくはネコ化抗体又はその抗原結合フラグメントであって、該環状ポリペプチドフラグメントが、

- (i) アミノ酸残基SEKNS（配列番号：67）から成る連続するアミノ酸配列、
- (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
- (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、

を含み、該環状ポリペプチドフラグメントが、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される、前記イヌ化若しくはネコ化抗体又はその抗原結合フラグメント。

50

【請求項 9 2】

抗体が、イヌ以外の種に由来するドナー抗体の重鎖及び／又は軽鎖の相補性決定領域を含むイヌ化抗体であり、該ドナー抗体が環状ポリペプチドフラグメントに対して結合特異性を有する、請求項91に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 9 3】

抗体が、ドナー抗体由来の重鎖及び／又は軽鎖のフレームワーク領域を含む、請求項92に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 9 4】

ドナー抗体由来重鎖及び／又は軽鎖のフレームワーク領域が、イヌ抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基をイヌ抗体の対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換するべく改変される、請求項93に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 9 5】

抗体が、ネコ以外の種に由来するドナー抗体の重鎖及び／又は軽鎖の相補性決定領域を含むネコ化抗体であり、該ドナー抗体が環状ポリペプチドフラグメントに対して結合特異性を有する、請求項91に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 9 6】

抗体が、ドナー抗体由来の重鎖及び／又は軽鎖のフレームワーク領域を含む、請求項95に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 9 7】

ドナー抗体由来重鎖及び／又は軽鎖のフレームワーク領域が、ネコ抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基をネコ抗体の対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換するべく改変される、請求項96に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 9 8】

イヌ又はネコ抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基が当該対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換され、前記アミノ酸残基は、当該置換されるアミノ酸残基と最高の相同性を有する、請求項94又は97に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 9 9】

抗体又は抗原結合フラグメントがイヌ又はネコ抗体由来の重鎖及び／又は軽鎖の定常ドメインを含む、請求項91から99のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

30

【請求項 1 0 0】

ドナー抗体がII型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体に由来する、請求項93から99のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 0 1】

II型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体がB1-H299、GA101及びB1y1から成る群から選択される、請求項100に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 0 2】

CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合するヒト化抗体又はその抗原結合フラグメントであって、該環状ポリペプチドフラグメントが、

40

- (i) アミノ酸残基SEKNS(配列番号：67)から成る連続するアミノ酸配列、
- (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
- (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、

を含み、該環状ポリペプチドフラグメントが、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化され、さらに該重鎖及び／又は軽鎖のフレームワーク領域がヒト以外の種から得られる抗体に由来し、該フレームワーク領域が、ヒト抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基をヒト抗体の対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換するべく改変される、前記ヒト化抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 0 3】

ヒト抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基が当該対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換され、前記アミノ酸残基が、当該置換される1つ以上のアミノ酸残基と最

50

高の相同性を有する、請求項102に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項104】

CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合するキメラ抗体又はその抗原結合フラグメントであって、前記環状ポリペプチドフラグメントが、

- (i) アミノ酸残基SEKNS(配列番号:67)から成る連続するアミノ酸配列、
- (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
- (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、

を含み、該環状ポリペプチドが、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化され、さらに該抗体がイヌ又はネコ定常ドメインを含む、前記キメラ抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項105】

CD20と特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、該抗体又はそのフラグメントが、配列番号:55のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号:56のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号:57のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号:58のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号:59のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号:60のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、前記抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項106】

重鎖可変領域が、配列番号:19のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は軽鎖可変領域は、配列番号:20のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項105に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

20

【請求項107】

重鎖が、配列番号:23のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は軽鎖が、配列番号:24のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項106に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項108】

抗体がイヌ化抗体である、請求項105に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項109】

重鎖可変領域が、配列番号:37のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は軽鎖可変領域が、配列番号:38のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項108に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

30

【請求項110】

重鎖が、配列番号:39、配列番号:40、配列番号:41及び配列番号:42、又は配列番号:39、配列番号:40、配列番号:41又は配列番号:42と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項109に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項111】

軽鎖が、配列番号:43のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項109又は110に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

40

【請求項112】

抗体がネコ化抗体である、請求項105に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項113】

重鎖可変領域が、配列番号:51のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は軽鎖可変領域が、配列番号:52のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項112に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項114】

50

抗体がキメラ抗体である、請求項105に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項115】

重鎖及び／又は軽鎖がイヌ抗体に由来する定常ドメインを含む、請求項114に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項116】

重鎖が、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29及び配列番号：30、又は配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29又は配列番号：30と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項115に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項117】

軽鎖が、配列番号：31のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項115又は116に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項118】

CD20と特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントであって、該抗体又はそのフラグメントが、配列番号：61のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：62のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号：63のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：64のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：65のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号：66のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む、前記抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項119】

重鎖可変領域が、配列番号：21のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：22のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項118に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項120】

重鎖が、配列番号：25のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖が、配列番号：26のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項119に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項121】

抗体がイヌ化抗体である、請求項118に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項122】

重鎖可変領域が、配列番号：44のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：45のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項121に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項123】

重鎖が、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48及び配列番号：49、又は配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48又は配列番号：49と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項122に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項124】

軽鎖が、配列番号：50のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項122又は123に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項125】

抗体がネコ化抗体である、請求項118に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項126】

重鎖可変領域が、配列番号：53のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖可変領域が、配列番号：54のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項125に記載

10

20

30

40

50

の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 2 7】

抗体がキメラ抗体である、請求項118に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 2 8】

重鎖及び／又は軽鎖がイヌ抗体に由来する定常ドメインを含む、請求項127に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 2 9】

重鎖が、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34及び配列番号：35、又は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34又は配列番号：35と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項128に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

10

【請求項 1 3 0】

軽鎖が、配列番号：36のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項128又は129に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 3 1】

抗体又は抗原結合フラグメントが交差反応性であり、かつヒト、イヌ、げっ歯類及びネコCD20と結合する、請求項105から130のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 3 2】

配列番号：16のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号：15のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、抗体又はその抗原結合フラグメント。

20

【請求項 1 3 3】

重鎖が、配列番号：17のアミノ酸配列又は、配列番号：17のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は軽鎖が、配列番号：18のアミノ酸配列又は配列番号：18のアミノ酸配列と少なくとも85%の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項132に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 1 3 4】

請求項105から133のいずれか1項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントをコードする单離された核酸。

30

【請求項 1 3 5】

請求項134に記載の核酸を含む、発現ベクター。

【請求項 1 3 6】

請求項135に記載の発現ベクターを取り込んだ宿主細胞。

【請求項 1 3 7】

請求項136に記載の宿主細胞を培養して該細胞に抗体を発現させる工程を含む、抗体を製造する方法。

【請求項 1 3 8】

B細胞によって媒介される症状の治療又は予防で使用される、請求項91から133のいずれか1項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

40

【請求項 1 3 9】

B細胞によって媒介される症状を治療又は予防する方法であって、請求項91から133のいずれか1項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントの治療的に有効な量をB細胞によって媒介される症状を治療又は予防する必要がある対象動物に投与する工程を含む、前記方法。

【請求項 1 4 0】

B細胞媒介症状の治療又は予防用医薬の調製における、請求項91から133のいずれか1項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントの使用。

【請求項 1 4 1】

診断で使用される、請求項91から133のいずれか1項に記載の抗体又は抗原結合フラグメ

50

ント。

【請求項 142】

CD20の環状ポリペプチドフラグメントであって、

- (i) アミノ酸残基SEKNS (配列番号: 67) から成る連続するアミノ酸配列、
- (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
- (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、

を含み、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される、前記環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 143】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基SEKNSL (配列番号: 68) から成る、請求項142に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 144】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基PSEKNS (配列番号: 69) から成る、請求項142に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 145】

連続アミノ酸配列がアミノ酸残基PSEKNSL (配列番号: 1) から成る、請求項142に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 146】

環状ポリペプチドフラグメントが25未満のアミノ酸残基を含む、請求項142から145のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 147】

環状ポリペプチドフラグメントが22未満のアミノ酸残基を含む、請求項146に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 148】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号: 2又は配列番号: 2と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成る、請求項145に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 149】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号: 4又は配列番号: 4と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成る、請求項145に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 150】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号: 3又は配列番号: 3と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成る、請求項144に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 151】

環状ポリペプチドフラグメントが、配列番号: 6又は配列番号: 6と少なくとも85%の配列同一性を有するアミノ酸配列から成る、請求項142に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 152】

環状ポリペプチドフラグメントの拮抗性結合メンバーによる結合が、CD20の生物学的活性に拮抗する、請求項142から151のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメント。

【請求項 153】

請求項142から152のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメント及び医薬的に許容できる担体又は賦形剤を含む医薬組成物。

【請求項 154】

請求項142から152のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメントを含むワクチン組成物。

【請求項 155】

10

20

30

40

50

CD20と特異的に結合する結合メンバーを取出する方法における、請求項142から152のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメントの使用。

【請求項 156】

CD20と特異的に結合する結合メンバーを取出する方法が、イヌCD20と特異的に結合する結合メンバーを取出する方法である、請求項155に記載の使用。

【請求項 157】

CD20と特異的に結合する結合メンバーを取出する方法が、ネコCD20と特異的に結合する結合メンバーを取出する方法である、請求項155に記載の使用。

【請求項 158】

請求項142から152のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメントを対象動物に投与する工程、及び前記ポリペプチドと特異的に結合する結合物質を単離する工程、を含む、CD20と特異的に結合する結合メンバーを取出する方法。

【請求項 159】

イヌCD20と特異的に結合する結合メンバーを取出する方法である、請求項158に記載の方法。

【請求項 160】

ネコCD20と特異的に結合する結合メンバーを取出する方法である、請求項158に記載の方法。

【請求項 161】

候補化合物を請求項142から152のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメントと接触させる工程、及び、

該候補化合物と請求項142から152のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメントとの間の結合を評価する工程、
を含む、イヌ及び／又はネコCD20と特異的に結合する結合メンバーを同定するスクリーニング方法であって、該候補化合物と請求項142から152のいずれか1項に記載の環状ポリペプチドフラグメントとの間の結合がある場合に、該候補化合物をイヌ及び／又はネコCD20と特異的に結合する結合メンバーであると同定する、前記スクリーニング方法。

【請求項 162】

請求項91から133のいずれか1項に記載の1つ以上の抗体とサンプルとを、Bリンパ球／抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させる工程、及び、

Bリンパ球／抗体複合体を検出する工程、

を含む、Bリンパ球含有サンプルにおけるイヌ又はネコCD20の存在を検出する方法であって、前記複合体が検出されることが、該サンプルにイヌ又はネコCD20が存在することの指標である、前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD20に対し結合特異性を有する抗体と結合する結合エピトープの同定に関する。本発明は、抗体の作出における本エピトープの使用、並びにイヌ及びネコの症状（例えばリンパ腫及び免疫媒介疾患）の治療及び診断における前記エピトープと結合する抗体の使用に及ぶ。本発明はさらに、前記同定したエピトープと結合する抗体に及び。

【背景技術】

【0002】

CD20は、ほとんどのB細胞の表面で発現される活性化されたグリコシル化リンタンパク質であり、前B期に始まり成熟に至るまで濃度は次第に増加する。前記タンパク質には既知の天然のリガンドがなく、その機能は、最適なB細胞免疫応答、特にT細胞非依存性抗原に対する最適なB細胞免疫応答を可能にすることである。前記は細胞膜でカルシウムチャネルとして機能する。前記は細胞内シグナルransductionに必要とされ、さらに細胞増殖及び細胞分化もまた調節できる。

C20は、悪性B細胞（B細胞リンパ腫に密接に関係する）上のこの抗原の高レベル発現

10

20

30

40

50

のために、B細胞リンパ腫の確立されたマーカー又は標的である。モノクローナル抗体を用いてCD20 (Bp35としても知られている) を標的とすることは、ヒトのB細胞リンパ腫の治療、及び免疫媒介症状（例えば慢性関節リウマチ）の治療でも確実な治療アプローチであることが証明されている。ヒトCD20は、モノクローナル抗体、リツキシマブ、イブリツモマブチウキセタン及びトシツモマブ（いずれもB細胞リンパ腫治療で活性な薬剤である）の標的である。

【0003】

コンパニオンアニマル（例えばイヌ及びネコ）は、ヒト疾患に類似する疾患（リンパ腫、免疫媒介性多発性関節炎、血漿性リンパ球性滑膜炎、全身性エリテマトーデス、血管炎及び多様な自己免疫性皮膚病が含まれる）を発症する。イヌリンパ腫は二番目に多いイヌの癌であるが、一方、リンパ腫はネコの診断でもっとも一般的な悪性疾患である。これまでの併用療法を用いた場合、B細胞リンパ腫のイヌの予想生存期間はおよそ9から12ヶ月である。標準的な化学療法レジメンの副作用は人間で認められるものと同様であり、嘔吐、下痢、食欲喪失、発熱及び敗血症が含まれる。

イヌCD20の特徴が調べられており、ヒトCD20のように2つの細胞外（EC）ドメイン、4つのトランスメンブレン（TM）ドメイン、及び3つの細胞内（IC）ドメインを含むと予想されている。イヌCD20はヒトCD20と構造的な相同性を有するが、抗ヒトCD20及び抗げっ歯類CD20モノクローナル抗体は報告によればイヌCD20と結合できない。イヌ及び／又はネコCD20との結合特異性を有する抗体の同定は、B細胞リンパ腫を有するイヌ及びネコの治療又は診断で特に有用であろう。

10

20

30

【発明の概要】

【0004】

広範囲にわたる実験の結果、驚くべきことに本発明者は、イヌ及びネコCD20ポリペプチドの新規な抗原性ループを同定した。前記ポリペプチドループ配列が第一及び第二のシステインアミノ酸残基間で提供されるジスルフィド結合によって拘束されると、このループは抗ヒトCD20モノクローナル抗体と特異的に結合することができる。結果として、本発明者は、ヒトCD20との結合特異性を有するある種のモノクローナル抗体はまた、イヌ及び／又はネコCD20に対する結合特異性を有するそのような抗体の故に、イヌ及びネコの治療及び診断に適用できることを初めて認定した。特に、同定したこの新規なエピトープは、CD20⁺B細胞リンパ腫及び免疫媒介症状の診断、治療及び／又は予防で使用される新規な抗イヌ又は抗ネコCD20抗体の同定において特別な有用性を有し得る。

30

【0005】

本発明の第一の特徴にしたがえば、B細胞によって媒介される症状を治療又は予防する必要があるイヌ又はネコ対象動物でB細胞によって媒介される症状の治療又は予防で使用される、CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが提供され、前記環状ポリペプチドフラグメントは、

(i) アミノ酸残基SEKNS（配列番号：67）を含むか、配列番号：67から成るか、又は本質的に配列番号：67から成る連続するアミノ酸配列、

(ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、

(iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、
を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成り、ここで、該環状ポリペプチドフラグメントは、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される。

40

本発明の第二の特徴にしたがえば、B細胞によって媒介される症状を治療又は予防する必要があるイヌ又はネコ対象動物においてB細胞によって媒介される症状を治療又は予防する方法が提供され、前記方法は、CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの治療的に有効な量を投与する工程を含み、ここで、前記環状ポリペプチドフラグメントは、

(i) アミノ酸残基SEKNS（配列番号：67）から成る連続するアミノ酸配列、

(ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、

50

(iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、を含み、該環状ポリペプチドフラグメントは、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される。

【0006】

ある種の実施態様では、本発明のこの特徴の方法は、さらに少なくとも1つの免疫抑制化合物をイヌ又はネコ対象動物に投与する工程を含むことができる。該免疫抑制化合物は、該抗体又は抗原結合フラグメントの投与前に、投与と一緒に(同時に)又は投与後に(経時に)投与することができる。該免疫抑制剤は、増殖因子阻害剤、免疫抑制剤(例えば抗体)、抗炎症剤、酵素阻害剤、ステロイド、非ステロイド性抗炎症薬、代謝阻害剤、細胞傷害剤及び細胞増殖抑制剤から成る群から選択できる。

B細胞によって媒介される症状が慢性関節リウマチである実施態様では、該抗体は場合によって第二の治療薬剤と一緒に投与でき、前記は好ましくはメトトレキセートである。

本発明の第三の特徴にしたがえば、B細胞によって媒介される症状を治療又は予防する必要があるイヌ又はネコ対象動物においてB細胞によって媒介される症状を治療又は予防する医薬の調製における、CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントの使用が提供され、ここで、前記環状ポリペプチドフラグメントは、

(i) アミノ酸残基SEKNS(配列番号:67)から成る連続するアミノ酸配列、
(ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
(iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、
を含み、該環状ポリペプチドフラグメントは、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される。

【0007】

本発明者は、本発明の上記特徴の環状ポリペプチドフラグメントがエピトープを形成することを認定した。該環状ポリペプチドフラグメントによって形成されるエピトープはヒト、イヌ、ネコ及びマウスに共通である。ある種の実施態様では、該連続アミノ酸配列は、アミノ酸残基SEKNSL(配列番号:68)を含むか、SEKNSLから成るか、又は本質的にSEKNSLから成る。本発明者は、配列番号:68を含む環状ポリペプチドフラグメントによって形成されるエピトープはイヌ及びネコに共通であることを認定した。ある種の実施態様では、該連続アミノ酸配列は、アミノ酸残基PSEKNS(配列番号:69)を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成る。本発明者は、配列番号:69を含む環状ポリペプチドフラグメントによって形成されるエピトープはヒト、イヌ及びネコに共通であることを認定した。ある種の実施態様では、該連続アミノ酸配列は、アミノ酸残基PSEKNSL(配列番号:1)を含むか、PSEKNSLから成るか、又は本質的にPSEKNSLから成る。本発明者は、配列番号:1を含む環状ポリペプチドフラグメントによって形成されるエピトープはイヌ及びネコに共通であることを認定した。

【0008】

ある種の実施態様では、該環状ポリペプチドフラグメントは、配列番号:2又は前記配列と少なくとも85%、90%若しくは95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、又は本質的に前記配列から成る。典型的には該対象動物はイヌである。

ある種の実施態様では、該環状ポリペプチドフラグメントは、配列番号:4又は前記配列と少なくとも85%、90%若しくは95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列から成るか、又は本質的に前記配列から成る。典型的には該対象動物はネコである。

ある種の実施態様では、該抗体は、II型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体、例えばB1-H299、GA101又はB1y1に由来する。ある種の実施態様では、該抗体は、イヌ化又はネコ化抗体、例えばイヌ化又はネコ化II型抗ヒトCD20若しくは抗げっ歯類CD20抗体、例えばイヌ化又はネコ化B1-H299、GA101若しくはB1y1抗体である。

【0009】

10

20

30

40

40

50

ある種の実施態様では、抗体又はその抗原結合フラグメントはGA101に由来する。対象動物がイヌである場合には、典型的には、抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号：7のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR1フレームワーク領域、配列番号：8のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR2フレームワーク領域、配列番号：9のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR3フレームワーク領域、及び配列番号：10のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR4フレームワーク領域の少なくとも1つを含む軽鎖可変領域、及び／又は配列番号：11のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR1フレームワーク領域、配列番号：12のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR2フレームワーク領域、配列番号：13のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR3フレームワーク領域、及び配列番号：14のアミノ酸配列から成るか又は前記配列を含むFR4フレームワーク領域の少なくとも1つを含む重鎖可変領域を含むことができる。ある種の実施態様では、該軽鎖可変領域は上述の軽鎖フレームワーク領域の全てを含み、及び／又は該重鎖可変領域は上述の重鎖フレームワーク領域の全てを含む。ある種の実施態様では、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号：15のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、及び／又は配列番号：16のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。ある種の実施態様では、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号：18のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖、及び／又は配列番号：17のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域を含む。10 20

【0010】

ある種の実施態様では、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号：55のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：56のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：57のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：58のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：59のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：60のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む。上記CDRを有する抗体はRA2と称される。

ある種の実施態様では、該抗体又はその抗原結合フラグメントはRA2に由来し、例えば該抗体又はその抗原結合フラグメントはイヌ化又はネコ化RA2であり得る。30

対象動物がイヌでRA2がイヌ化RA2である、ある種の実施態様では、該重鎖可変領域は、配列番号：37のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：38のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。対象動物がイヌである、ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41及び配列番号：42、又は配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41又は配列番号：42と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。対象動物がイヌである、ある種の実施態様では、該軽鎖は、配列番号：43のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。40

【0011】

対象動物がネコでRA2がネコ化されるある種の実施態様では、該重鎖可変領域は、配列番号：51のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：52のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

ある種の実施態様では、該抗体又は抗原結合フラグメントはキメラ抗体(例えばイヌ又はネコ重鎖及び／又は軽鎖の定常ドメインを含む)を含む。対象動物がイヌである、ある種の実施態様では、該抗体又はその抗原結合フラグメントはキメラRA2を含み、例えば重鎖は、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29及び配列番号：30、又は配列番号：2750

、配列番号：28、配列番号：29又は配列番号：30と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。対象動物がイヌである、ある種の実施態様では、該軽鎖は、配列番号：31のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0012】

ある種の実施態様では、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、配列番号：61のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：62のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：63のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：64のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：65のアミノ酸配列を含むCDR2領域、及び配列番号：66のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む。上記CDRを有する抗体はRF2と称される。

ある種の実施態様では、該抗体又はその抗原結合フラグメントはRF2に由来し、例えば該抗体又はその抗原結合フラグメントはイヌ化又はネコ化RF2であり得る。

対象動物がイヌで抗体がイヌ化RF2である、ある種の実施態様では、該重鎖可変領域は、配列番号：44のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：45のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。対象動物がイヌである、ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48及び配列番号：49、又は配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48又は配列番号：49と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。対象動物がイヌである、ある種の実施態様では、該軽鎖は、配列番号：50のアミノ酸配列又は前記と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0013】

対象動物がネコで抗体がネコ化RF2である、ある種の実施態様では、該重鎖可変領域は、配列番号：53のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：54のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

対象動物がイヌである、ある種の実施態様では、該抗体又は抗原結合フラグメントはキメラRF2を含み、例えば重鎖は、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34及び配列番号：35、又は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34又は配列番号：35と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。対象動物がイヌである、ある種の実施態様では、該軽鎖は、配列番号：36のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0014】

ある種の実施態様では、B細胞媒介症状は、血液又はB細胞リンパ腫(特にCD20⁺B細胞リンパ腫)中の多数の腫瘍細胞を特徴とする血液学的悪性疾患である。ある種の実施態様では、該症状は、低レベルのB細胞CD20発現を特徴とする血液学的悪性疾患、例えば以下から成る群から選択される症状である：形質転換性非ホジキンリンパ腫、B細胞前駆細胞性リンパ芽球性白血病／リンパ腫及び成熟B細胞性新形成、例えばB細胞慢性リンパ球性白血病(CLL)／小リンパ球性リンパ腫(SLL)、B前リンパ球性白血病(B-PLL)、リンパ球形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、濾胞性リンパ腫(FL)(軽度、中等度、重度FLを含む)、皮膚濾胞性リンパ腫(cutaneous follicle center lymphoma)、辺縁層B細胞リンパ腫(MALT型、小節及び脾臓型)、ヘアリーセル白血病、びまん性大B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞ミエローマ、移植後リンパ球増殖異常、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、及び脱分化大細胞リンパ腫(ALCL)。ある種の実施態様では、該症状は、非ホジキンリンパ腫、例えば再発性及び以前に治

10

20

30

40

50

療された軽度非ホジキンリンパ腫（NHL）である。

【0015】

ある種の実施態様では、B細胞によって媒介される症状は免疫媒介疾患である。典型的には、該免疫媒介疾患は自己免疫疾患、免疫異常又は炎症性疾患で、以下から成る群から選択できる：慢性関節リウマチ、全身性エリテマトーデス（SLE）、ショーグレン症候群、血管炎、多発性硬化症、グレーヴズ病、特発性血小板減少症、皮膚筋炎、免疫媒介血小板減少症、多発性筋細胞症、天疱瘡、免疫媒介溶血性貧血及び水疱性類天疱瘡。ある種の実施態様では、免疫媒介疾患は以下から成る群から選択される：若年性慢性関節リウマチ、ウェグナー病、炎症性腸疾患、特発性血小板減少性紫斑病（ITP）、血栓性血小板減少性紫斑病（TTP）、自己免疫血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、IgA腎症、IgM多発性ニユーロパシー、重症筋無力症、血管炎、真性糖尿病、レイノー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃炎、橋本甲状腺炎、強直性脊椎炎、C-型肝炎関連クリオグロブリン血症性血管炎、慢性巣状脳炎、水疱性類天疱瘡、血友病A、膜性増殖性糸球体腎炎、成人及び若年性皮膚筋炎、多発性筋炎、慢性ウチカリア（uticaria）、原発性胆汁性肝硬変、視神経脊髄炎、グレーヴズ甲状腺障害病、膜性増殖性糸球体腎炎、チャーグ-シュトラウス症候群、喘息、乾癬性関節炎、皮膚炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、湿疹、アテローム性硬化症、白血球粘着不全、若年開始糖尿病、ライター病、ベーチェット病、溶血性貧血、アトピー性皮膚炎、尋常性天疱瘡、ウェグナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性伝染性単核細胞症、HIV及びヘルペス関連疾患、全身性硬化症、及び糸球体腎炎。前述の症状で、B細胞枯渇はそのような症状の処置に治療的アプローチを提供し得ることが理解されよう。

10

20

20

【0016】

ある種の実施態様では、化学薬剤又は放射能標識を該抗体又は抗原結合フラグメントに結合させ、該化学薬剤又は標識を新形成B細胞に特異的にデリバーカーすることができる。前記化学薬剤又は放射能標識はCD20発現細胞を破壊する潜在能力を有する。

本発明の第四の特徴にしたがえば、CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合するイヌ化又はネコ化抗体又はその抗原結合フラグメントが提供され、ここで、前記環状ポリペプチドフラグメントは、

- (i) アミノ酸残基SEKNS（配列番号：67）から成る連続するアミノ酸配列、
- (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
- (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、

30

を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成り、該環状ポリペプチドフラグメントは、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される。

ある種の実施態様では、該抗体は、イヌ以外の種に由来するドナー抗体の重鎖及び/又は軽鎖の相補性決定領域を含むイヌ化抗体であり、該ドナー抗体は該環状ポリペプチドフラグメントに対して結合特異性を有する。ある種の実施態様では、該抗体は、ドナー抗体由来の重鎖及び/又は軽鎖のフレームワーク領域を含む。ある種の実施態様では、該ドナー抗体由来重鎖及び/又は軽鎖のフレームワーク領域は、イヌ抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基をイヌ抗体の対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換するべく改変される。

40

【0017】

ある種の実施態様では、該抗体は、ネコ以外の種に由来するドナー抗体の重鎖及び/又は軽鎖の相補性決定領域を含むネコ化抗体であり、該ドナー抗体は該環状ポリペプチドフラグメントに対して結合特異性を有する。ある種の実施態様では、該抗体は、ドナー抗体由来の重鎖及び/又は軽鎖のフレームワーク領域を含む。ある種の実施態様では、該ドナー抗体由来重鎖及び/又は軽鎖のフレームワーク領域は、ネコ抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基をネコ抗体の対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換するべく改変される。

典型的には、イヌ又はネコ抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基は当該対応す

50

る位置に存在するアミノ酸残基で置換され、前記アミノ酸残基は、当該置換されるアミノ酸残基と最高の相同性を有する。

典型的には、該抗体又は抗原結合フラグメントはイヌ又はネコ抗体由来の重鎖及び/又は軽鎖の定常ドメインを含む。

ある種の実施態様では、該抗体はII型抗ヒトCD20又は抗げっ歯類CD20抗体に由来し(すなわち前記のイヌ化又はネコ化バージョン)、例えば、該抗体はB1-H299、GA101及びB1y1から成る群から選択できる。

ある種の実施態様では、該抗体はRA2又はRF2に由来し(すなわち前記のイヌ化又はネコ化バージョン)、例えば上記に記載したとおりである。

【0018】

本発明の第五の特徴にしたがえば、CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合するヒト化抗体又はその抗原結合フラグメントが提供され、前記環状ポリペプチドフラグメントは、

(i) アミノ酸残基SEKNS(配列番号:67)から成る連続するアミノ酸配列、
 (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
 (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、
 を含み、該環状ポリペプチドフラグメントは、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化され、さらに該重鎖及び/又は軽鎖のフレームワーク領域はヒト以外の種から得られる抗体に由来し、該フレームワーク領域は、ヒト抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基をヒト抗体の対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換するべく改変される。

ある種の実施態様では、ヒト抗体の対応する位置で異質であるアミノ酸残基は当該対応する位置に存在するアミノ酸残基で置換され、前記アミノ酸残基は、当該置換される1つ以上のアミノ酸残基と最高の相同性を有する。

典型的には、該抗体又は抗原結合フラグメントはヒト抗体由来の重鎖及び/又は軽鎖の定常ドメインを含む。

【0019】

本発明の第六の特徴にしたがえば、CD20の環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合するキメラ抗体又はその抗原結合フラグメントが提供され、ここで、前記環状ポリペプチドフラグメントは、

(i) アミノ酸残基SEKNS(配列番号:67)から成る連続するアミノ酸配列、
 (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
 (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、
 を含み、ここで、該環状ポリペプチドフラグメントは、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化され、さらにここで該抗体はイヌ又はネコ定常ドメインを含む。

本発明の第七の特徴にしたがえば、CD20と特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが提供され、ここで、該抗体又はそのフラグメントは、配列番号:55のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号:56のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号:57のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号:58のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号:59のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号:60のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む。

ある種の実施態様では、該重鎖可変領域は、配列番号:19のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は該軽鎖可変領域は、配列番号:20のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号:23のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び/又は該軽鎖は、配列番号:24のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

20

30

40

50

【0020】

ある種の実施態様では、該抗体はイヌ化抗体である。典型的には、該重鎖可変領域は、配列番号：37のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：38のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41及び配列番号：42、又は配列番号：39、配列番号：40、配列番号：41又は配列番号：42と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、該軽鎖は、配列番号：43のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

10

ある種の実施態様では、該抗体はネコ化抗体である。典型的には、該重鎖可変領域は、配列番号：51のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：52のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

20

【0021】

ある種の実施態様では、該抗体はヒト化抗体である。

ある種の実施態様では、該抗体はキメラ抗体である。典型的には、該重鎖及び／又は軽鎖は、イヌ、ネコ又はヒト抗体由来の定常ドメインを含む。ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29及び配列番号：30、又は配列番号：27、配列番号：28、配列番号：29又は配列番号：30と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、該軽鎖は、配列番号：31のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

典型的には、該抗体又は抗原結合フラグメントは交差反応性であり、ヒト、げっ歯類、イヌ及びネコCD20と特異的に結合する。

20

【0022】

本発明の第八の特徴にしたがえば、CD20と特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントが提供され、ここで、該抗体又はそのフラグメントは、配列番号：61のアミノ酸配列を含む相補性決定領域1(CDR1)領域、配列番号：62のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号：63のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む重鎖可変領域、配列番号：64のアミノ酸配列を含むCDR1領域、配列番号：65のアミノ酸配列を含むCDR2領域及び配列番号：66のアミノ酸配列を含むCDR3領域を含む軽鎖可変領域を含む。

30

ある種の実施態様では、該重鎖可変領域は、配列番号：21のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：22のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号：25のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖は、配列番号：26のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

40

【0023】

ある種の実施態様では、該抗体はイヌ化抗体である。典型的には、該重鎖可変領域は、配列番号：44のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：45のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48及び配列番号：49、又は配列番号：46、配列番号：47、配列番号：48又は配列番号：49と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列から成

50

る群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、該軽鎖は、配列番号：50のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0024】

ある種の実施態様では、該抗体はネコ化抗体である。典型的には、該重鎖可変領域は、配列番号：53のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖可変領域は、配列番号：54のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

ある種の実施態様では、該抗体はヒト化抗体である。

ある種の実施態様では、該抗体はキメラ抗体である。典型的には、該重鎖及び／又は軽鎖は、イヌ、ネコ又はヒト抗体由来の定常ドメインを含む。ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34及び配列番号：35、又は配列番号：32、配列番号：33、配列番号：34又は配列番号：35と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列から成る群から選択されるアミノ酸配列を含む。ある種の実施態様では、該軽鎖は、配列番号：36のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

典型的には、該抗体又は抗原結合フラグメントは交差反応性であり、ヒト、げっ歯類、イヌ及びネコCD20と特異的に結合する。

【0025】

本発明の第九の特徴にしたがえば、配列番号：16のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び／又は配列番号：15のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む該軽鎖可変領域を含む抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。

ある種の実施態様では、該重鎖は、配列番号：17又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、及び／又は該軽鎖は、配列番号：18のアミノ酸配列又は前記配列と少なくとも85%、90%、95%若しくは98%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

本発明の第四から第九の特徴のある種の実施態様では、該抗体又はその抗原結合フラグメントは、平衡解離定数(K_D)が 1×10^{-8} 以下である結合親和性でイヌ及び／又はネコCD20と特異的に結合する。

典型的には、該抗体又は抗原結合フラグメントは単離された抗体又はその抗原結合フラグメントである。

ある種の実施態様では、該抗体又は抗原結合フラグメントは、単鎖Fv(scFv)抗体フラグメント、Fab抗体フラグメント、Fab'抗体フラグメント、及び $F(ab')抗体フラグメントから成る群から選択される。ある種の実施態様では、該抗体又は抗原結合フラグメントは多重特異性抗体又は多価抗体である。$

【0026】

ある種の実施態様では、化学薬剤を第四から第九の特徴のいずれかの抗体又は抗原結合フラグメントに結合させ、該化学薬剤を新形成B細胞に特異的にデリバリーすることができる。前記化学薬剤又は放射能標識はCD20発現細胞を破壊する潜在能力を有する。したがって、本発明は、抗体又はそのフラグメントに化学的リンクナーの手段によって連接させた細胞傷害剤から成るイムノコンジュゲートに及ぶ(前記イムノコンジュゲートは抗体-細胞傷害結合物(ACC)又は抗体薬剤結合物(ADC)としても知られている)。そのようなイムノコンジュゲートは、該薬剤部分の腫瘍細胞への標的照準デリバリーを可能にする。

これに関して有用な薬剤の例にはメトトレキセート及びビンデシンが含まれ、一方、毒素には細菌毒素、植物毒素(例えはリシン)及び小分子毒素(例えはゲルダナマイシン)が含まれるが、ただしこれらに限定されない。

ある種の実施態様では、放射性標識を第四から第九の特徴のいずれかの抗体又は抗原結

10

20

30

40

50

合フラグメントに結合させ、該標識を新形成B細胞に特異的にデリバーすることができる。ある種の実施態様では、該標識は、放射性標識、発蛍光団、発色団、造影剤及び金属イオンを含む(ただしこれらに限定されない)群から選択できる。典型的には、該標識抗体又はフラグメントは診断で有用であり得る。

したがって本発明はさらに、B細胞媒介症状を有すると疑われる対象動物を診断する方法を提供し、前記方法は、標識を結合させた抗体又は抗原結合フラグメントを対象動物に投与する工程、及び該対象動物内における該抗体又は抗原結合フラグメントの分布を検出する工程を含む。多様な実施態様では、該診断方法は、B細胞媒介性異常、免疫異常、自己免疫疾患又は以下に規定するリストから選択される炎症性疾患の診断を含む。

【0027】

本発明の第十の特徴にしたがえば、本発明の第四から第九の特徴のいずれかの抗体又は抗原結合フラグメントをコードする単離核酸が提供される。

さらにまた提供されるものは、前記核酸を含む発現ベクター及び該発現ベクターを取り込んだ宿主細胞である。本発明はさらに抗体を製造する方法に及び、該方法は、前記宿主細胞を培養して該細胞に該抗体を発現させる工程を含む。

本発明はさらに、B細胞によって媒介される症状の治療又は予防で使用される、本発明の第四から第九の特徴のいずれかの抗体又は抗原結合フラグメントに及ぶ。

さらにまた提供されるものは、B細胞によって媒介される症状を治療又は予防する方法であって、前記方法は、本発明の第四から第九の特徴のいずれかの抗体又は抗原結合フラグメントの治療的に有効な量をB細胞によって媒介される症状を治療又は予防する必要がある対象動物に投与する工程を含む。

本発明はまた、B細胞媒介症状の治療又は予防用医薬の製造における、本発明の第四から第九の特徴のいずれかの抗体又は抗原結合フラグメントの使用に及ぶ。

ある種の実施態様では、B細胞媒介症状は、本発明の第一から第三の特徴に関連して上記に記載した任意の症状である。

さらにまた提供されるものは、診断で使用される、本発明の第四から第九の特徴のいずれかの抗体又は抗原結合フラグメントである。

【0028】

本発明はさらに、

- (i) アミノ酸残基SEKNS(配列番号:67)から成る連続するアミノ酸配列、
- (ii) 該連続アミノ酸配列のN-末端領域に存在する第一のシステイン残基、及び、
- (iii) 該連続アミノ酸配列のC-末端領域に存在する第二のシステイン残基、

を含むか、前記から成るか、又は本質的に前記から成るCD20の環状ポリペプチドフラグメントを提供し、該環状ポリペプチドフラグメントは、該第一及び第二のシステイン残基間で形成されるジスルフィド結合の存在によって酸化される。

ある種の実施態様では、該連続アミノ酸配列は、アミノ酸残基SEKNSL(配列番号:68)を含むか、SEKNSLから成るか、又は本質的にSEKNSLから成る。ある種の実施態様では、該連続アミノ酸配列は、アミノ酸残基PSEKNS(配列番号:69)を含むか、PSEKNSから成るか、又は本質的にPSEKNSから成る。ある種の実施態様では、該連続アミノ酸配列は、アミノ酸残基PSEKNSL(配列番号:1)を含むか、PSEKNSLから成るか、又は本質的にPSEKNSLから成る。

ある種の実施態様では、該環状ポリペプチドフラグメントは30、28、25、24、23、22又は21未満のアミノ酸残基を含む。

ある種の実施態様では、該環状ポリペプチドフラグメントは、配列番号:2又は、配列番号:2と少なくとも85%、90%若しくは95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列同一性を有するアミノ酸配列から成るか、又は本質的に前記配列同一性を有するアミノ酸配列から成る。

ある種の実施態様では、該環状ポリペプチドフラグメントは、配列番号:4又は、配列番号:2と少なくとも85%、90%若しくは95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列同一性を有するアミノ酸配列から成るか、又は本質的に前記配列同一性を有

10

20

30

40

50

するアミノ酸配列から成る。

ある種の実施態様では、該環状ポリペプチドフラグメントは、配列番号：3又は、配列番号：3と少なくとも85%、90%若しくは95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列同一性を有するアミノ酸配列から成るか、又は本質的に前記配列同一性を有するアミノ酸配列から成る。

ある種の実施態様では、該環状ポリペプチドフラグメントは、配列番号：6又は、配列番号：6と少なくとも85%、90%若しくは95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むか、前記配列同一性を有するアミノ酸配列から成るか、又は本質的に前記配列同一性を有するアミノ酸配列から成る。

【0029】

10

典型的には、該環状ポリペプチドフラグメントの拮抗性結合メンバーによる結合は、CD20の生物学的活性に拮抗する。

本発明はさらに、該環状ポリペプチドフラグメント及び医薬的に許容できる担体又は賦形剤を含む医薬組成物に及ぶ。

本発明はさらに該環状ポリペプチドフラグメントを含むワクチン組成物に及ぶ。ある種の実施態様では、該環状ポリペプチドフラグメントが、ワクチンの標的種が認識できるT細胞エピトープを含む1つ以上のアミノ酸配列に連結、或いは連合させられる。そのようなアミノ酸配列の典型的な例には、破傷風類毒素又はそのフラグメント、ジフテリア類毒素又はそのフラグメント及びキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)が含まれる。ある種の実施態様では、該ワクチンはさらに、該ワクチンに対して誘引される免疫応答の強さを高めるために選択されるアジュバントを含むであろう。アジュバントの典型的な例にはアルミニウム塩、水中油及び油中水エマルジョン、サポニン並びに脂質A、並びにその誘導体及びホモローグが含まれる。

20

さらにまた提供されるものは、CD20と特異的に結合する結合メンバーを作出する方法における、該環状ポリペプチドフラグメント、例えば配列番号：20の使用である。

ある種の実施態様では、該方法は、イヌCD20と特異的に結合する結合メンバーを作出する方法である。ある種の実施態様では、該方法は、ネコCD20と特異的に結合する結合メンバーを作出する方法である。

【0030】

30

本発明はさらに、CD20と特異的に結合する結合メンバーを作出する方法を提供し、前記方法は以下の工程を含む：

- 上記に記載の環状ポリペプチドフラグメント、例えば配列番号：2の環状ポリペプチドフラグメントを対象動物に投与する工程、及び

- 前記環状ポリペプチドフラグメントと特異的に結合する結合物質を単離する工程。

ある種の実施態様では、該方法は、イヌCD20と特異的に結合する結合メンバーを作出する方法である。ある種の実施態様では、該方法は、ネコCD20と特異的に結合する結合メンバーを作出する方法である。

本発明はさらに、イヌ及び/又はネコCD20と特異的に結合する結合メンバーを同定するスクリーニング方法を提供し、前記スクリーニング方法は、

- 候補化合物を上記記載の環状ポリペプチドフラグメント、例えば配列番号：2を含む環状ポリペプチドフラグメントと接触させる工程、及び

- 該候補化合物と該環状ポリペプチドフラグメントとの間の結合を評価する工程、を含み、該候補化合物と該環状ポリペプチドフラグメントとの間の結合により、該候補化合物をイヌ及び/又はネコCD20と特異的に結合する結合メンバーとして同定する。

ある種の実施態様では、該候補化合物は以下から成る群から選択される：タンパク質(例えば抗体)、ペプチド(例えば融合タンパク質)、ペプチド模倣体、核酸、ポリヌクレオチド、多糖類、オリゴペプチド、炭水化物、脂質、小分子化合物、及び天然に存在する化合物。

【0031】

40

本発明はさらに、Bリンパ球含有サンプルでイヌ又はネコCD20の存在を検出する方法を

50

提供し、前記方法は以下の工程を含む：

- 上記記載の1つ以上の抗体を該サンプルと、Bリンパ球/抗体複合体の形成を可能にする条件下で接触させる工程、及び

- Bリンパ球/抗体複合体を検出する工程、

ここで、前記複合体の検出は、該サンプルにイヌ又はネコCD20が存在することの指標である。

ある種の実施態様では、前記方法はさらに、Bリンパ球/抗体複合体を検出するという手段によって、該サンプルが得られた対象動物がB細胞リンパ腫を有するか否かを決定する工程を含み、ここで前記複合体の存在は、該サンプルが由来した対象動物がB細胞媒介症状、例えばB細胞リンパ腫を有することの指標を提供する。

本発明のさらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかの抗体又は抗原結合フラグメントを製造する、細胞株又はその誘導細胞若しくは子孫細胞を提供する。

さらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかの抗イヌCD20抗体を含む、イヌでCD20⁺B細胞リンパ腫を治療又は診断するキットを提供する。さらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかの抗ネコCD20抗体を含む、ネコでCD20⁺B細胞リンパ腫を治療又は診断するキットを提供する。

さらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかの抗イヌCD20抗体を含む、免疫媒介症状を治療するキットを提供する。さらにまた別の特徴は、本発明の前述の特徴のいずれかの抗ネコCD20抗体を含む、免疫媒介症状を治療するキットを提供する。

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】配列番号：2のアミノ酸配列を有するイヌCD20由来環状ポリペプチドフラグメントのアミノ酸配列を示す。表示の167及び183位に対応する2つのシステイン残基間にジスルフィド結合を有する。

【図2A】H299及びBiogenex B1(BG)モノクローナル抗体とジスルフィド結合形成ヒト(H20)、げっ歯類(M20)及びイヌ(C20)CD20ポリペプチドフラグメントとの結合を示す。

【図2B】H299及びBiogenex B1(BG)モノクローナル抗体とジスルフィド結合形成ヒト(H20)、げっ歯類(M20)及びイヌ(C20)CD20ポリペプチドフラグメントとの結合を示す。

【図3A】H299とCHO細胞で発現されたヒト及びイヌCD20の両CD20との結合を示す。図3Aは、H299モノクローナル抗体(6 μg/mL)とイヌCD20 CHO細胞との結合を示す。

【図3B】H299とCHO細胞で発現されたヒト及びイヌCD20の両CD20との結合を示す。図3Bは、H299モノクローナル抗体(6 μg/mL)とヒトCD20 CHO細胞との結合を示す。

【図3C】H299とCHO細胞で発現されたヒト及びイヌCD20の両CD20との結合を示す。図3Cは、二次抗マウスPE抗体(Sigma P9287)とイヌCD20 CHO細胞との結合を示す。

【図3D】H299とCHO細胞で発現されたヒト及びイヌCD20の両CD20との結合を示す。図3Dは、二次抗マウスPE抗体(Sigma P9287)とヒトCD20 CHO細胞との結合を示す。

【図4】異なる2つのII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体(H299及びB1y1)とジスルフィド結合形成イヌCD20ポリペプチドフラグメントとの結合の比較を示す。

【図5A】異なる2つのII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体(H299及びB1y1)とヒトCD20及びイヌCD20発現CHO細胞との結合をFACSによって示す。

【図5B】異なる2つのII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体(H299及びB1y1)とヒトCD20及びイヌCD20発現CHO細胞との結合をFACSによって示す。

【図5C】異なる2つのII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体(H299及びB1y1)とヒトCD20及びイヌCD20発現CHO細胞との結合をFACSによって示す。

【図5D】異なる2つのII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体(H299及びB1y1)とヒトCD20及びイヌCD20発現CHO細胞との結合をFACSによって示す。

【図5E】異なる2つのII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体(H299及びB1y1)とヒトCD20及びイヌCD20発現CHO細胞との結合をFACSによって示す。

10

20

30

40

50

【図 5 F】異なる2つのII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体(H299及びB1y1)とヒトCD20及びイヌCD20発現CHO細胞との結合をFACSによって示す。

【図 6】II型モノクローナル抗体、H299とジスルフィド結合形成イヌCD20ペプチドとの結合は、ジチオスレイトール(DTT)によるジスルフィド結合の還元によって消失するが、一方、ジスルフィド結合形成ヒトCD20ペプチドとの結合はDTT処理によって低下するが消失しないことを示す。

【図 7】完全なイヌ化GA101 VKカッパ可変軽鎖アミノ酸配列(図7a、配列番号:15)及び重鎖(図7b、配列番号:16)を示す(CDR領域残基は太字で示されている)。

【図 8】同時発現させた配列番号:17及び18から構築した組換えイヌ化GA101(ヒト化B1y1)はイヌCD20ペプチド配列番号:2と結合することを示す。

【図 9】新規なげっ歯類MAb(RA2及びRF2)と環状化イヌ、ヒト、マウス及びネコCD20ペプチド(ヒトCD20環状ペプチド(配列番号:3)(RA2とは弱く結合)及びイヌCD20環状化ペプチド(配列番号:2)とともにげっ歯類CD20ペプチド(配列番号:6)及びネコCD20(配列番号:4)ペプチドとの結合を示す。

【図 10】10a-dは、RA2(a、b)及びRF2(c、d)モノクローナル抗体の誘導可変ドメイン重鎖及び軽鎖配列を示す(CDRには下線が施されている)。10eはRA2及びRF2可変ドメインのアラインメントを示す。

【図 11】組換えマウスRA2及びRF2 MAbと環状化CD20ペプチドとの結合を示す。

【図 12】イヌ、ネコ、ヒト及びマウスCD20由来ペプチドループのアラインメントを示し、より短い共通のペプチドエピトープSEKNS(II型抗ヒトCD20モノクローナル抗体とヒト及びイヌCD20との共通の結合から推論されたPSEKNSLのサブエピトープ)を例証する。

【図 13】イヌ化RA2の重鎖可変ドメイン(図13a)及び軽鎖可変ドメイン(図13b)を示す。

【図 14】イヌ化RF2の重鎖可変ドメイン(図14a)及び軽鎖可変ドメイン(図14b)を示す。

【図 15】げっ歯類、げっ歯類/イヌキメラ及びイヌ化RA2並びにRF2抗体のCHO細胞で発現させプロテインAで精製した形態のSDS-PAGE分析を示す。

【図 16 a】組換えキメラ及びイヌ化RA2並びにRF2モノクローナル抗体とイヌ、ネコ、マウス及びヒト環状化CD20ペプチドとのELISAにおける結合を示す。

【図 16 b】組換えキメラ及びイヌ化RA2並びにRF2モノクローナル抗体とイヌ、ネコ、マウス及びヒト環状化CD20ペプチドとのELISAにおける結合を示す。

【図 17 a】補体C1qとcaCD20ペプチド固定キメラ及びイヌ化RA2並びにRF2との結合を示す。

【図 17 b】補体C1qとcaCD20ペプチド固定キメラ及びイヌ化RA2並びにRF2との結合を示す。

【図 17 c】補体C1qとcaCD20ペプチド固定キメラ及びイヌ化RA2並びにRF2との結合を示す。

【図 18】可溶性組換えイヌ高親和性Fcレセプター(scaCD64)とcaCD20ペプチド固定キメラ及びイヌ化RA2並びにRF2との結合を示す。

【発明を実施するための形態】

【0033】

発明の詳細な説明

本発明は、II型抗ヒトCD20モノクローナル抗体と特異的に結合する、ジスルフィド結合が形成され構造的に拘束されたイヌCD20抗原ループの同定に関する。CD20のこの新規なエピトープのアミノ酸配列は図1に示されている(図1には2つのシステイン残基間のジスルフィド結合が示されている)。本規定エピトープは、前記と特異的に結合する結合因子と結合したとき、CD20の機能に対し拮抗作用を生じる。

理論に拘束されないが、驚くべきことに本発明者は、抗ヒトCD20及び/又は抗げっ歯類CD20モノクローナル抗体は、ジスルフィド結合が形成され構造的に拘束された新規なイヌCD20抗原ループと結合できることを認定した。特に、本発明者は、モノクローナル抗体と

10

20

30

40

50

イヌCD20との結合は該ポリペプチドの立体的構造に決定的に依存し、該立体的構造は2つのシステイン残基間に提供されるジスルフィド結合の存在に依存することを示した。

特に、本発明者は、配列番号：2のアミノ酸配列を含むイヌCD20に由来するポリペプチドを同定した。さらにまた、システイン残基の存在がジスルフィド結合の存在のために必要であるという認識に続いて、本発明者は、ジスルフィド結合の形成に使用されるシステイン残基がいくつかの種のCD20タンパク質間に保存されることを見出した。特に、種々の種に由来するCD20の相同なジスルフィド結合形成ペプチドは、CD20⁺B細胞媒介症状の診断及び治療で使用される、診断用及び治療用結合物質の同定で有用であり得る。そのような種にはヒト、ネコ、ウマ及びげっ歯類が含まれ、それぞれ配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5及び配列番号：6に示すポリペプチド配列を有する。

10

【0034】

抗CD20モノクローナル抗体はI型及びII型抗CD20モノクローナル抗体として分類できる。この分類は、悪性B細胞を殺滅するために利用される作用メカニズムに左右される。I型（リツキシマブ様）モノクローナル抗体はCD20を形質膜中の大きな脂質ラフト又はミクロドメインに誘導して再分布させるが、II型（トシツモマブ様）はそのような作用をもたない。重要なことには、CD20のこの再分布は、抗CD20モノクローナル抗体の治療成果を左右する結合特性及びエフェクター機能の多くに影響を与える。

驚くべきことに、本発明者は、II型抗ヒトCD20モノクローナル抗体H299及びGA101（その親のマウスモノクローナル抗体B1y1を含む）は、ヒトCD20だけでなくイヌCD20と結合すること、さらに配列番号：2のポリペプチドはこの決定の実施を可能にすることを見出した。本発明者はまた、驚くべきことに他のII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体がイヌCD20と結合することを示した。このことは驚くべきことである。なぜならば、I型抗ヒトCD20モノクローナル抗体（例えばリツキサン）はイヌCD20と結合しないからである。

20

【0035】

Polyak and Deans (Blood 99, 3256:2002)によれば、II型抗ヒトCD20モノクローナル抗体H299及びB1y1は、ヒトCD20の同様なエピトープと結合する。Niederfellner et al. (2011)は、H299及びB1y1は、それぞれの連続残基172-PSEKNSP-178に依存してヒトCD20と結合すると決定した。I型抗ヒトCD20モノクローナル抗体（例えばリツキシマブ及びC2H7）は、より多くのN-末端連続残基168-EPANPSEK-175に依存する結合を示す。これらの残基は、イヌ及びげっ歯類CD20ペプチドと以下のようにアラインメントされる（I型には下線が施され、II型は斜字体で示される）。

30

【0036】

【化1】

ヒト IYNCEPANPSEKNSPSTQYC (配列番号3)

イヌ IHNCDPANPSEKNSLSIQYC (配列番号2)

ネズミ IYDCEPSNSSEKNSPSTQYC (配列番号6)

【0037】

驚くべきこと、本発明者による更なる精査によって以下のネコの類似配列が同定された：

40

【0038】

【化2】

ネコ IHTCQPESKPSEKNSLSIKYC (配列番号4)

【0039】

したがって、本発明はさらに、ジスルフィド結合が形成され構造的に拘束されたネコCD20抗原ループの同定に関する。

理論に拘束されないが、本発明者は、リツキシマブとイヌCD20との結合の欠如はイヌ配列のアミノ酸残基D168（ヒト配列ではE）によると認定した。さらに、本発明者はまた、I型抗ヒトCD20モノクローナル抗体（例えばH299モノクローナル抗体）と結合するための

50

ヒトCD20中の決定的領域はP178であると認定した（P178はイヌCD20ではLである）。本発明者は、なぜH299はヒトCD20と結合するよりも弱くイヌCD20と結合するのかを説明するの 10 は、配列番号：2及び3のヒトCD20及びイヌCD20ポリペプチドとの間のP178Lのアミノ酸の相違であると結論する。

【0040】

本発明者は、GA101抗ヒトCD20モノクローナル抗体（この抗体はイヌCD20と結合することが知られてなかった）を取り上げ、イヌCD20と特異的に結合する抗体を作製した。さらにまた、本発明者は、ヒト、イヌ、げっ歯類及びネコCD20と特異的に結合するRA2及びRF2抗げっ歯類CD20抗体を提供した。本発明のイヌ化及びネコ化及びヒト化抗体（これらは標準的なCDR移植技術では作製されない）は、イヌ、ヒト及び／又はネコCD20との高親和性結合を提示することが示される。前記抗体は、イヌ、ヒト又はネコに投与されたときにそれらに対して異種抗体が產生されることがないように、当該フレームワーク領域及び定常領域が適切なようにイヌ、ヒト又はネコIgG分子に存在する残基のみを取り込むように設計されている。

10

【0041】

本発明者が利用した、本発明の抗体のための重鎖及び軽鎖可変領域を作出するプロセスは、標的種にとって当該位置で異質であることが判明している個々のドナーフレームワークアミノ酸残基を、標的種（例えばイヌ、ネコ又はヒト）の当該位置で見出され、さらに本発明者の分析によれば該CDR領域の立体構造を維持する（したがって結合特異性及びアビギナーを維持する）が非改変形で標的種に投与されたら該抗体に対して中和抗体生成をもたらし得る免疫原性エピトープの存在を低下させる残基で置換することに帰着する。特に、本発明の抗体を調製する方法（ペチセーション（PETisation）として知られている）は、ドナー抗体のフレームワーク領域の配列を標的種に由来する抗体又は抗体プールの配列と比較することによって、標的種への投与に対する適切性についてドナー（例えばヒト）抗体のフレームワーク領域の配列を評価することを含む。比較はドナー配列と標的配列のただ1つのメンバーとの間で実施できるが、標的配列プールとの比較が好ましいことは明白であろう。なぜならば、標的配列プールとの比較は、標的種の各Kabatの位置で自然な選択肢の数を増大させるからである。前記は、ドナーと標的との間の“マッチング”的な機会を増加させるだけでなく、マッチングが存在しない場合の置換の選択肢もまた増大させるであろう。結果として、ドナーに可能な限り近い特性をもつ置換を選択することが可能であろう。ドナー配列と標的配列が任意のKabat番号又は対応する位置で異なる場合、ドナー配列は、問題のアミノ酸残基を標的種の当該位置で自然であることが判明しているアミノ酸残基で置換するべく改変される。

20

【0042】

ドナーの免疫グロブリンフレームワーク領域に存在するアミノ酸残基の置換が必要な場合、典型的には、置換は保存的置換の原則を用いて実施される（保存的置換では、アミノ酸残基は、標的種の当該Kabatの位置で自然であり、さらにドナー配列の置換されるアミノ酸とサイズ、荷電及び疎水性において可能な限り近縁であるアミノ酸残基で入れ替えられる）。その意図は、ドナー抗体の三次元構造に混乱又は破壊を全く引き起こさないか又は前記を少なくとも最小にする入れ替えを選択することである。ある種の状況では、明瞭な選択肢が存在せず、各選択が利益及び不利益を有するであろう。最終的な決定には三次元モデリング又は多様な選択配列の発現さえ要求され得る。しかしながら、一般的には明瞭な優先性を利用できるであろう。この方法の結果として、ドナー配列の変更は、当該残基が標的内で異質であるときにのみ実施され、入れ替えアミノ酸は、前記が入れ替えるアミノ酸と可能な限り近縁である。したがって、異質なエピトープの発生は回避されるが、全体的な三次元構造は保存され、結果として親和性及び特異性もまた保存される。

30

本明細書で用いられる“エピトープ”という用語は、特異的抗体が結合できる巨大分子の1つの部分又は複数の部分（本事例ではポリペプチド、特にCD20の1つの部分）に関する。エピトープは、一般的には化学的に活性な表面基から成り、固有の三次元の構造特性を固有の荷電特性とともに有する。典型的には、CD20結合物質又は結合化合物はCD20の結合

40

50

活性に拮抗し、したがって、阻害エピトープ (inhibiting epitope) 又は阻害性エピトープ (inhibitory epitope) として知られているエピトープと結合する。“阻害”又は“阻害性”エピトープはCD20上に存在するエピトープを意味し、前記は、結合化合物（例えば小分子又は抗体）が結合したとき、CD20の生物活性の消失をもたらす。

【0043】

エピトープは、あるポリペプチド配列内に含まれる連続又は非連続アミノ酸残基配列により規定できる。“連続エピトープ”という用語は、あるポリペプチド内の（エピトープを規定する）一連の直鎖状アミノ酸残基で構成されるエピトープと規定される。連続エピトープは、該ペプチドが、例えばループを形成することによって立体構造的に拘束されるならば立体構造性であり得る。“非連続エピトープ”（.立体構造性及び不連続性エピトープとも称され得る）は、アラインメントで非直鎖状である一連のアミノ酸残基を含むエピトープであり、それは、該残基が、ポリペプチド配列の全長に沿って不連続な態様で一定の間隔を置いて配置されているか又はグループを形成しているということである。非連続エピトープは、該アミノ酸が2つの直線状配列のグループを形成する場合に不連続性エピトープであり得る。或いは非連続エピトープは、エピトープに寄与する残基が、該ポリペプチドの全長に沿って編成される3つ以上の直鎖状アミノ酸配列グループとして提供される場合に不連続性分散エピトープであり得る。

本明細書で規定されるように、“抗体”は、問題の標的抗原（本事例ではイヌ及び/又はネコCD20）と特異的に結合する抗原結合タンパク質を包含し、組換えにより調製され得るか、又は免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによって遺伝的にコードされ得るポリペプチドを含む。“抗体”という用語は、モノクローナル抗体及びキメラ抗体、特にイヌ化及びネコ化抗体を包含し、さらにまたポリクローナル抗体又は任意のクラス若しくはサブタイプの抗体を包含する。“抗体”はさらにハイブリッド抗体、二特異性抗体、ヘテロ抗体、及び抗原結合を維持する前記の機能的フラグメントに及ぶ。

【0044】

抗体の定常領域は任意の適切な免疫グロブリンサブタイプであり得るが、抗体サブタイプがIgGであることが好ましい。そのような抗体はさらに任意のサブクラス、例えばイヌではIgG-A、IgG-B、IgG-C及びIgG-Dに属することが可能で、ある種の実施態様では、サブクラスIgG-B又はIgG-Cのどちらかであり得る。しかしながらある種の実施態様では、抗体のサブタイプは、IgA、IgM、IgD又はIgEであり得る。

抗体のフラグメントは抗原結合機能を発揮することができる。そのような結合フラグメントの例には以下が含まれる：VL、VH、CL及びCH1抗体ドメインを含むFabフラグメント；単一抗体のVL及びVHドメインから成るFvフラグメント；F(ab')2フラグメント（2つの連結されたFabフラグメントを含む二価フラグメントである）；单鎖Fv分子（scFv）（ここではVHドメイン及びVLドメインは、前記2つのドメインが連合して抗原結合部位を形成することを可能にするペプチドリンカーによって連結される）；又は二重特異的抗体。そのようなフラグメントは遺伝子融合によって構築された多価フラグメント又は多重特異的フラグメントであり得る。

【0045】

本発明で使用される抗体又はポリペプチドのフラグメント、例えば、イヌCD20結合エピトープを規定するポリペプチドのフラグメント、又はCD20と、特に配列番号：2によって規定されるエピトープでCD20と特異的に結合する抗体のフラグメントは、一般的には一続きのアミノ酸残基を意味し、前記は少なくとも5から7の連続するアミノ酸、しばしば少なくとも約7から9の連続するアミノ酸、典型的には少なくとも約9から13の連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも約20から30以上の連続するアミノ酸、もっとも好ましくは少なくとも約30から40以上の連続するアミノ酸である。同様に、ネコCD20結合エピトープを規定するポリペプチドのフラグメント、又はCD20と、特に配列番号：4によって規定されるエピトープでCD20と特異的に結合する抗体のフラグメントは、一般的には一続きのアミノ酸残基を意味し、前記は少なくとも5から7の連続するアミノ酸、しばしば少なくとも

10

20

30

40

50

約7から9の連続するアミノ酸、典型的には少なくとも約9から13の連続するアミノ酸、より好ましくは少なくとも約20から30以上の連続するアミノ酸、もっとも好ましくは少なくとも約30から40以上の連続するアミノ酸である。

【0046】

そのような抗体又はポリペプチド（又はCD20特異的抗体のフラグメント）の“誘導体”は、当該タンパク質のアミノ酸配列を変化させることによって（例えば該タンパク質をコードする核酸の操作又はタンパク質そのものの改変によって）改変した抗体又はポリペプチドを意味する。天然のアミノ酸配列のそのような誘導体は1つ以上のアミノ酸の挿入、付加、欠失及び／又は置換を含むが、一方で好ましくはCD20結合活性を有するペプチドを提供する。好ましくは、そのような誘導体は、25以下のアミノ酸、より好ましくは15以下の、さらに好ましくは10以下の、さらに好ましくは4以下のアミノ酸、もっとも好ましくは1又は2アミノ酸だけの挿入、付加、欠失及び／又は置換を含む。

特定の抗体に由来する抗体又は抗原結合フラグメントを指すために本明細書で用いられる“～に由来する”という用語は、抗体又は抗原結合フラグメントが当該特定の抗体のキメラバージョン又は改変（例えばイヌ化又はネコ化）バージョンであり得ることを意味すると理解される。典型的には、特定の抗体に由来する抗体又は抗原結合フラグメントは該特定の抗体のCDRを維持するが、異なる定常及び／又はフレームワーク領域を含むことができる。

ある種の実施態様では、抗体は“単離抗体”である。単離抗体であるということは、該抗体が（1）通常見出される少なくともいくつかのタンパク質を含まないか、（2）同じ供給源（例えば同じ種）に由来する他のタンパク質を含まないか、（3）種々の種に由来する細胞によって発現されるか、又は（4）天然には存在しないことを意味すると理解されるであろう。

【0047】

本明細書で用いられる“イヌ化”という用語は、イヌで使用するために、当該抗体が、例えば、イヌの対応する位置では異質である1つ以上のアミノ酸をイヌの対応する位置で見出されるアミノ酸で置換することによって改変されてあることを意味すると理解される。本明細書で用いられる“ネコ化”という用語は、ネコで使用するために、当該抗体が、例えば、ネコの対応する位置では異質である1つ以上のアミノ酸をネコの対応する位置で見出されるアミノ酸で置換することによって改変されてあることを意味すると理解される。本明細書で用いられる“ヒト化”という用語は、ヒトで使用するために、当該抗体が、例えば、ヒトの対応する位置では異質である1つ以上のアミノ酸をヒトの対応する位置で見出されるアミノ酸で置換することによって改変されてあることを意味すると理解される。

標的種で“異質”であるアミノ酸は、例えばドナー抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列を、例えば標的種の1つ以上の抗体のフレームワーク領域のアミノ酸配列と比較して、該標的種の抗体の対応する位置に存在しないドナーフレームワーク領域の1つ以上のアミノ酸残基を同定することによって認定できる。標的種はイヌ、ネコ又はヒトであり得る。

【0048】

第一の配列のある特定のアミノ酸残基と対応する第二の配列の位置に存在するアミノ酸残基を指すために本明細書で用いられる“対応する位置”という用語は、2つの配列をアライメントしてこれら2つの配列間で配列同一性を最大にしたとき、第一の配列中の位置と同じ位置である第二の配列中の位置を指すことが意図される。対応する位置のアミノ酸残基は同じKabatナンバリングを有する。

“特異的に結合する”という語句は、ある抗体と、タンパク質の不均質集団に存在する特定のタンパク質又は標的との結合を指す。したがって、特異的な免疫アッセイ条件下にあるとき、該抗体は該当するタンパク質（本事例ではイヌ又はネコCD20）と、特に配列番号：2又は4で規定されるエピトープと結合し、サンプルに存在する他のタンパク質と有意な量では結合しない。

10

20

30

40

50

本明細書で用いられる“対象動物”という用語は、哺乳動物（例えばイヌ、ネコ又はヒト）を指すことができる。典型的には、当該対象動物は上記に記載のB細胞媒介症状を罹患し得る。

本明細書で用いられる、“～のN-末端領域に”という語句は、第一のシステイン残基が、連続するアミノ酸配列のN-末端に直に存在し得るか、又はより典型的には、第一のシステイン残基は1つ以上のアミノ酸残基によって該連続アミノ酸配列のN-末端から離され得ることを意味すると理解される。同様に、本明細書で用いられる、“～のC-末端領域に”という語句は、第二のシステイン残基が、連続するアミノ酸配列のC-末端に直に存在し得るか、又はより典型的には、第二のシステイン残基は1つ以上のアミノ酸残基によって該連続アミノ酸配列のC-末端から離され得ることを意味すると理解される。

10

【0049】

超可変領域以外の可変領域はまたヒト抗体の可変領域に由来することが可能であり、及び／又はモノクローナル抗体（例えばCD20特異的抗体）に由来することもあり得る。そのような事例では、完全な可変領域はげっ歯類モノクローナル抗体に由来することができ、当該抗体はキメラ化されてあると称される。キメラ化抗体を作製する方法は当業界では公知である。

モノクローナル抗体及び他の抗体を取得すること、並びに組換えDNA技術における技術を利用して他の抗体又はキメラ分子（本来の抗体の特異性を維持する）を製造することは可能である。そのような技術は、ある抗体の免疫グロブリン可変領域又は相補性決定領域（CDR）をコードするDNAを、異なる免疫グロブリンの定常領域又は定常領域プラスフレームワーク領域に導入する工程を含むことができる。ハイブリドーマ又は抗体を産生する他の細胞を遺伝子変異導入又は他の改変（前記は生成される抗体の結合特異性を変化させることもあり又は変化させないこともある）に付すことができる。

20

【0050】

抗体の製造

本発明のCD20エピトープに対して親和性及び結合特異性を有する抗体を製造するある種の方法論を以下に記載する。

本発明の抗体又は抗体フラグメント及び本発明で使用される前記抗体又は抗体フラグメントはまた、化学的合成によって完全に又は部分的に作出できる。これら抗体は、十分に確立された標準的な液相又は好ましくは固相ペプチド合成法にしたがって容易に調製できる（前記の概要は広く入手可能であり当業者にも周知されている）。さらにまた、前記抗体は、液相法によって又は固相、液相及び溶液化学の任意の組合せによって溶液中で調製できる。

30

本発明の使用に適切な抗体又は抗体フラグメントを製造する別の便利な方法は、それらをコードする核酸をある発現系で核酸を使用して発現させることである。

本発明にしたがって使用される核酸はDNA又はRNAを含むことができ、さらに完全に又は部分的に合成されたものであり得る。本発明で使用される核酸は、上記に規定した本発明の抗体又は抗体フラグメントをコードすることができる。当業者はそのような核酸に対して置換、欠失及び／又は付加を決定することができるであろう（当該核酸はなお本発明の抗体又は抗体フラグメントを提供するであろう）。

40

【0051】

当業者は、利用可能な核酸配列及びクローニングが与えられるならば、本明細書に含まれる情報及び参考文献並びに当分野で公知の技術を用いて、本発明で使用される抗体又は抗体フラグメントをコードする核酸配列を容易に調製できよう。これらの技術には、（i）例えばゲノム供給源に由来する当該核酸サンプルの増幅におけるポリメラーゼ連鎖反応の使用、（ii）化学合成、又は（iii）cDNA配列の調製が含まれる。抗体フラグメントをコードするDNAを作出して当業者に公知の任意の適切な方法で用いることができる。前記方法は、コードDNAを採取し、発現されるべき部分のどちらかの側で適切な制限酵素認識部位を同定し、前記部分を該DNAから切り出す工程を含む。続いて、標準的な市販の発現系で当該部分を作動できるように適切なプロモーターに連結することができる。別の組換えア

50

プローチは、適切なPCRプライマーによる該DNAの関連部分の増幅である。該配列の改変を例えれば位置指定変異導入を用いて実施して、改変ペプチドの発現に至らしめるか、又は核酸発現に利用される宿主細胞のコドン優先性を考慮することができる。

該核酸は、プラスミド、ベクター、転写又は発現カセット（前記は上記記載の少なくとも1つの核酸を含む）の形態で構築物として含まれ得る。該構築物は、上記の1つ以上の構築物を含む組換え宿主細胞内に含まれ得る。便利には、発現は、該核酸を含む組換え宿主細胞を適切な条件下で培養することにより達成できる。発現による生産に統いて、該抗体又は抗体フラグメントを任意の適切な技術を用いて単離及び／又は精製し、統いて適切に用いることができる。

【0052】

種々の多様な宿主細胞でポリペプチドをクローニング及び発現させる系は良く知られている。適切な宿主細胞には、細菌、哺乳動物細胞、酵母、昆虫及びバキュロウイルス系が含まれる。異種ポリペプチドの発現に当業界で利用可能な哺乳動物細胞株には、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓細胞、NS0マウスミエローマ細胞が含まれる。一般的で好ましい細菌宿主は大腸菌（E. coli）である。原核細胞（例えばE. coli）での抗体及び抗体フラグメントの発現は当業界で良く確立されている。培養真核細胞での発現もまた結合メンバーの製造の選択肢として当業者には利用可能である。

抗体の重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメインをコードする挿入物を含む組換え核酸を利用してよい。定義すれば、そのような核酸は、一本鎖コード核酸、前記コード核酸及び前記と相補性の核酸から成る二本鎖核酸、又はこれらの相補性（一本鎖）核酸そのものを含む。さらにまた、抗体の重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメインをコードする核酸は、酵素的に又は化学的に合成した、天然に存在する重鎖可変ドメイン及び／又は軽鎖可変ドメイン又は前記の変異体をコードする真正配列を有する核酸であり得る。

【0053】

組換えDNA技術を用いて本発明の抗体を改良することができる。したがって、キメラ抗体は、診断的又は治療的適用でその免疫原性を低下させるために構築できる。受容動物での免疫原性の緩和のために、本発明は、イヌ又はネコ定常ドメインと融合させた抗体の重鎖可変ドメインをコードする挿入物を含む組換え核酸を利用することができる。同様に、本発明は、イヌ定常ドメイン 又は と融合させた抗体の軽鎖可変ドメインをコードする挿入物を含む組換えDNAに関する。

さらにまた、抗体は、抗体遺伝子の変異導入によって生成することができ、抗体の人工レパートリーを作出できる。この技術によって抗体ライブラリーの調製が可能となる。抗体ライブラリーは市場からも入手できる。したがって、有利には本発明は、免疫グロブリン供給源として免疫グロブリン、好ましくはscFvの人工レパートリー、を利用し、本発明のエピトープに対して特異性を有する結合分子を同定する。

【0054】

抗体選別系

本発明のエピトープと結合することができ、したがって本発明の方法で用いることができる免疫グロブリンを、当業者に公知の任意の技術を用いて同定することができる。便利には、そのような免疫グロブリンは、免疫グロブリンポリペプチドの人工的レパートリーを含むライブラリーから単離することができる。“レパートリー”とは、結合特異性の多様性を提供するために、1つ以上の鑄型分子を核酸レベルでランダム、セミランダム又は方向指定多様化に付すことによって作出される分子セットを指す。レパートリー作出方法は当業界では十分に明らかにされている。

【0055】

いずれのライブラリー選別系も本発明と一緒に用いることができる。大きなライブラリーから所望のメンバーを単離する選別プロトコルは、ファージディスプレイ技術によって代表されるように当業界で公知である。多様なペプチド配列が線状バクテリオファージの表面でディスプレイされるような系は、標的抗原と結合する特異的な抗体フラグメントの

10

20

30

40

50

in vitro選別及び増幅のための抗体フラグメント（及びそれらをコードするヌクレオチド配列）ライプラリーを作出するために有用であることが立証された。VH及びVL領域をコードするヌクレオチド配列は、前記領域を大腸菌のペリプラズム間隙に誘導するリーダーシグナルをコードする遺伝子フラグメントと連結され、結果として得られた抗体フラグメントは、典型的にはバクテリオファージのコートタンパク質（例えばpIII又はpVIII）との融合タンパク質として、該バクテリオファージの表面でディスプレイされる。或いは、抗体フラグメントは、ラムダファージキャプシド（ファージ本体）の外部にディスプレイされる。ファージを土台とするディスプレイ系の利点は、選別されたライプラリーメンバーは、それらが生物学的な系であるがゆえに、該選別ライプラリーメンバーを含むファージを細菌細胞で培養することによって簡単に増幅させることができることである。さらによく、該ポリペプチドライプラリーメンバーをコードするヌクレオチド配列はファージ又はファージミドベクター上に含まれるので、配列決定、発現及びその後の遺伝子操作は比較的回りくどくない。バクテリオファージ抗体ディスプレイライプラリー及びラムダファージ発現ライプラリーは当業界では周知である。

10

【0056】

ファージ又は他のクローニングライプラリーの使用に代わるものは、選別した標的（例えば本発明のCD20エピトープ）で免疫した動物のB細胞に由来する核酸（好ましくはRNA）の使用である。V領域及びC領域mRNAの単離は、抗体フラグメント（例えばFab又はFv）の細胞内発現を可能にする。簡単に記せば、RNAは、免疫動物のB細胞から（例えば免疫マウスの脾臓から又はラマの循環B細胞から）単離され、PCRプライマーを用いて該RNAプールから選択的にVH及びVLcDNAが増幅される。このようにして得られたVH及びVL配列を結合させてscFv抗体が作製される。PCRプライマー配列は公表されたVH及びVL配列を土台にすることができる。

20

【0057】

ペプチド模倣体

ペプチドアナローグ（例えばペプチド模倣体又はペプチドミメティクス）は、鑄型ペプチドの代表的な特性を有する非ペプチド化合物である。そのようなペプチドアナローグは、典型的にはコンピューター分子モデリングを用いて開発される。本発明のCD20結合エピトープに対して親和性及び結合特異性を有するペプチドと構造的に類似するペプチド模倣体を用いて、同様な診断効果、予防効果及び治療効果を媒介させることができる。

30

ペプチド模倣体は典型的には鑄型ペプチドと構造的に類似するが、1つ以上のペプチド結合が当業界で周知の方法によって代替結合に入れ替えられてある。さらによくまたプロテアーゼの攻撃から該ペプチドを保護するためにペプチドを天然の配列から改変することができる。

【0058】

配列相同性/同一性

本発明のジスルフィド形成エピトープは、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6に規定するように、2つのシステイン残基間にジスルフィド結合を有するアミノ酸配列を含む。

40

本明細書で用いられる“同一性”又は“配列同一性”という用語は、アラインメントした1つの配列の任意の個々のアミノ酸残基において、当該アラインメントした配列間で該アミノ酸残基が同一であることを意味する。本明細書で用いられる“類似性”又は“配列類似性”という用語は、アラインメントした1つの配列の任意の個々のアミノ酸残基において、該配列間で該アミノ酸残基が類似のタイプであることを示す。例えば、ロイシンはイソロイシン又はバリン残基に置換され得る。この置換は保存的置換と称することができる。好ましくは本発明のアミノ酸配列が、その中に含まれるアミノ酸残基のいずれかの保存的置換の方法によって改変されると、これらの変化は、非改変抗体と比較したとき、生じた抗体の結合特異性又は機能的活性に何らの影響も与えない。

【0059】

本発明の（天然の）ポリペプチド及びその機能的誘導体に関する配列同一性は、配列を

50

アラインメントし、必要ならばギャップを導入して最大のパーセンテージ相同性を達成した後、該配列同一性の部分として保存的置換を全く考慮しないとき、対応する本来のポリペプチド残基と同一である、候補配列のアミノ酸残基のパーセンテージと関係する。N-又はC-末端伸長も挿入も配列同一性又は相同性を減じるものと解されるべきではない。2つ以上のアミノ酸配列のアラインメントを実施し、それらの配列同一性又は相同性を決定する方法及びコンピュータプログラムは当業者には周知である。2つのアミノ酸配列の同一性又は相同性のパーセンテージは、例えばBLAST (Altschul et al. 1990)、FASTA (Pearson & Lipman 1988) 又はスミス-ウォーターマンアルゴリズム (Smith & Waterman 1981) を用いて容易に計算できる。

【0060】

10

本明細書で用いられる“本質的に～から成る”又は“本質的に～から成って”という用語は、あるポリペプチドは記述されたもの以外に追加される特色又は成分を有し得るが、ただしそのような追加される特色又は成分が、当該ポリペプチドが規定するエピトープと結合する抗体又は抗体フラグメントの能力に実質的に影響しないことを条件とすることを意味する。すなわち、該ポリペプチドは、イヌ及び／又はネコCD20に対して特異的な結合物質が結合することができるエピトープを提示するそれらの能力に干渉しない追加の特色又は成分を有することができる。例えば、本質的に特定された配列から成るポリペプチドは、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つ以上の追加アミノ酸、欠失アミノ酸又は置換アミノ酸を該配列のいずれかの末端又は両端に含むことができるが、ただしこれらのアミノ酸は、イヌ又はネコCD20との結合における抗体又はフラグメントの役割に干渉せず、これを阻害、阻止又は妨害しないことを条件とする。同様に、本発明のポリペプチドは1つ以上の官能基で化学的に改変できるが、ただしそのような官能基が該ポリペプチドの機能に干渉しないことを条件とする。

20

“ポリペプチド”、“ペプチド”又は“タンパク質”という用語は、隣接残基のアルファアミノ基及びカルボキシル基間のペプチド結合によって互いに連結された一連の直鎖状アミノ酸残基を指すために本明細書では互換的に用いられる。該アミノ酸残基は通常天然の“L”異性体型である。しかしながら、所望される機能的特性が当該ポリペプチドによって維持されるかぎり、“D”異性体型の残基によって任意のL-アミノ酸残基が置換されてもよい。

【0061】

30

本発明は、エピトープに寄与すると決定されているペプチドのCD20リガンドとの結合における使用に及ぶ。したがって、本発明は、種々の長さを有する配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸のポリペプチドフラグメントに及び、ここで前記フラグメントは本発明の結合エピトープを規定し、前記は特異的な結合親和性でリガンドと結合するとき、CD20媒介シグナリングの阻害を生じる。

前記エピトープは、同定された結合エピトープに対し親和性及び結合特異性を有する抗体及び結合フラグメントの製造を補助するために、単離形で提供されてもよい。したがって、本発明は、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドの天然に存在するフラグメント及び変種とともに前記の誘導変種に及ぶ。

40

配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドの“変種”は、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドと実質的に相同なポリペプチドであるが、1つ以上の欠失、挿入又は置換のために配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドのアミノ酸配列とは異なるアミノ酸配列を有するポリペプチドを意味する。前記変種は、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドと好ましくは少なくとも80%同一、もっとも好ましくは少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を有する。同一性パーセンテージは、例えば、Devereuxら (Nucl. Acid Res. 12:387, 1984) が記載し、ウィスコンシン大学遺伝学コンピュータグループ (Uni

50

versity of Wisconsin Genetics Computer Group (UWGCG)) から入手できるGAPコンピュータプログラム (バージョン6.0) を用いて配列情報を比較することによって決定できる。

【0062】

本発明は、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドの変種、誘導体又はホモローグであるペプチドに及び、そのようなペプチドは、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドの配列と少なくとも約30%、又は40%、又は50%、又は60%、又は70%、又は75%、又は80%、又は85%、又は90%、又は95%の相同性を有することができる。したがって、本発明のペプチドのいずれかのペプチドのペプチドフラグメントは1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は5つ以上のアミノ酸変異を含むことができる。

さらにまた(又は付け加えるに)、該ペプチドは、1、2、3、4又は5アミノ酸が切り縮められてある配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドの切端バージョンから成り得る。あるアミノ酸は類似の物理化学的特徴を有する残基で入れ替えることができる。そのような保存的置換の例には、ある脂肪族残基の別の残基との置換(例えばIle、Val、Leu又はAlaの相互の置換)、ある極性残基の別の残基との置換(例えばLysとArg、GluとAsp、又はGlnとAsn間の置換)、又はある芳香族残基の別の残基との置換(例えばPhe、Trp又はTyrの相互の置換)が含まれる。他の保存的置換、例えば類似する疎水性の特徴を有する完全領域の置換を伴うものも周知である。

【0063】

同様に、本発明のポリヌクレオチドには、1つ以上の欠失、挿入又は置換のために本来のポリヌクレオチド配列とは異なるが、生物学的に活性なポリペプチドをコードする変種が含まれる。本発明のエピトープを規定するポリペプチド及びそのフラグメントの発現、単離及び精製は、任意の適切な技術によって達成できる。

ポリペプチドを製造する方法は、配列番号：2、配列番号：3、配列番号：4、配列番号：5又は配列番号：6のアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードする組換え発現ベクターで形質転換した宿主細胞を、ジスルフィド結合形態のポリペプチドの発現を促進する条件下で培養し、続いて該発現ポリペプチドを培養から回収する工程を含む。発現ポリペプチドを精製する方法は、利用される宿主細胞のタイプ、及び、該ポリペプチドが細胞内型、膜結合型又は宿主細胞から分泌される可溶型であるか否かというような要件にしたがって変動することは当業者には理解されよう。

【0064】

任意の適切な発現系を利用できる。ベクターは本発明のポリペプチド又はフラグメントをコードするDNAを含み、前記は、適切な転写又は翻訳調節ヌクレオチド配列(例えば哺乳動物、鳥類、微生物、ウイルス、細菌又は昆虫の遺伝子に由来するもの)と作動できるように連結される。ヌクレオチド配列は、当該調節配列が当該DNA配列と機能的に関係するとき作動できるように連結されている。したがって、あるプロモータヌクレオチド配列があるDNA配列の転写を制御するならば、該プロモータヌクレオチド配列は該DNA配列と作動できるように連結されている。一般的には、所望の宿主細胞(大腸菌)で複製する能力を付与する複製起点、及び形質転換体を同定する選別遺伝子が該発現ベクターに取り入れられる。

さらにまた、適切なシグナルペプチド(本来の又は異種のシグナルペプチド)をコードする配列も発現ベクターに取り入れることができる。シグナルペプチド(分泌リーダー)のためのDNA配列は、当該DNAが先ず初めに転写されて該mRNAが該シグナル配列を含む融合タンパク質に翻訳されるように、本発明の核酸配列とインフレームで融合させることができる。意図する宿主細胞で機能を有するシグナルペプチドは、該ポリペプチドの細胞外分泌を促進する。該シグナルペプチドは翻訳中に該ポリペプチドから切断されるが、細胞のポリペプチドの分泌を可能にする。

10

20

30

40

50

ポリペプチド発現に適切な宿主細胞には高等真核細胞及び酵母が含まれる。原核細胞系もまた適切である。哺乳動物細胞、特にCHO細胞は宿主細胞としての使用に特に好ましい。

【0065】

投与

本発明のモノクローナル抗体又は融合タンパク質は単独で投与できるが、好ましくは医薬組成物として投与されるであろう。前記医薬組成物は、意図される投与ルートにしたがって選択される、医薬的に許容できる適切な賦形剤、希釈剤又は担体を含むであろう。適切な医薬担体の例には水、グリセロール、エタノールなどが含まれる。

本発明の抗体は、治療の必要があるイヌ又はネコに適切な任意のルートで投与できる。本明細書に詳述するように、該組成物は注射又は輸液によって経口的に投与するのが好ましい。非経口投与のための好ましいルートの例には、静脈内、心臓内、動脈内、腹腔内、筋肉内、腔内、皮下、経粘膜、吸入又は経皮が含まれるが、ただしこれらに限定されない。投与ルートはさらに局所及び経腸、例えば粘膜（肺粘膜を含む）、経口、鼻及び直腸を含むことができる。

好ましい実施態様では、組成物は注射用組成物としてデリバーできる。静脈内、皮内又は皮下適用のためには、活性成分は、発熱因子を含まず適切なpH、等張性及び安定性を有する非経口的に許容できる水溶液の形態であろう。当業者は、例えば等張なベヒクル（例えば塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、乳酸リンゲル注射液）を用いて適切な溶液を容易に調製できる。保存料、安定化剤、緩衝剤、抗酸化剤及び／又は他の添加剤を必要に応じて加えることができる。組成物はまた、微小球、リポソーム、他の微粒子デリバリー系、又は血液を含むある種の組織に配置される持続放出組成物により投与できる。

【0066】

組成物は、好ましくは“治療的に有効な量”で個体に投与され、前記の量は、組成物が投与される対象動物に利益を示すために十分な量である。実際の投与用量、投与速度及びタイムコースは、治療される症状の性質及び重篤性とともに、治療されるイヌの年齢、性別及び体重並びに投与ルートに左右され、さらにそれらを十分に考慮して決定できる。さらにまた、十分な配慮が、当該組成物の特性、例えばその結合活性及びin vivo血中寿命、処方物中の融合タンパク質の濃度とともにデリバリールート、デリバリー部位及びデリバリー速度に払われるべきである。

投薬レジメンは、本発明の組成物の一回の投与、又は該組成物の複数回の投与用量を含むことができる。さらにまた、組成物は、本発明の融合タンパク質がその治療のために投与されている症状の治療に用いられる治療薬及び医薬と連続して又は前記と別々に投与できる。

ある対象動物に投与できる投薬レジメンの例は、1 μg/kg/日から20mg/kg/日、1 μg/kg/日から10mg/kg/日、10 μg/kg/日から1mg/kg/日を含む群から選択できる（ただしこれらに限定されない）。

投与される実際の量、投与速度及びタイムコースは、治療されるものの性質及び重篤性に左右されるであろう。治療指示（例えば投薬量に関する決定など）は、最終的には獣医師又は医師の責任及び判断内にあり、典型的には治療されるべき異常、イヌの症状、デリバリー部位、投与方法、及び医師が知り得た他の要件が考慮される。

【0067】

定義

特段に規定されなければ、本明細書で用いられる全ての技術用語及び学術用語は、本発明の分野の業者が一般的に理解する意味を有する。

本明細書を通して、文脈が特段に要求しないかぎり、「含む（comprise）」若しくは「含有する（include）」又はそれらの変型、例えば“comprises”若しくは「含み（comprising）」、“includes”若しくは「含有し（including）」は、記述された整数又は整数群を含むが、任意の他の整数又は整数群のいずれも排除しないことを言外に示唆することは理解されよう。

10

20

30

40

50

本明細書で用いられるように、例えば“a”、“an”及び“the”という用語は、文脈がそうでないことを明瞭に要求しないかぎり単数及び複数の該当語を含む。したがって、例えば、「活性因子 (an active agent)」又は「薬理的に活性な因子 (a pharmacologically active agent)」と言えば、ただ1つの活性因子だけでなく2つ以上の組み合わされた異なる活性因子を含み、一方、「担体 (a carrier)」と言えば、ただ1つの担体と同様に2つ以上の担体の混合物も含まれる。

【0068】

本発明の環状ポリペプチドフラグメントを表すために用いられる呼称は慣例にしたがい、アミノ基 (N) は各アミノ酸残基の左にカルボキシ基は右に提示される。

本明細書で用いられる“アミノ酸”という表現は、天然及び合成アミノ酸の両方、さらにD及びLアミノ酸の両方を含むことが意図される。合成アミノ酸はまた化学的に改変されたアミノ酸を包含し、塩及びアミノ酸誘導体（例えばアミド）を含む（ただしこれらに限定されない）。本発明のポリペプチド内に存在するアミノ酸は、メチル化、アミド化、アセチル化、又はそれらの生物学的活性に悪影響を及ぼすことなく循環半減期を変化させることができると他の化学基による置換によって改変できる。

“ペプチド”、“ポリペプチド”及び“タンパク質”という用語は、ペプチド結合又は改変ペプチド結合によって共有結合した少なくとも2つのアミノ酸のつながり（例えば同配体）を表すために本明細書では互換的に用いられる。ペプチド又はタンパク質を構成し得るアミノ酸の数に上限はない。さらにまた、ポリペプチドという用語はペプチドのフラグメント、アナローグ及び誘導体に及ぶが、前記フラグメント、アナローグ又は誘導体は、当該フラグメント、誘導体又はアナローグが由來したペプチドと同じ生物学的な機能活性を維持する。

さらにまた本明細書で用いられる“融合タンパク質”という用語はまた融合ポリペプチド、融合ペプチドなどを意味するために用いることができ、またイムノコンジュゲートを指すこともできる。“融合タンパク質”という用語は、2つ以上のサブユニット分子（典型的にはポリペプチド）が共有結合又は非共有結合で連結される分子を指す。

【0069】

本明細書で用いられるように、“治療的に有効な量”という用語は、B細胞媒介疾患又はその少なくとも1つの徴候の重篤性の軽減及び／又は前記の緩和のために必要な本発明の結合物質の量を意味する。

本明細書で用いられるように、“治療”及び関連用語、例えば“治療する”及び“治療されている”という用語は、B細胞媒介症状又はその少なくとも1つの徴候の進行、重篤性及び／又は期間の軽減を意味し、前記軽減又は緩和は、本発明のCD20結合エピトープに対して特異性を有する結合化合物の投与に起因する。したがって“治療”という用語は、対象動物に利益を与えることができる任意のレジメンを指すことができる。該治療は、既存の症状に対応できるか、または予防的（防御的治療）であり得る。治療には治癒効果、緩和効果又は予防効果が含まれ得る。本明細書の“治療的”及び“予防的”処置とは、もっとも広い意味で考えるべきである。“治療的”という用語は、必ずしも対象動物が全快まで治療されることを意味しない。同様に、“予防的”は、必ずしも対象動物が最終的に病氣にかかるなどを意味しない。

【0070】

本明細書の規定において、“イヌ科の動物 (canine)”は“イヌ (dog)”とも称される。イヌ科の動物は三名法のカニス・ルプス・ファミリアリス (*Canis lupus familiaris*) (カニス・ファミリアリス・ドメスチクス (*Canis familiaris domesticus*)) 又はカニス・ルプス・ディンゴ (*Canis lupus dingo*) を含む亜種に属するものとして分類できる。イヌ科の動物にはイヌの任意の種が含まれ、野生種及び愛玩品種の両方が含まれ、後者はまたコンパニオンアニマルとも称される。

本明細書の規定において、“ネコ科の動物 (feline)”は“ネコ (cat)”とも称される。ネコ科の動物は三名法のフェリス・シルベストリス・カツス (*Felis silvestris catus*) を含む亜種に属するものとして分類できる。ネコ科の動物にはネコの任意の種が含ま

10

20

30

40

50

れ、野生種及び愛玩品種の両方が含まれ、後者はまたコンパニオンアニマルとも称される。

以下の実施例を参照しながらこれから本発明を説明する。これらの実施例は例示のために提供されるものであり、本発明を限定することを意図したものではない。本発明の方法及び技術は、概ね当業界で周知であり、特段の指示がなければ、本明細書中で引用及び考査する多様な一般的及びより具体的な参考文献に記載されている通常的な方法にしたがって実施される。

【実施例 1】

【0071】

げっ歯類抗ヒトCD20抗体と配列番号：2の環状ポリペプチドとの結合

10

化学合成及びN-末端ビオチン成分結合による酸化によって該ペプチドエピトープを生成した。このペプチド並びにビオチニル化して酸化させた相同なヒトCD20ペプチド (IYNCEPANPSEKNSPSTQYC (配列番号：3)) 及びげっ歯類CD20ペプチド (IYDCEPSNSSEKNSPSTQYC (配列番号：6)) を、ストレプトアビジン被覆ELISAプレートに被覆してから洗浄し、さらにげっ歯類抗ヒトCD20抗体の結合について試験した。

一つの抗体、B1-H299 (Beckmann Coulter、市場で入手できるBiogenex B1モノクローナル抗体と区別するために以下ではH299と称する) は、イヌ (C20) 及びヒト (H20) CD20ペプチドと特異的に結合するが、げっ歯類 (M20) CD20ペプチドとは結合しないことが示された。H299と該エピトープとの結合の結果を図2Aに示す。イヌCD20ペプチドエピトープとの結合は、ヒトCD20ペプチドとの結合のほぼ1/6であった。

20

H299はイヌCD20と結合することが示されたが、Biogenex B1は結合しなかった。B1-H299 (H299) 及びBiogenex B1 (BG) モノクローナル抗体をイヌCD20ペプチド又は相同なヒトCD20ペプチド (IYNCEPANPSEKNSPSTQYC (配列番号：6)) とインキュベートし、抗マウスポリクローナルHRP結合二次抗体を用いて当該結合をELISAアッセイで検出した。結果を図2Bに示す。アイソタイプコントロール抗体との結合が示されている (Iso)。H299と比較したときのBiogenex B1モノクローナル抗体とペプチドとの結合の低下は親和性の欠如によるものか、又は単に供給されたBiogenex B1モノクローナル抗体調製物の濃度の不正確さの反映であるのかは不明である。

【実施例 2】

【0072】

H299モノクローナル抗体と無傷の細胞性CD20との結合実験

30

H299モノクローナル抗体とイヌCD20エピトープとの結合が無傷の細胞性CD20との結合に十分であったことを確認するために、イヌ及びヒトCD20をCHO細胞の表面で発現させ、H299との結合について蛍光活性化細胞分類装置 (FACS) によって試験した。

H22は、CHO細胞上で発現させた無傷のヒトCD20及びイヌCD20の両方と結合する。結果を図3A - Dに示す。図3Aは、H299 (6 µg/mL) とイヌCD20 CHO細胞との結合を示す。図3Bは、H299 (6 µg/mL) とヒトCD20 CHO細胞との結合を示す。図3Cは、抗マウスPE二次抗体 (Sigma P9287) 単独とイヌCD20 CHO細胞との結合を示す。図3Dは、抗マウスPE二次抗体 (Sigma P9287) 単独とヒトCD20 CHO細胞との結合を示す。

40

【実施例 3】

【0073】

B1y1及びH299抗ヒトCD20モノクローナル抗体とイヌCD20ペプチド配列番号：2との結合の比較

B1y1及びB299モノクローナル抗体とイヌCD20 (配列番号：2) の酸化ペプチドループとの結合を、ELISAによって及びトランスフェクトCHO細胞の表面上でFACSによって比較した。マイクロタイタープレートのウェルを50 µg/mLの酸化ペプチドで被覆した。H299又はB1y1 MAbを1.25 - 10 µg/mLで濃度を上昇させながら添加し、抗マウスIgGポリクローナル抗体セイヨウワサビペルオキシダーゼ (HRP) を用いて反応させた。

結果を図4に示す。これらの条件下で、H299モノクローナル抗体は、酸化イヌCD20ペプチドとB1y1モノクローナル抗体よりも高い親和性で結合した。

50

【実施例4】

【0074】

H299及びB1y1モノクローナル抗体と無傷の細胞性CD20との結合実験

II型抗ヒトCD20モノクローナル抗体H299及びB1y1とイヌCD20エピトープとの結合が無傷の細胞性CD20との結合のために十分であったことを確認するために、イヌCD20及びヒトCD20ペプチド（配列番号：2及び配列番号：3）をCHO細胞の表面で発現させ、蛍光強度によって及び蛍光活性化細胞分類装置（FACS）を用いてサンプル中の陽性細胞パーセンテージによって示されるH299又はB1y1の結合について試験した。

結果を図5A-Fに示す。II型抗ヒトCD20モノクローナル抗体H299及びB1y1は、CHO細胞上で発現させたヒト及びイヌCD20と同様な程度で結合する。図5A及び5Bは、平均蛍光強度（図5A）及び陽性細胞パーセンテージ（図5B）によって表示される、H299モノクローナル抗体（10 µg/mL）とイヌCD20及びヒトCD20 CHO細胞との結合を示す。図5C及び5Dは、平均蛍光強度（図5C）及び陽性細胞パーセンテージ（図5D）によって表示される、B1y1モノクローナル抗体（10 µg/mL）とイヌCD20及びヒトCD20 CHO細胞との結合を示す。図5E及び5Fは、H299モノクローナル抗体及びB1y1モノクローナル抗体とイヌCD20-CHO細胞との結合のそれぞれ柱状図を示す。アイソタイプコントロール（Iso）及び検出抗体無しで調製したサンプル（-D）が表示される。

【実施例5】

【0075】

II型モノクローナル抗体H299によるイヌCD20との結合はジスルフィド結合に決定的に依存することを示す

相同なビオチニル化ヒトCD20ペプチド（IYNCEPANPSEKNSPSTQYC（配列番号：3）を被覆したウェルと並べて、ビオチニル化酸化イヌペプチド配列番号：2をストレプトアビジン被覆マイクロタイタープレートのウェルの表面に結合させた。前記ペプチド被覆ウェルの半分をジチオスレイトール（DTT）で処理してジスルフィド結合を還元させてから洗浄した。続いて、H299モノクローナル抗体の結合を、継続的DTTの存在下又は非存在下で判定した。

ELISAプレート（遮断剤BSAとともにReacti-Bind NeutrAvidinで被覆（hermo Scientific、カタログ番号15123））を、PBS中のヒトCD20又はイヌCD20ペプチド（50 µg/mL）の100 µLとともに4℃で一晩インキュベートした。前記プレートをPBSで3回洗浄し、PBS中の15 mM DTTの100 µLとともに室温で30分インキュベートすることによって該ペプチドを還元した。PBS/DTT溶液を除去し、このプレートを100 µLのB1y1モノクローナル抗体（PBS又はDTT/PBS中で500ng/mL）とともに室温で1時間インキュベートした。マウスIgG2a Kアイソタイプコントロール（ebiosciences、カタログ番号16-4724-81）を500ng/mLでコントロール抗体として用いた。前記プレートをPBSで3回洗浄し、1:5000にPBSで希釈した100 µLの検出抗体（Sigma、ウサギ抗マウス免疫グロブリンポリクローナル抗体/HRP、カタログ番号P0161）とともにインキュベートした。PBSで3回洗浄後、100 µLの基質を添加し、反応を進行させた。停止溶液（100 µL、2MのH₂SO₄）を添加し、ウェルの吸収を450nmで読み取った。

結果を図6に示す。これらは、H299とイヌCD20エピトープとの結合はそれが酸化されているか否かに決定的に左右されることを示している。なぜならば、DTTによる前処理は該イヌペプチドとの結合を全て消失させたからである。相同なヒトCD20ペプチドとの結合は減少したが酸化によっては消失せず、これは、H299が以前（Teeling et al., 2006）に記載された（該システイン残基は各々アラニンと入れ替えられている）同じ領域の直鎖状ペプチドと結合できることと一致する。H299と直鎖状（還元）イヌペプチドループとの結合の欠如は、抗ヒトCD20モノクローナル抗体と仮説的イヌCD20細胞外ドメインの大きな直鎖状ペプチドとの結合をこれまで検出できなかつたことと（Beall et al.）一致する。このことはまた、H299とヒトCD20配列由来の直鎖状ペプチド（8mer）との結合を示したNiederrainerら（2011）の発見とも一致する。

【実施例6】

【0076】

10

20

30

40

50

GA101モノクローナル抗体のイヌ化型の例

本実施例では、本発明者は、フレームワーク領域のアミノ酸配列を置換することによってII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体GA101をイヌ化し、イヌへの投与時の該抗体の免疫原性を低下させた。CDRドメインのアミノ酸配列に対する変更は全く為されなかった。さらにまた、「イヌ化」重鎖及び軽鎖可変ドメインをイヌ由来定常ドメインに接続した。

イヌ化GA101軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、FR1からFR4のフレームワーク領域を示す配列番号：7-10を含む配列番号：15に示される（FR1：DIVMTQTPLSLSVTPEEPAS1SC（配列番号：7）、FR2：WYLQKPGQSPQLLIY（配列番号：8）、FR3：GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC（配列番号：9）、FR4：FGAGTKVEIK（配列番号：10）。

さらにまた、イヌ化GA101可変ドメインのアミノ酸配列は、FR1からFR4のフレームワーク領域を示す配列番号：11-14を含む配列番号：16に示される（FR1：EVQLVQSGGEVVKPGGS（配列番号：11）、FR2：WVRQAPGQGMWVG（配列番号：12）、FR3：RVTITRDNSK（配列番号：13）、FR4：WGQGTLVTVSS（配列番号：14）。

図7は、完全なイヌ化GA101 VKカッパ可変軽鎖アミノ配列（配列番号：15）（ここでCDR領域残基は太字で示される）及び完全なイヌ化GA101 VH可変重鎖（配列番号：16）（ここでCDR領域残基は太字で示される）を示す。さらにまた、表1-8は、GA101モノクローナル抗体軽鎖及び重鎖可変ドメインのフレームワーク領域をイヌ化するプロセスで用いられたアミノ酸残基置換を示す。

【0077】

表1：軽鎖可変ドメインFR1残基

軽鎖FR1の位置	Kabat軽鎖ナンバリングによる位置	イヌVK	GA101	イヌ化GA101
1	1	D	D	D
2	2	I	I	I
3	3	V	V	V
4	4	M	M	M
5	5	MTI	T	T
6	6	Q	Q	Q
7	7	TS	T	T
8	8	P	P	P
9	9	LAP	L	L
10	10	S	S	S
11	11	L	L	L
12	12	SA	P	S
13	13	VL	V	V
14	14	STR	T	T
15	15	PQR	P	P
16	16	ED	G	E
17	17	E	E	E
18	18	PTLKEA	P	P
19	19	AV	A	A
20	20	ST	S	S
21	21	I	I	I
22	22	STY	S	S
23	23	CY	C	C

【0078】

表2：軽鎖可変ドメインFR2残基

10

20

30

40

50

軽鎖FR2 の位置	Kabat軽鎖 ナンバリング による位置	イヌVK	GA101	イヌ化 GA101
1	35	W	W	W
2	36	FYIL	Y	Y
3	37	RQLI	L	L
4	38	QH	Q	Q
5	39	KR	K	K
6	40	PSA	P	P
7	41	GD	G	G
8	42	Q	Q	Q
9	43	SATP	S	S
10	44	P	P	P
11	45	QKER	Q	Q
12	46	RLPGAS	L	L
13	47	L	L	L
14	48	IL	I	I
15	49	YFNSEV	Y	Y

10

20

【 0 0 7 9 】

表3：軽鎖可変ドメインFR3残基

軽鎖FR3 の位置	Kabat軽鎖 ナンバリング による位置	イヌVK	GA101	イヌ化 GA101
1	57	GA	G	G
2	58	VA	V	V
3	59	PS	P	P
4	60	DS	D	D
5	61	R	R	R
6	62	FLV	F	F
7	63	SI	S	S
8	64	GA	G	G
9	65	S	S	S
10	66	G	G	G
11	67	S	S	S
12	68	G	G	G
13	69	TA	T	T
14	70	DE	D	D
15	71	F	F	F
16	72	TSR	T	T
17	73	LF	L	L
18	74	RTK	K	K
19	75	I	I	I
20	76	S	S	S
21	77	RGST	R	R
22	78	VL	V	V
23	79	E	E	E
24	80	AP	A	A
25	81	DEGIN	E	E
26	82	D	D	D
27	82A	AVTGS	V	V
28	82B	GA	G	G
29	82C	VIL	V	V
30	83	Y	Y	Y
31	84	Y	Y	Y
32	85	C	C	C

10

20

30

【 0 0 8 0 】

表4：軽鎖可変ドメインFR4残基

40

軽鎖FR4 の位置	Kabat軽鎖 ナンバリング による位置	イヌVK	GA101	イヌ化 GA101
1	95	F	F	F
2	96	GS	G	G
3	97	AQPT	G	A
4	98	GE	G	G
5	99	TP	T	T
6	100	KQS	K	K
7	101	VLW	V	V
8	102	DER	E	E
9	103	LI	I	I
10	104	K	K	K

10

20

30

40

【 0 0 8 1 】

表5：重鎖可変ドメインFR1残基

重鎖FR1 の位置	Kabat重鎖 ナンバリング による位置	イヌVH	GA101	イヌ化 GA101
1	1	EDG	Q	E
2	2	VGLEIM	V	V
3	3	QHRAVEKLPS	Q	Q
4	4	LVP	L	L
5	5	VALEM	V	V
6	6	EQA	Q	Q
7	7	SFLT	S	S
8	8	G	G	G
9	9	GE	A	G
10	10	DAGNET	E	E
11	11	LQRVW	V	V
12	12	VAIM	K	V
13	13	KRNQ	K	K
14	14	PFT	P	P
15	15	GAET	G	G
16	16	GEA	S	G
17	17	STP	S	S
18	18	LR	V	L
19	19	RKTGV	K	K
20	20	LIV	V	V
21	21	SY	S	S
22	22	C	C	C
23	23	VLAIE	K	V
24	24	ATVGIS	A	A
25	25	SPGT	S	S
26	26	GDRT	G	G
27	27	FLIDSTV	Y	F

50

【 0 0 8 2 】

表6：重鎖可変ドメインFR2残基

重鎖FR2 の位置	Kabat重鎖 ナンバリング による位置	イヌVH	GA101	イヌ化 GA101
1	36	WC	W	W
2	37	VIAFL	V	V
3	38	R	R	R
4	39	QLH	Q	Q
5	40	ASTGPVD	A	A
6	41	PL	P	P
7	42	GERL	G	G
8	43	KREGAMQ	Q	Q
9	44	GERDTV	G	G
10	45	TPFM	L	M
11	46	QEHDLPR	E	E
12	47	WLCSYFM	W	W
13	48	VLIF	M	V
14	49	ATSGL	G	G

10

20

【 0 0 8 3 】

表7：重鎖可変ドメインFR3残基

重鎖FR3 の位置	Kabat重鎖 ナンバリング による位置	イヌVH	GA101	イヌ化 GA101
1	66	RQ	R	R
2	67	FVL	V	V
3	68	TAIS	T	T
4	69	IVLMT	I	I
5	70	SAFT	T	T
6	71	RK	A	R
7	72	DEN	D	D
8	73	NDTSIG	K	N
9	74	AGVSDPT	S	S
10	75	KRENQGM	T	K
11	76	NDSKHR	S	S
12	77	TMIAS	T	T
13	78	LVMAI	A	A
14	79	YFSHT	Y	Y
15	80	LI	M	L
16	81	QHEDRA	E	E
17	82	ML	L	L
18	82A	NDSTHKPR	S	S
19	82B	SGDRNT	S	S
20	82C	LV	L	L
21	83	RTGKSI	R	R
22	84	AVDTSGP	S	S
23	85	EDAV	E	E
24	86	D	D	D
25	87	TASM	T	T
26	88	AGV	A	A
27	89	VMILFTKQ	V	V
28	90	YH	Y	Y
29	91	YFH	Y	Y
30	92	C	C	C
31	93	AVTGMRSQL	A	A
32	94	KRSNGATPDQVEIM	R	R

10

20

30

【 0 0 8 4 】

表8：重鎖可変ドメインFR4残基

40

重鎖FR4 の位置	Kabat重鎖 ナンバリング による位置	イヌVH	GA101	イヌ化 GA101
1	103	WL	W	W
2	104	GAS	G	G
3	105	QPHRD	Q	Q
4	106	G	G	G
5	107	TASIN	T	T
6	108	LSQPR	L	L
7	109	VLIP	V	V
8	110	TFIASLPY	T	T
9	111	VA	V	V
10	112	SACPT	S	S
11	113	SLAP	S	S

【0085】

完全長のイヌ化GA-101重鎖及び軽鎖をコードするDNA（配列番号：17及び配列番号：18）をCHO細胞にトランスフェクトし、上清をイヌCD20環状ペプチド配列番号：2との結合についてELISAで試験した。用量応答は、他のII型抗ヒトCD20抗体及びその親のマウス抗体B1y-1と同様に、イヌ化GA101もまたイヌCD20と結合することを示している。図8は、完全なイヌ抗体として発現させたとき、GA101の該イヌ化可変ドメインは図1の環状CD20ペプチド（配列番号：2）と結合することを示す。このことは、上記B1y-1（及び外延すればヒト化変種GA101）に関するデータを確認するものであり、イヌCD20上の共通のエピトープと結合するII型抗ヒトCD20モノクローナル抗体のさらに別の例であることが確認される。したがって、イヌCD20上の構造的に拘束された共有エピトープをモノクローナル抗体のための新規な標的として使用することの有効性を立証する。

【実施例7】

【0086】

新規なII型モノクローナル抗体RA2及びRF2

環状ヒトCD20（配列番号：3）及びイヌCD20（配列番号：2）ペプチドの組合せを用い、ヒト及びイヌペプチドの両方と結合するモノクローナル抗体をスクリーニングした。先に図1の環状イヌCD20ペプチド（T細胞ヘルプの供給源としてアミノ末端でジフテリア類毒素と結合されてある）で免疫したマウスを通常のハイブリドーマスクリーニングに用いた。2つの抗体（RA2及びRF2）ハイブリドーマを選別し、前記との結合とともにげっ歯類CD20（配列番号：6）及びネコCD20（配列番号：4）ペプチドとの結合について試験した。結果を図9に示す。RA2及びRF2はイヌCD20と強く結合し、さらにRF2はヒトCD20ペプチドと強く結合したが、一方RA2は弱く結合する。予想に反して、RA2及びRF2はネコCD20と、さらにげっ歯類CD20ペプチドとも強く結合した。この新規な結合パターンは、II型抗ヒト抗体H299（前記もまた図9に示されている）のエピトープとオーバーラップするエピトープを示唆する。

RA2及びRF2の可変重鎖及び軽鎖をコードするmRNAをキアゲン（Qiagen）キットを用いて抽出し、マウス免疫グロブリン特異的オリゴヌクレオチドプライマー（Novagen）及びスープラスクリプト（Superscript）III第一鎖合成系キットを用いてRT-PCRによってcDNAを調製した。ノバゲン（Novagen）IgGカッパ特異的定常ドメインリバースプライマーを用いて前記PCR生成物の配列を決定した。前記誘導配列を図10に示す（a、b：muRA2のVH及びVL、c、d：muRF2のVH及びVL）。前記配列は関係性を示すが（図10e）、CDR領域にはいくつかの相違が存在する。

オリゴヌクレオチドによる遺伝子合成を用いて、RA2及びRF2可変重鎖及び軽鎖配列（配列番号：23-26）をIgG2a/カッパ抗体として再構成してpcDNA3.3ベクターでクローニング

し、CHO細胞で適切なペアとして同時発現させた。上清に発現された抗体をプロテインAクロマトグラフィーによって精製し、CD20ペプチドELISAによって結合を試験した（図11）。精製したマウスRA2及びRF2の両組換え型が環状イヌ及びネコCD20ペプチドと強く結合し、さらにマウス及びヒトCD20ペプチドとも強く結合した（RA2のヒトCD20ペプチドとの結合は、図9の対応するハイブリドーマ上清に関するものよりも顕著であった）。

したがって、RA2及びRF2抗体と環状イヌ、ヒト、マウス及びネコCD20エピトープとの結合が確認されたことによって、H299及びB1y1によって具体化されるII型抗ヒトCD20抗体が共有するものよりもさらに拘束されたエピトープが提唱される。図12は、各々の種の対応するCD20ペプチドのアラインメントを示し、それらから共通のエピトープSEKNS（配列番号：67）を導くことができる。SEKNS（配列番号：67）はPSEKNSL（配列番号：1）のサブエピトープであり、これらの種の各々に共通の予想外に小さいエピトープがRA2及びRF2のための免疫及び選別によって導かれたことを示唆している。

イヌ及びネコの治療でRA2及びRF2を役立てるために、キメライヌ抗体、イヌ化及びネコ化抗体を（上記イヌ化GA101のように）設計し、組換えマウスRA2及びRF2の発現及び精製について上記に記載した技術を用いてCHO細胞から発現させ精製した。

【実施例8】

【0087】

キメライヌ並びにイヌ化RA2及びRF2抗体

RA2重鎖（アイソタイプA、B、C、D）及び軽鎖のマウス-イヌキメラ型は配列番号：27、28、29、30及び31によって表される。

RF2重鎖（アイソタイプA、B、C、D）及び軽鎖のマウス-イヌキメラ型は配列番号：32、33、34、35及び36によって表される。

イヌ化RA2可変重鎖（VH）及び軽鎖（VL）ドメインは配列番号：37及び38によって表される。完全なイヌ化RA2抗体重鎖（アイソタイプA、B、C、D）及び軽鎖は配列番号：40、41、42、43及び44によって表される。

イヌ化RF2可変重鎖（VH）及び軽鎖（VL）ドメインは配列番号：44及び45によって表される。完全なイヌ化RF2抗体重鎖（アイソタイプA、B、C、D）及び軽鎖は配列番号：46、47、48、49及び50によって表される。

図15はSDS-PAGEゲル実験を示し、ここでは、精製マウスRA2及びRF2、キメラRA2（HCBアイソタイプ配列番号：28及び31）及びRF2（HCBアイソタイプ配列番号：33及び36）、並びにイヌ化RA2（HCBアイソタイプ配列番号：40及び43；HCCアイソタイプ配列番号：41及び43）及びRF2抗体（HCBアイソタイプ配列番号：47及び50；HCCアイソタイプ配列番号：48及び50）が、還元及び非還元条件下で分離された。HCB及びHCCアイソタイプはそれらの補体動員能力のために選択された（前記能力は、例えばイヌの治療及びin vivoでのCD20発現リンパ腫細胞の除去で潜在的に有用な抗体の望ましい特色である）。H2L2テトラマー抗体は、上段の非還元ゲルにおいて約150kDaの分子量で示されている。重鎖及び軽鎖に対応するバンドは、下段の還元ゲルにおいてそれぞれ約50kDa及び25kDaで認めることができる。

図15に示す精製抗体を種々の種に由来する環状CD20ペプチドとの結合について上記のようにELISAによって試験した。図16aは、キメラ及びイヌ化RA2及びRF2抗体と環状イヌCD20ペプチドとの結合を示す。図16bは、親のマウス抗体の結合特異性とおおまかに類似する結合特異性を示す、種々の種に由来するペプチドとの結合性を示す（図11参照）。

【実施例9】

【0088】

キメラ並びにイヌ化RA2及びRF2抗CD20抗体は活性なFcドメインを有する

疾患の治療で（例えばイヌCD20+リンパ腫又はB細胞媒介炎症疾患を罹患するイヌで）イヌCD20発現細胞の除去を可能にするメカニズムは、抗CD20抗体の結合に続く免疫系のエフェクター武装集団の動員を含む。図17及び18は、組換えキメラ並びにイヌ化RA2及びRF2抗体の構築で用いられた選択イヌ重鎖HCB及びHCCが、補体動員（図17、C1q ELISA）及びイヌCD64との結合（図18）（CD64は、抗体依存細胞性細胞傷害を媒介する高親和性Fcレセプターである）において機能を有することを示している。図17は、補体C1qとモノクローナ

10

20

30

40

50

ル抗体（4つの異なる重鎖アイソタイプ（HCA、HCB、HCC、HCD）を用いて構築された）との結合を示す。パネルAは、例示としてイヌHCA及びHCDアイソタイプを有する抗イヌNGF抗体は補体を動員しないが、HCB及びHCCを有するものは確かに補体を動員することを示す。したがって、我々は、組換え抗CD20抗体（エフェクター機能が所望される）をHCB及びHCCアイソタイプとして構築した。パネルB及びCから分かるように、RF2のマウスIgG2a変種（muRF2）並びにキメラHCB（chiRA2-B、chiRF2-B）、イヌ化HCB（caRA2-B、caRF2-B）及びイヌ化HCC（caRA2-C、caRF2-C）アイソタイプ変種の各々はいずれも補体と結合する（ELISAで補体C1qとの陽性免疫反応性によって立証）。C1qとの結合は、これらの抗体が補体依存細胞傷害（CDC）を媒介するであろうということを示している。HCB及びHCCアイソタイプを土台とするキメラ及びイヌ化抗体の全ての型が本アッセイで陽性を示した。

10

図18は、可溶性組換えイヌ高親和性Fcレセプター（scaCD64）とキメラ並びにイヌ化RA2及びRF2との結合を示す。CD64との結合は、これら抗体が、抗体依存細胞性細胞傷害（ADC）を介して機能するであろうということを示している。HCB及びHCCアイソタイプを土台とするキメラ及びイヌ化抗体の全ての型が本アッセイで陽性を示した。

【実施例 10】

【0089】

ネコ化RA2及びRF2抗体

RA2及びRF2と環状ネコ化CD20ペプチドとの強力で予想外の結合並びにRA2及びRF2からイヌ化バージョンの設計及び構築の成功が得られたので、RA2及びRF2のネコ化及びキメラネコバージョンがネコB細胞媒介疾患の治療のために所望されよう。配列番号：51、52、53及び54はそれぞれRA2並びにRF2重鎖及び軽鎖のネコ化可変ドメインを表す。これらから上記のげっ歯類及びイヌバージョンを用いた例示の方法により、ネコ定常ドメインを用いてRA2及びRF2の完全なネコバージョンを構築し得る。

20

本明細書に引用した全ての文書類は参考により本明細書に含まれる。本発明の記載の実施態様に対する多様な改変及び変型が、本発明の範囲を逸脱することなく当業者には明白であろう。本発明を特定の好ましい実施態様との関連でこれまで説明してきたが、特許請求の範囲に記載した本発明はそのような個々の実施態様に限定されるべきではないことは理解されよう。実際のところ、当業者に明白である、本発明の実施に関して記載した態様の多様な改変が本発明に包含される。

【図1】

NH₂-IHNCDPANPSEKNLSIQYC

Figure 1

【図2B】

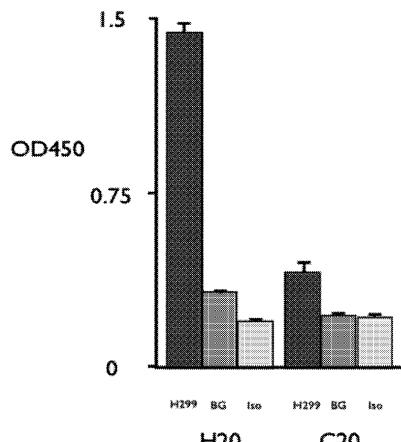


Figure 2B

【図2A】

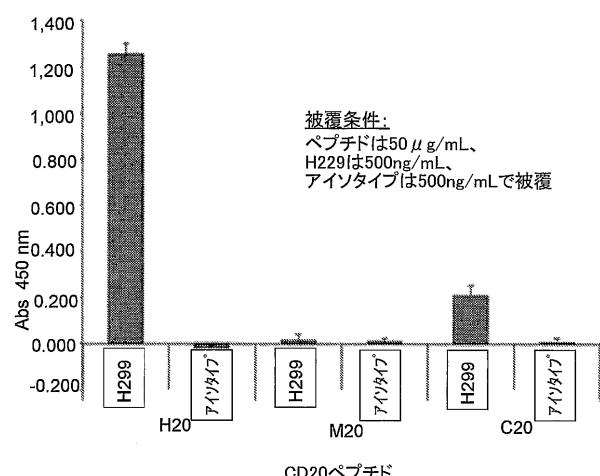


Figure 2A

被覆条件:
ペプチドは50 μ g/mL、
H2291は500ng/mL、
アイソタイプは500ng/mLで被覆

【図3A】

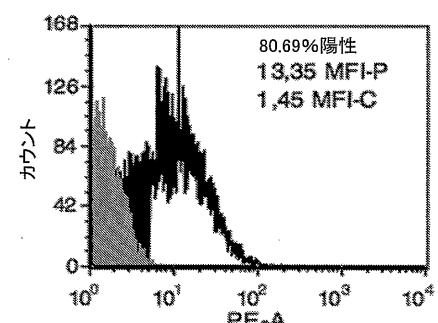


Figure 3A

【図3C】

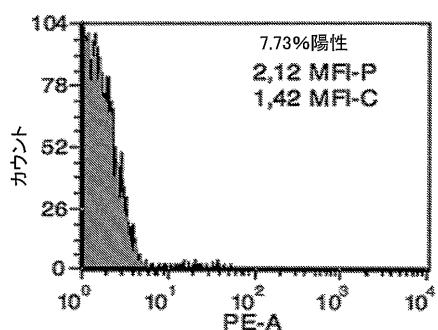


Figure 3C

【図3B】

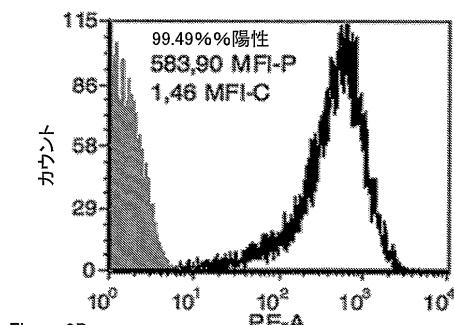


Figure 3B

【図3D】

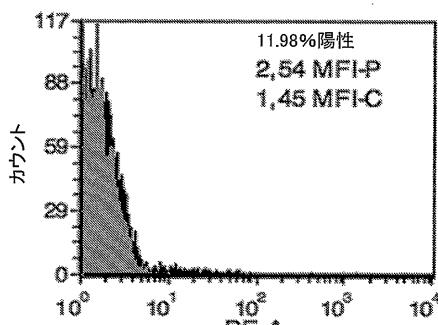


Figure 3D

【図4】

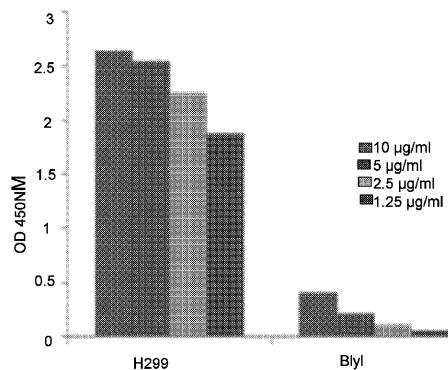


Figure 4

【図5B】

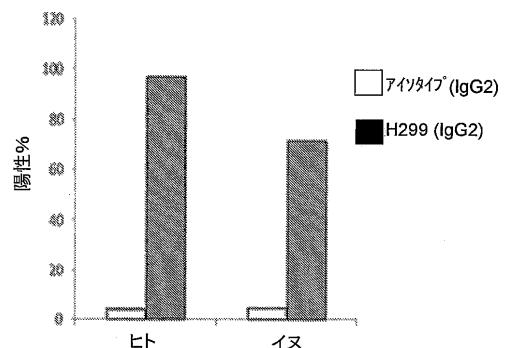


Figure 5B

【図5C】

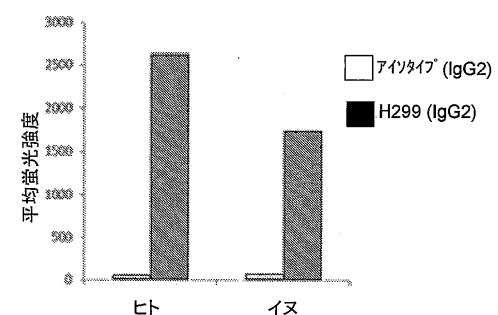


Figure 5C

【図5A】

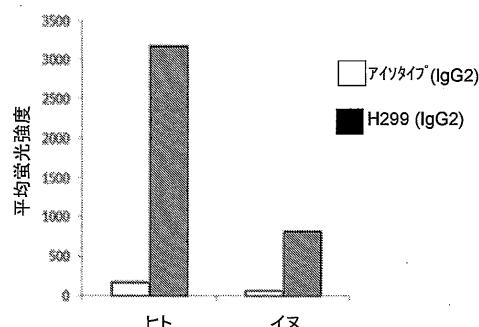


Figure 5A

【図5D】

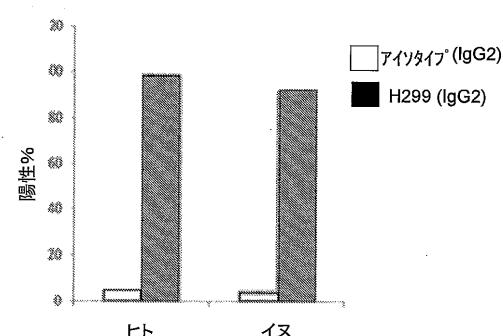


Figure 5D

【図5F】

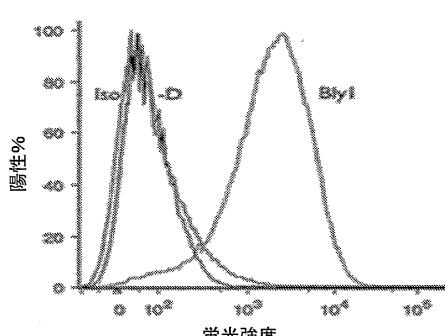


Figure 5F

【図5E】

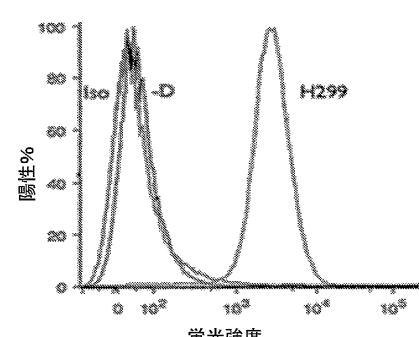


Figure 5E

【図7a】

DIVMTQTPLSLSVTPEEPASICRSSKSSLHSNNGITYL
YWYLLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSG
TDFTLKRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGAGTKVE
IK

Figure 7a

【図7b】

EVQLVQSGGEVVKGPGSLKVSCVASGFAFSYSWIN
WVRQAPGQGMWVGRIFPGDGDYNGKFKGRVT
ITRDNISKSTAYLELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWL
VYWGQGTLVTVSS

Figure 7b

【図8】

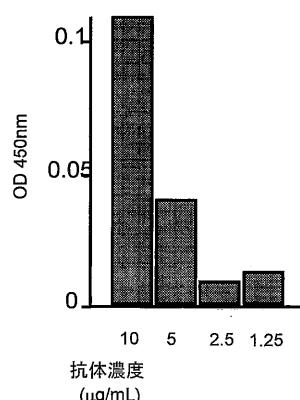


Figure 8

【図10c】

QVQLKQSGPGGLVPPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR
QSPGKGLEWLGV~~W~~SGSIDYNAAFISRLSISKDNSKS
QVFFKMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ
GTSVTVSS

Figure 10c

【図10d】

DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIHSNGNTY
VEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSG
TDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFCAGTKLE
LK

Figure 10d

【図10a】

QVQLKQSGPGGLVPPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR
QSPGKGLEWLGV~~W~~SGSIDYNAAFISRLSISKDNSKS
QVFFKMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ
GTSVTVSS

Figure 10a

【図10b】

DVLMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIHSNGNTYLE
WYLOKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT
LKISRVEAGDLGVYYCFQGLHVPLTFCAGTRLELK

Figure 10b

【図10e】

SEQ ID NO:19 muRA2 VH	1 QVQLKQSGPGGLVPPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGV W SGSIDYNAAFISRLSISKDNSKS QVFFKMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ GTSVTVSS	6C
SEQ ID NO:21 muRF2 VH	1 QVQLKQSGPGGLVPPSQSLITCTVSGFSLTNYGVHWVR QSPGKGLEWLGV W SGSIDYNAAFISRLSISKDNSKS QVFFKMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ GTSVTVSS	6C
SEQ ID NO:19 muRA2 VH	61 AATFISRLSISDNKNSQVYTFMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ AATFISRLSISDNKNSQVYTFMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ 61 AATFISRLSISDNKNSQVYTFMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ 61 AATFISRLSISDNKNSQVYTFMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ	12C
SEQ ID NO:21 muRF2 VH	61 AATFISRLSISDNKNSQVYTFMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ 61 AATFISRLSISDNKNSQVYTFMNSLQADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQ	12C
SEQ ID NO:20 muRA2 VL	1 DQWNTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIHSNGNTY DQWNTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIHSNGNTY	6C
SEQ ID NO:22 muRF2 VL	1 DQWNTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIHSNGNTY 1 DQWNTQPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIHSNGNTY	6C
SEQ ID NO:20 muRA2 VL	61 85VDFDRFSSSSGTTDPLK1IS1NVEA6HGTYYCQGSWV1F7F6978781LK 112 85VDFDRFSSSSGTTDPLK1IS1NVEA6HGTYYCQGSWV1F7F6978781LK 61 85VDFDRFSSSSGTTDPLK1IS1NVEA6HGTYYCQGSWV1F7F6978781LK 112	112
SEQ ID NO:22 muRF2 VL	61 85VDFDRFSSSSGTTDPLK1IS1NVEA6HGTYYCQGSWV1F7F6978781LK 61 85VDFDRFSSSSGTTDPLK1IS1NVEA6HGTYYCQGSWV1F7F6978781LK	112

Figure 10e

【図11】

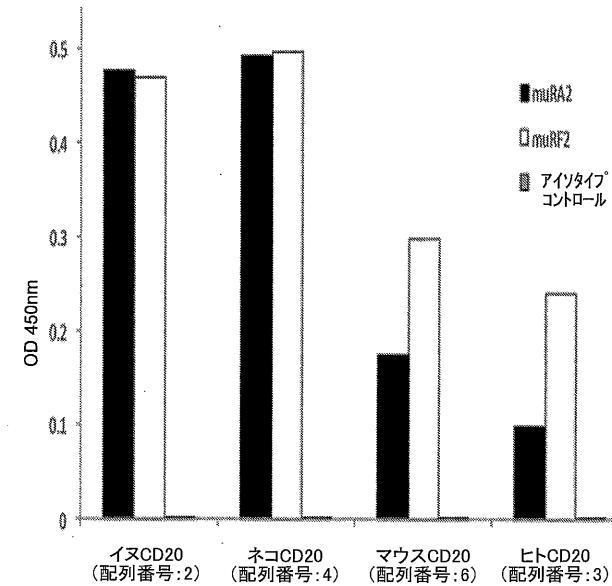


Figure 11

【図12】

イヌ (Q3C2E2) CDP-ANPSEKNSLSIQYC
 ネコ (Q5R1M8) CQPESKPSEKNSLSIKYC
 ヒト (P11836) CEP-ANPSEKNSPSTQYC
 マウス (P19437) CEP-SNSSEKNSPSTQYC
 *

Figure 12

【図13a】

EVQLVQSGGGLVKPTESLTISCVVSGFSLTNYGVHWRQS
 PGKGLEWLGVIWSGGTDYNAAFISRLSISKDNKSTVFLR
 MNSLRADDTAIYYCARGPRKFYYGMDYWGQQGTSVTSS

Figure 13a

【図13b】

DIVMTQTPLSLSVSQEEEASCRSSQSVHSNGNTYLEW
 YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGCTDFTLKI
 SRVEAGDAGVYYCFQQLHVPLTFAGTKLELK

Figure 13b

【図14a】

EVQLVQSGGGLVKPAESLTISCVISGFSLTSYGVHWRQ
 SPGKGLEWLGVIWSGGSDYNAAFISRLSISKDNKSTVFI
 RMNSLRADDTAIYYCARGPRKFYYFGMDYWGQQGTSVT
 SS

Figure 14a

【図16b】

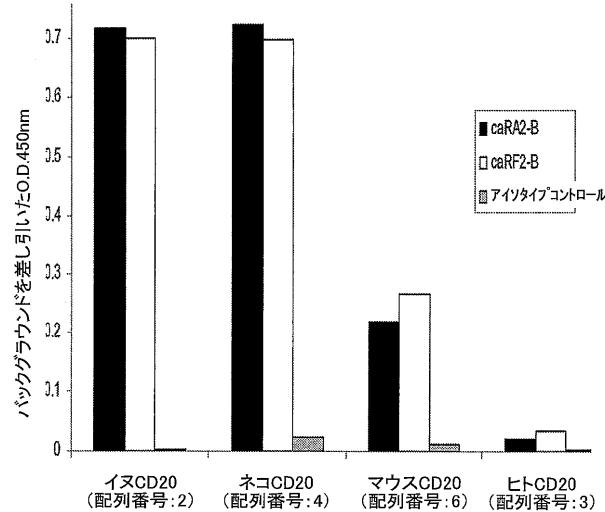


Figure 16b

【図14b】

DIVMTQTPLSLSVSQEEEASCRSSQSVHSNGNTYLEW
 YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGCTDFTLKI
 LRKISRVEAEDAGVYYCFQQLHVPLTFAGTKLELK

Figure 14b

【図16a】

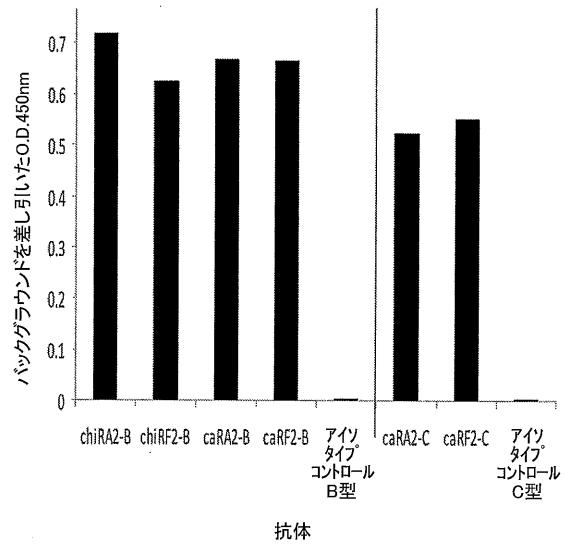


Figure 16a

【図17a】

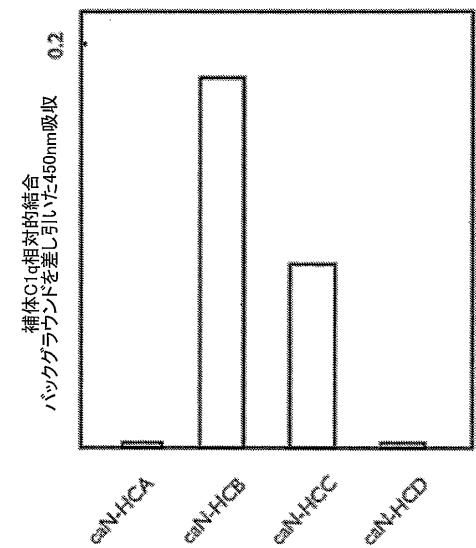


Figure 17a

【図 1 7 b】

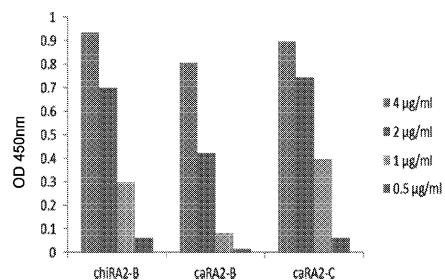


Figure 17b

【図 1 8】

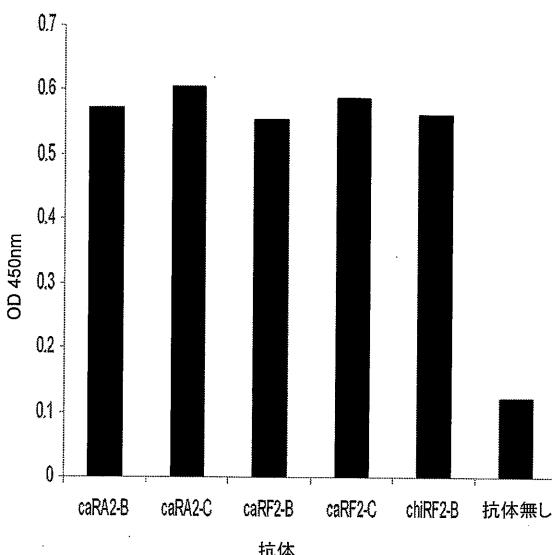


Figure 18

【図 1 7 c】

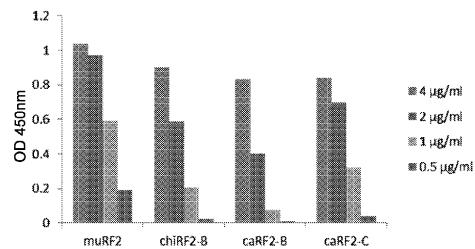


Figure 17c

【図6】

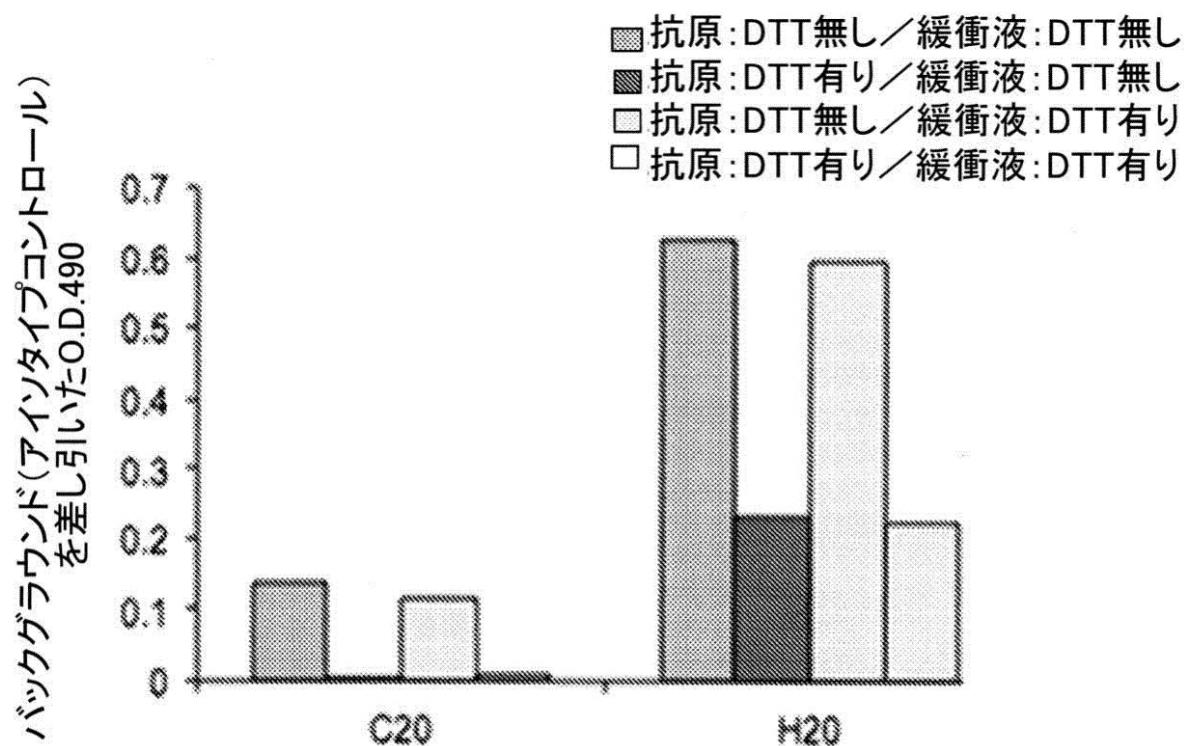


Figure 6

【図9】

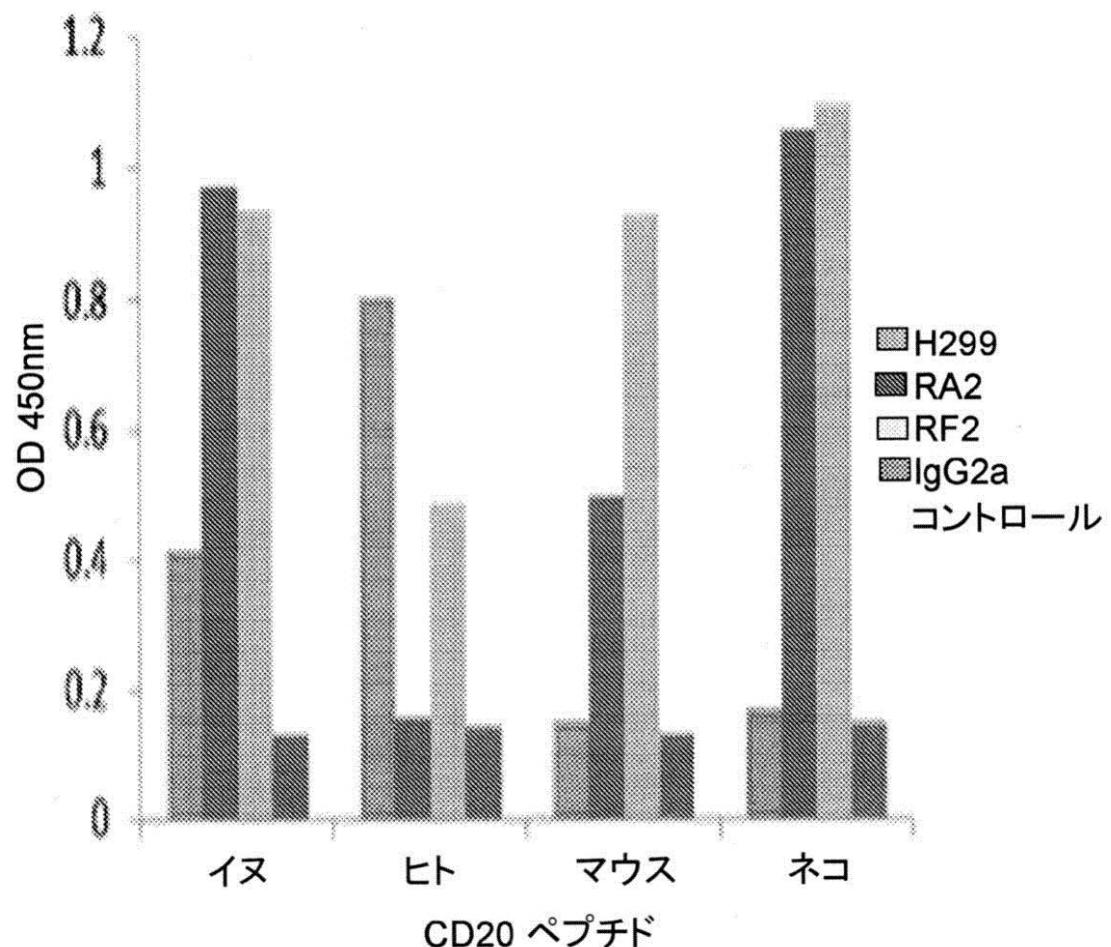


Figure 9

【図 15】

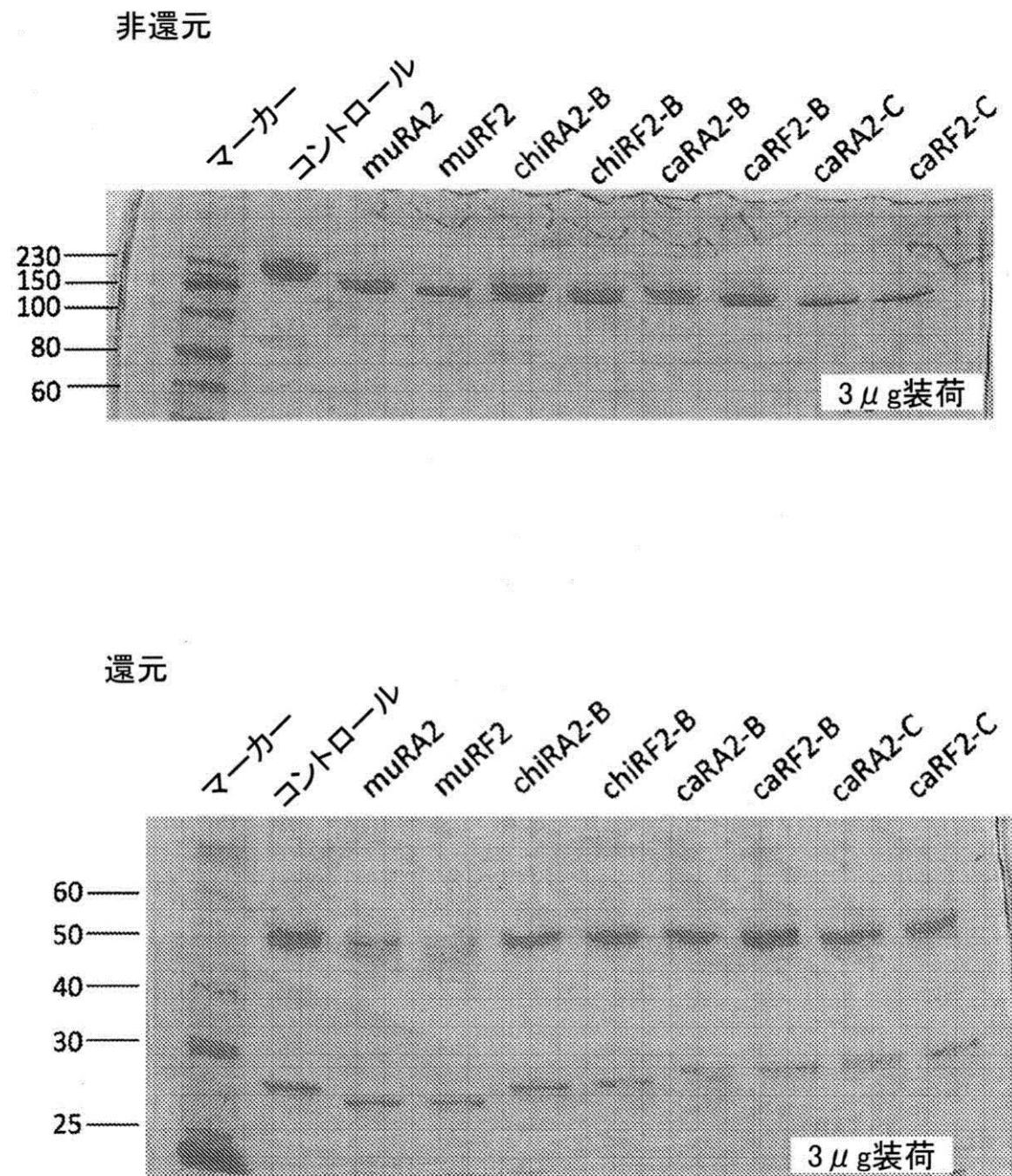


Figure 15

【配列表】

2015501146000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/GB2012/052532

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K14/705 C07K16/28 A61P37/00 ADD.
--

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K

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)
--

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data
--

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT
--

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2011/091483 A1 (BEALL MELISSA J [US]) 21 April 2011 (2011-04-21)	1-4,7, 31-34, 61-64, 142-145, 161
Y	sequence 35 page 1, paragraph 0003 page 13, paragraph 0174 - paragraph 0175	8-26, 37-56, 67-86, 91-101, 103-141, 148-151, 153,154, 157

<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.	<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
--	--

* Special categories of cited documents :

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

Date of mailing of the international search report
--

13 December 2012

21/12/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016
--

Authorized officer

Malamoussi, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2012/052532

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	TEELING JESSICA L ET AL: "The biological activity of human CD20 monoclonal antibodies is linked to unique epitopes on CD20", THE JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 177, no. 1, 1 July 2006 (2006-07-01), pages 362-371, XP002453762, ISSN: 0022-1767 page 364, left-hand column, paragraph 6 - right-hand column, paragraph 1 page 369; figure 7 page 370; table III -----	102,142, 144,146, 147,152
X	WO 2010/117448 A2 (PROVENANCE BIOPHARMACEUTICALS [US]; GILLIES STEPHEN D [US] PROVENANCE) 14 October 2010 (2010-10-14) page 46, paragraph 2 - page 47, paragraph 2 figure 17 -----	142-145, 152,155, 156
X	NIEDERFELLNER G J ET AL: "232 Unique molecular recognition of CD20 by the type II CD20 antibody GA101", EUROPEAN JOURNAL OF CANCER. SUPPLEMENT, PERGAMON, OXFORD, GB, vol. 8, no. 7, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 75-76, XP027497920, ISSN: 1359-6349, DOI: 10.1016/S1359-6349(10)71937-6 [retrieved on 2010-11-01] abstract -----	102,142, 144
X	US 2005/271662 A1 (BEALL MELISSA J [US]) 8 December 2005 (2005-12-08) sequence 53 page 12, paragraph 0107 figures 2,8, 11-12 page 13; examples 6, 8 ----- -/--	1-6, 27-36, 57-66, 87-90, 142-145, 158-162

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2012/052532

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>ERIKA JENSEN-JAROLIM AND ANGELIKA B RIEMER: "Small mimotopes are big in identifying B-cell epitopes", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 108, no. 6, 15 September 2006 (2006-09-15), pages 1794-1795, XP009144869, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/BLOOD-2006-07-034181 page 1794, middle column, line 6 - line 10</p> <p>-----</p> <p>G. NIEDERFELLNER ET AL: "Epitope characterization and crystal structure of GA101 provide insights into the molecular basis for type I/II distinction of CD20 antibodies", BLOOD, vol. 118, no. 2, 14 July 2011 (2011-07-14), pages 358-367, XP055047547, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2010-09-305847 page 360, left-hand column</p> <p>-----</p> <p>WO 2010/027488 A2 (VET THERAPEUTICS INC [US]; HANSEN GENEVIEVE [US]) 11 March 2010 (2010-03-11)</p> <p>page 29, paragraph 0124</p> <p>page 35 - page 38; example 2; sequence 67</p> <p>page 11, paragraph 0045</p> <p>page 48, paragraph 00183 - paragraph 00184</p> <p>-----</p> <p>WO 03/060080 A2 (IDEXX LAB INC [US]; KRAH EUGENE REGIS III [US]; GUO HONGLIANG [US]; AI) 24 July 2003 (2003-07-24)</p> <p>abstract; examples 1, 2, 5, 6</p> <p>-----</p>	1-162
A		1-162
Y		8-26, 37-56, 67-86, 91-101, 103-141, 148-151, 153,154, 157
Y		8-26, 37-56, 67-86, 91-101, 103-141, 148-151, 153,154, 157

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2012/052532

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
US 2011091483	A1	21-04-2011	EP	2496604 A1		12-09-2012
			US	2011091483 A1		21-04-2011
			WO	2011057188 A1		12-05-2011
WO 2010117448	A2	14-10-2010		NONE		
US 2005271662	A1	08-12-2005	EP	1751187 A2		14-02-2007
			EP	2374815 A1		12-10-2011
			US	2005271662 A1		08-12-2005
			US	2008045700 A1		21-02-2008
			WO	2006007202 A2		19-01-2006
WO 2010027488	A2	11-03-2010	AU	2009288700 A1		11-03-2010
			EP	2331579 A2		15-06-2011
			US	2010061988 A1		11-03-2010
			WO	2010027488 A2		11-03-2010
WO 03060080	A2	24-07-2003	AU	2002359851 A1		30-07-2003
			CA	2469833 A1		24-07-2003
			EP	1485126 A2		15-12-2004
			JP	2005514063 A		19-05-2005
			US	2004181039 A1		16-09-2004
			WO	03060080 A2		24-07-2003

フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 0 7 K 16/18	
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	H
A 6 1 P 37/00 (2006.01)	A 6 1 P 37/00	
A 6 1 P 29/00 (2006.01)	A 6 1 P 29/00	1 0 1
A 6 1 P 19/02 (2006.01)	A 6 1 P 19/02	
A 6 1 P 9/14 (2006.01)	A 6 1 P 9/14	
A 6 1 P 25/00 (2006.01)	A 6 1 P 25/00	
A 6 1 P 7/00 (2006.01)	A 6 1 P 7/00	
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 17/00	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 7/06 (2006.01)	A 6 1 P 7/06	
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	G 0 1 N 33/50	Z
G 0 1 N 33/15 (2006.01)	G 0 1 N 33/15	Z

(81) 指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,R,S,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC

(74) 代理人 100119013

弁理士 山崎 一夫

(74) 代理人 100123777

弁理士 市川 さつき

(74) 代理人 100111501

弁理士 滝澤 敏雄

(72) 発明者 ギアリング デイヴィッド

オーストラリア 3 0 0 0 ヴィクトリア メルボルン クイーン ストリート 3 1 レベル
8

F ターム(参考) 2G045 AA25 AA26 AA29 AA40 BA13 BB24 CA19 CA23 CB01 CB02
CB17 DA36 FA37 FB03 FB12 GC15
4B024 AA01 AA11 BA43 BA61 CA04 CA09 CA12 CA20 DA02 DA06
DA12 EA04 GA05 GA11 HA01 HA11
4B065 AA01X AA72X AA87X AA90X AA95X AA99X AB01 AB05 AC14 BA02
CA24 CA25 CA44 CA46
4C085 AA14 CC23 DD53 EE01
4H045 AA11 AA30 BA10 BA41 CA40 DA75 DA76 EA20 EA50 FA74
GA26