(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2016-188228
(P2016-188228A)
(43)公開日　平成28年11月4日(2016.11.4)

| (51)Int.Cl. | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|
| A61K 39/395 | (2006.01) | A61K | 39/395 | ZNAT | 4C084 |
| A61K 38/00 | (2006.01) | A61K | 37/02 | | 4C085 |
| A61K 38/21 | (2006.01) | A61K | 37/66 | G | 4C086 |
| A61K 45/00 | (2006.01) | A61K | 45/00 | | 4C206 |
| A61K 31/404 | (2006.01) | A61K | 31/404 | | 4H045 |

審査請求 有　請求項の数 44　ＯＬ　（全 104 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2016-111656 (P2016-111656)
(22)出願日　平成28年6月3日 (2016.6.3)
(62)分割の表示　特願2014-21875 (P2014-21875)の分割
原出願日　平成19年9月26日 (2007.9.26)
(31)優先権主張番号　PA200601232
(32)優先日　平成18年9月26日 (2006.9.26)
(33)優先権主張国　デンマーク (DK)
(31)優先権主張番号　60/847,329
(32)優先日　平成18年9月26日 (2006.9.26)
(33)優先権主張国　米国 (US)

（特許庁注：以下のものは登録商標）
１．ペンティアム

(71)出願人　507316398
ゲンマブ　エー／エス
デンマーク　コペンハーゲン　ケー　ブレドゲード　３４イー
(74)代理人　100102978
弁理士　清水　初志
(74)代理人　100119507
弁理士　刑部　俊
(74)代理人　100128048
弁理士　新見　浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林　智彦
(74)代理人　100142929
弁理士　井上　隆一

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ３８発現腫瘍の併用処置法

(57)【要約】
【課題】CD38に結合する抗体、コルチコステロイド、および非コルチコステロイド化学療法剤を含む併用療法を用いる、癌の処置のための新規の方法の提供。
【解決手段】i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、ii)少なくとも1つのグルココルチコイド、および、iii)サリドマイドもしくはサリドマイド類似体またはプロテアソーム阻害剤を含む、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤を組み合わせてなる、薬学的組成物。
【選択図】なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
個体に対する
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
の投与を含む、
それを必要とする個体でCD38を発現する腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害するための方法。
【請求項２】
個体に対する
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)任意で少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)任意で少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
の投与、
続いて自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を含む、
それを必要とする個体でCD38を発現する腫瘍細胞が関与する癌を処置するための方法。
【請求項３】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が細胞毒性薬剤および／または血管形成阻害剤を含む、請求項1または2記載の方法。
【請求項４】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がアルキル化薬剤を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、メルファラン、メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、およびカルボプラチンなどの、その他のプラチナ誘導体からなる群より選択される1つまたは複数の薬剤を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、サリドマイド(Thalomid(登録商標))またはサリドマイド類似体、例えば、CC-5013(レナリドマイド、Revlimid(商標))もしくはCC4047(Actimid(商標))などの、グルタミン酸誘導体を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項７】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、ボルテゾミブ(Velcade(登録商標))などの、プロテアソーム阻害剤を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項８】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、ビンクリスチンなどの、ビンカアルカロイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項９】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、ドキソルビシンなどの、アントラサイクリンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１０】
少なくとも1つのコルチコステロイドがグルココルチコイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１１】
少なくとも1つのコルチコステロイドがプレドニゾンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項１２】
少なくとも1つのコルチコステロイドがプレドニゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がメルファランを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１３】
少なくとも1つのコルチコステロイドがプレドニゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がサリドマイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１４】
少なくとも1つのコルチコステロイドがプレドニゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がメルファランおよびサリドマイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１５】
少なくとも1つのコルチコステロイドがデキサメタゾンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１６】
少なくとも1つのコルチコステロイドがデキサメタゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がサリドマイドおよび／またはレナリドマイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１７】
少なくとも1つのコルチコステロイドがデキサメタゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がビンクリスチンおよび／またはドキソルビシンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１８】
インターフェロン-アルファのさらなる投与を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項１９】
抗体がモノクローナル抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２０】
抗体がヒトモノクローナル抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２１】
抗体がCD38のアンタゴニストである、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２２】
抗体が、本明細書の実施例19で記載した方法によって決定される場合、ヒト単球または末梢血単核細胞による顕著なIL-6の放出を誘導しない抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２３】
抗体が、本明細書の実施例20で記載した方法によって決定される場合、ヒトT細胞または末梢血単核細胞による検出可能なIFN-γの放出を誘導しない抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２４】
抗体が、CD38発現細胞によって内在化される抗体であって、例えば本明細書の実施例12で記載した方法により37℃で5～15分以内にCHO-CD38細胞によって内在化される抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２５】
抗体が、ADCCを誘導する抗体であって、例えば本明細書の実施例5で記載した方法によって決定される場合、Daudi-luc細胞で15 ng/ml未満、例えば10 ng/ml未満の$EC_{50}$値を持ち、かつMM細胞で75 ng/ml未満、例えば50 ng/ml、30 ng/ml、または10 ng/ml未満の$EC_{50}$値を持つ抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項２６】

抗体が、補体の存在下でCDCを誘導する抗体であって、例えば本明細書の実施例6で記載した方法により、daudi-lucまたはCD38-CHO細胞で5 μg/ml未満、例えば1 μg/ml未満の$EC_{50}$値を持つ抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項２７】

抗体がcGDPRの合成を阻害する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項２８】

抗体がcADPRの合成を阻害する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項２９】

抗体が、本明細書の実施例20で記載した表面プラズモン共鳴によって決定される場合、$10^{-8}$ M未満、例えば$10^{-8}$ M～$10^{-11}$ Mの範囲内、例えば$7\times10^{-9}$ M～$10^{-10}$ Mの範囲内の親和性($K_D$)でヒトCD38に結合する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項３０】

抗体が、本明細書の実施例24で記載した分光光度法によって決定される場合、3 μg/mlの濃度で90分後に少なくとも25%、例えば少なくとも30%、cGDPRの合成を阻害する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項３１】

抗体が、Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571(2000)に記載されるHPLC法によって決定される場合、3 μg/mlの濃度で90分後に少なくとも25%、例えば少なくとも30%、cADPRの合成を阻害する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項３２】

抗体が、配列番号：10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体、または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項３３】

抗体が、配列番号：5に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号：10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項３４】

抗体がヒト軽鎖およびヒト重鎖可変領域を含む抗体であって、

軽鎖可変領域が、配列番号：3に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号：4に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号：5に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ重鎖可変領域が、配列番号：8に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号：9に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号：10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、

前記請求項のいずれか一項記載の方法。

【請求項３５】

抗体が、配列番号：2に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域、または配列番号：2に示された配列と少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である、請求項32～34のいずれか一項記載の方法。

【請求項３６】

抗体が、配列番号：7に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域、または配列番号：7に示された配列と少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号：7に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む抗体である、請求項32～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項３７】

抗体が、配列番号：20に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体、または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である、請求項1～31のいずれか一項記載の方法。

【請求項３８】

抗体が、配列番号：15に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号：20に示された

配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、請求項1～31のいずれか一項記載の方法。
【請求項３９】
抗体がヒト軽鎖およびヒト重鎖可変領域を含む抗体であって、
軽鎖可変領域が、配列番号：13に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号：14に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号：15に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ重鎖可変領域が、配列番号：18に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号：19に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号：20に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、
請求項1～31のいずれか一項記載の方法。
【請求項４０】
抗体が、配列番号：12に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域、または配列番号：12による配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である、請求項37～39のいずれか一項記載の方法。
【請求項４１】
抗体が、配列番号：17に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域、または配列番号：17に示された配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号：17に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む抗体である、請求項37～40のいずれか一項記載の方法。
【請求項４２】
抗体が、配列番号：30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体、または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である、請求項1～31のいずれか一項記載の方法。
【請求項４３】
抗体が、配列番号：25に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号：30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、請求項1～31のいずれか一項記載の方法。
【請求項４４】
抗体がヒト軽鎖およびヒト重鎖可変領域を含む抗体であって、
軽鎖可変領域が、配列番号：23に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号：24に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号：25に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ重鎖可変領域が、配列番号：28に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号：29に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号：30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、
請求項1～31のいずれか一項記載の方法。
【請求項４５】
抗体が、配列番号：22に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域、または配列番号：22による配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である、請求項42～44のいずれか一項記載の方法。
【請求項４６】
抗体が、配列番号：27に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域、または配列番号：27に示された配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号：27に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む抗体である、請求項42～45のいずれか一項記載の方法。
【請求項４７】
抗体が、全長のIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体、例えばIgG1抗体、好ましくはIgG1,κ抗体、またはIgM抗体、好ましくはIgM,κ抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４８】
抗体が、

(i)ヒトHv1263/3M28($V_H$I)生殖系列配列に由来する重鎖可変領域アミノ酸配列およびヒトL15(VκI)生殖系列配列に由来する軽鎖可変領域アミノ酸配列；または
(ii)ヒト$V_H$3-DP-47/V3-23($V_H$III)生殖系列配列に由来する重鎖可変領域アミノ酸配列およびヒトL6(VκI)生殖系列配列に由来する軽鎖可変領域アミノ酸配列
を含むヒトモノクローナル抗体である、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項４９】
抗体が抗体断片または単鎖抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５０】
抗体が、細胞毒性薬剤、放射性同位体、または薬物にコンジュゲートされている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５１】
抗体が、
前記請求項のいずれか一項で規定されたような抗体、および
ヒトエフェクター細胞に対する結合特異性
を含む二重特異性または多重特異性の分子である、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５２】
抗体が、
前記請求項のいずれか一項で規定されたような抗体、および
CD3、CD4、CD138、IL-15R、膜結合もしくは受容体結合型TNF-α、ヒトFc受容体、または膜結合もしくは受容体結合型IL-15に対する結合特異性
を含む二重特異性または多重特異性の分子である、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５３】
腫瘍細胞が多発性骨髄腫細胞または慢性リンパ球性白血病細胞である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５４】
腫瘍細胞が再発性または難治性の腫瘍細胞である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５５】
個体が65歳または65歳より上である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５６】
個体が65歳未満である、請求項1～54のいずれか一項記載の方法。
【請求項５７】
個体が、同じ癌に対する前抗癌処置を受けていない、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項５８】
個体が、同じ癌に対する前抗癌処置に応答していない、請求項1～56のいずれか一項記載の方法。
【請求項５９】
個体が、自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を事前に受けている、請求項1～56または58のいずれか一項記載の方法。
【請求項６０】
個体が、後で自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を受けるよう登録されている、請求項1または3～59のいずれか一項記載の方法。
【請求項６１】
抗体、少なくとも1つのコルチコステロイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が同時に投与される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６２】

抗体、少なくとも1つのコルチコステロイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が順次投与される、請求項1～60のいずれか一項記載の方法。
【請求項６３】
抗体、少なくとも1つのコルチコステロイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が全て個別に投与される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６４】
抗体、少なくとも1つのコルチコステロイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、1つまたは2つの薬学的組成物として同時投与される、請求項1～60のいずれか一項記載の方法。
【請求項６５】
抗体が、少なくとも1つのコルチコステロイドおよび少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤の投与の少なくとも1日前、例えば少なくとも2日前、例えば少なくとも1週間前に投与される、請求項62記載の方法。
【請求項６６】
抗体が、1 mg/kgまたはそれ以上の用量、例えば1～20 mg/kgの用量、例えば5～20 mg/kgの用量、例えば8 mg/kgの用量で投与される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６７】
抗体が、2～12週間、例えば3～10週間、例えば4～8週間、週に1回投与される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
【請求項６８】
前記請求項のいずれか一項または複数項記載の特色を含む、個体でCD38を発現する細胞を伴う癌を処置する方法。
【請求項６９】
癌が多発性骨髄腫または慢性リンパ球性白血病である、請求項68記載の方法。
【請求項７０】
少なくとも1つのコルチコステロイドおよび少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤の併用療法で投与するためか、または投与されるべき、癌の処置のための医薬の製造におけるCD38に結合する抗体の使用。
【請求項７１】
請求項1～67のいずれか一項または複数項記載の特色を含む、請求項70記載の使用。
【請求項７２】
個別、順次、および／または同時投与に好適である、
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
を含む、CD38を発現する腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害するための治療的組み合わせ。
【請求項７３】
組成物が請求項1～67のいずれか一項または複数項記載の特色を含む、請求項72記載の治療的組み合わせ。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、CD38に結合する抗体、コルチコステロイド、および非コルチコステロイド化学療法剤を含む併用療法を用いた癌の処置に関する。
【背景技術】
【０００２】
背景
多発性骨髄腫は、低い増殖指数および延長された寿命を持つ分泌性形質細胞の骨髄にお

ける潜在的蓄積を特徴とするB細胞悪性腫瘍である。本疾患は、最終的には骨および骨髄を攻撃し、骨格系の全体にわたる多発性の腫瘍および病変を結果的に生じさせる。

【０００３】

全ての癌のうちのおよそ1%、および全ての血液悪性腫瘍のうちの10%よりもわずかに多くを多発性骨髄腫(MM)に帰することができる。MMの発生率は高齢化人口で増加し、診断の時点での年齢中央値は約61歳である。

【０００４】

多発性骨髄腫のための現在利用可能な治療には、化学療法、幹細胞移植、Thalomid(登録商標)(サリドマイド)、Velcade(登録商標)(ボルテゾミブ)、Aredia(登録商標)(パミドロネート)、およびZometa(登録商標)(ゾレドロン酸)が含まれる。ビンクリスチン、BCNU、メルファラン、シクロホスファミド、アドリアマイシン、およびプレドニゾンまたはデキサメタゾンなどの化学療法剤の組み合わせを含む、現在の処置プロトコルは、わずか約5%の完全寛解率をもたらすに過ぎず、生存中央値は診断の時点からおよそ36～48か月である。高用量化学療法、それに続く自己骨髄または末梢血単核細胞移植を用いた最近の進歩により、完全寛解率および寛解持続期間が増加している。しかし、全体の生存はわずかに長くなっているだけであり、治癒の証拠は得られていない。最終的に、全てのMM患者は、インターフェロン-アルファ(IFN-α)単独かまたはステロイドと組み合わせた維持治療の下ですら、再発する。

【０００５】

患者が自己移植の候補またはありうる候補である場合、誘導療法はしばしば、アルキル化薬剤が採取(幹細胞回収)に干渉するという点で、非アルキル化化学療法を伴う。好ましいレジメンは、後の採取を可能にする、VADである(Wu KL, Clin Lymphoma Myeloma 2005; 6:96(非特許文献1))。移植前の誘導セッティングで検討される、別の処置方法(modality)には、デキサメタゾンと組み合わせたサリドマイドが含まれる(Cavo M Blood 2005;106:35(非特許文献2))。

【０００６】

MMのための利用可能な化学療法の処置レジメンの有効性は、低い細胞増殖率および多薬剤耐性の発生によって限定される。90%よりも多くのMM患者について、本疾患は化学耐性になる。結果として、形質細胞上の表面抗原を標的する養子免疫治療を目指した代替の処置レジメンが模索されている。

【０００７】

CD38はそのような悪性形質細胞上に発現される抗原の例であり、かつ多発性骨髄腫、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞急性リンパ球性白血病、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、原発性全身性アミロイドーシス、マントル細胞リンパ腫、前リンパ球性／骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、濾胞性リンパ腫、NK細胞白血病、および形質細胞白血病を含むが、これらに制限されない、種々の悪性血液疾患で発現される。CD38の発現は、前立腺の腺上皮、膵臓の島細胞、耳下腺を含む、腺の導管上皮、気管支上皮細胞、精巣および卵巣の細胞、ならびに直腸結腸腺癌の腫瘍上皮を含む、異なる起源の上皮／内皮細胞について記載されている。CD38発現が関与し得る疾患には、肺の気管支上皮癌腫、(乳房の管および小葉の上皮内層の悪性増殖から発生する)乳癌、b細胞から発生する、膵腫瘍(インスリノーマ)、腸の上皮から発生する腫瘍(例えば、腺癌および扁平上皮癌)が含まれるが、これらに制限されない。CNSでは、神経芽細胞がCD38を発現する。その他のそのような疾患には、前立腺の癌腫、精巣のセミノーマ、および卵巣癌が含まれる。

【０００８】

通常、CD38は、造血細胞によって、および固形組織で発現される。造血細胞に関しては、髄質胸腺細胞の大部分は$CD38^+$であり、静止および循環しているTおよびB細胞は$CD38^-$であり、かつ活性化細胞は$CD38^+$である。CD38は、およそ80%の静止しているNK細胞および単球上、ならびにリンパ節胚中心のリンパ芽球、形質B細胞、および幾つかの濾胞内細胞上にも発現される。CD38は樹状細胞によって発現されることもできる。かなりの割合の正

常な骨髄細胞、特に前駆体細胞がCD38を発現する。リンパ球様前駆体細胞に加えて、CD38は赤血球上および血小板上にも発現される。

【０００９】

固形組織については、CD38は、腸で上皮内細胞および固有層リンパ球によって、脳のプルキンエ細胞および神経原線維変化によって、前立腺の上皮細胞によって、膵臓のβ細胞によって、骨の破骨細胞によって、目の網膜細胞によって、ならびに平滑筋および横紋筋の筋鞘によって発現される。

【００１０】

CD38に帰せられる機能には、接着およびシグナル伝達事象における受容体仲介および(外)酵素活性の両方が含まれる。外酵素として、CD38は、サイクリックADP-リボース(cADPR)およびADPRの形成だけでなく、ニコチンアミドおよびニコチン酸-アデノシンジヌクレオチドリン酸(NAADP)の形成のための基質としてもNAD$^{+}$を用いる。cADPRおよびNAADPは、Ca$^{2+}$動員のためのセカンドメッセンジャーとして作用することが示されている。NAD+をcADPRに変換することによって、CD38は、細胞外NAD+濃度を調節し、それゆえにNAD誘導性細胞死(NCID)の調整による細胞生存を調節する。Ca$^{2+}$を介するシグナル伝達に加えて、CD38シグナル伝達は、TおよびB細胞上の抗原-受容体複合体またはその他の種類の受容体複合体、例えば、MHC分子とのクロストークを介して生じ、かつこのように幾つかの細胞応答だけでなく、IgG1のスイッチングおよび分泌にも関与する。

【００１１】

抗CD38抗体は、文献中に、例えば、Lande R, et al., Cell Immunol. 220(1), 30-8(2002)(非特許文献3), Ausiello CM, et al., Tissue Antigens. 56(6), 539-47(2000)(非特許文献4)、およびCotner T, et al., Int J Immunopharmacol. 3(3), 255-68(1981)(非特許文献5)に、ならびに国際公開公報第2005/103083号(Morphosys)(特許文献1)に記載されている。CD38は多くの機能を有しており、それはCD38に結合する分子によって活性化される場合もあるしまたは活性化されない場合もある。例えば、マウス抗CD38抗体IB4は、CD38に関してアゴニスト特性を有する。IB4は、Jurkat細胞でのCa$^{2+}$動員によって示されるようなT細胞活性化を誘導すること(Zubiaur M, et al., J Immunol. 159(1), 193-205(1997)(非特許文献6))、末梢血単核細胞(PBMC)の顕著な増殖を誘導すること、顕著なIL-6レベルの放出を誘導すること、および検出可能なIFN-γレベルの放出を誘導すること(Lande, Zubiaur Morra, Ansiello 前記(非特許文献3))が示されている。

【００１２】

抗癌薬剤の発見および開発における最近の進歩にもかかわらず、CD38発現腫瘍が関与する多くの形態の癌は依然として不良な予後を有するということが明らかである。したがって、そのような形態の癌を処置するための改良された方法に対する必要性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１３】

【特許文献１】国際公開公報第2005/103083号(Morphosys)

【非特許文献】

【００１４】

【非特許文献１】Wu KL, Clin Lymphoma Myeloma 2005;6:96

【非特許文献２】Cavo M Blood 2005;106:35

【非特許文献３】Lande R, et al., Cell Immunol. 220(1), 30-8(2002)

【非特許文献４】Ausiello CM, et al., Tissue Antigens. 56(6), 539-47(2000)

【非特許文献５】Cotner T, et al., Int J Immunopharmacol. 3(3), 255-68(1981)

【非特許文献６】Zubiaur M, et al., J Immunol. 159(1), 193-205(1997)

【発明の概要】

【００１５】

増加した有効性および／または長期にわたる生存を結果的にもたらすCD38発現腫瘍の処置のための改良された方法を提供することが本発明の目的である。

【００１６】
したがって、第一の主な局面において、本発明は、それを必要とする個体でCD38を発現する腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害するための方法であって、個体に対する
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
の投与を含む方法に関する。
【００１７】
3種類の医薬を同時にまたは任意の順序で順次投与してもよい。さらに、それらを個別的にまたは1つもしくは2つの薬学的組成物として投与してもよい。
【００１８】
三重治療は、幾つかの態様において、単一治療としてまたは二重治療で用いる場合よりも少ない量の医薬の投与を可能にする場合がある。そのようなより少ない量は、より少ない副作用を生じさせ、高齢または過敏症の患者などの、高用量で処置することができない患者のより有効な処置を可能にする場合がある。
【００１９】
ある態様において、本発明で用いるCD38に結合する非アゴニスト抗体は、本明細書で記載した抗体-005、-003、または-024である。これらの抗体は、特許出願PCT/DK2006/000166(国際公開公報第2006099875号)(Genmab)に以前に記載されている。
【００２０】
幾つかの態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、
- メルファランなどの、アルキル化薬剤、
および／または
- サリドマイドもしくはレナリドマイドなどの、グルタミン酸誘導体
および／または
- ボルテゾミブなどの、プロテアソーム阻害剤
を含む。
【００２１】
同様の局面において、本発明は、個体でCD38を発現する細胞を伴う癌を処置する方法であって、上記の方法の特色を含む方法に関する。
【００２２】
さらなる局面において、本発明は、それを必要とする個体でCD38を発現する腫瘍細胞を伴う癌を処置するための方法であって、個体に対する
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)任意で少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)任意で少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
の投与、それに続く自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を含む方法に関する。
【００２３】
したがって、本方法において、抗CD38抗体は、自己末梢幹細胞移植または骨髄移植に先立つ誘導療法で用いられる。任意の特定の理論に束縛されるわけではないが、それらが多くの望ましくない副作用を有さず、したがって移植前に患者を良好な状態に保つので、抗CD38抗体はそのような誘導療法に特に好適であると考えられる。
【００２４】
なおさらなる局面において、本発明は、個別、順次、および／または同時投与に好適である、
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
を含む、CD38を発現する腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害するための治療的組み合わせに関する。

[請求項1001]
個体に対する
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
の投与を含む、
それを必要とする個体でCD38を発現する腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害するための方法。
[請求項1002]
個体に対する
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)任意で少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)任意で少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
の投与、
続いて自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を含む、
それを必要とする個体でCD38を発現する腫瘍細胞が関与する癌を処置するための方法。
[請求項1003]
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が細胞毒性薬剤および/または血管形成阻害剤を含む、請求項1001または1002記載の方法。
[請求項1004]
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がアルキル化薬剤を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1005]
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、メルファラン、メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、およびカルボプラチンなどの、その他のプラチナ誘導体からなる群より選択される1つまたは複数の薬剤を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1006]
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、サリドマイド(Thalomid(登録商標))またはサリドマイド類似体、例えば、CC-5013(レナリドマイド、Revlimid(商標))もしくはCC4047(Actimid(商標))などの、グルタミン酸誘導体を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1007]
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、ボルテゾミブ(Velcade(登録商標))などの、プロテアソーム阻害剤を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1008]
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、ビンクリスチンなどの、ビンカアルカロイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1009]
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、ドキソルビシンなどの、アントラサイクリンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1010]
少なくとも1つのコルチコステロイドがグルココルチコイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1011]
少なくとも1つのコルチコステロイドがプレドニゾンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1012]

少なくとも1つのコルチコステロイドがプレドニゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がメルファランを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1013]
少なくとも1つのコルチコステロイドがプレドニゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がサリドマイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1014]
少なくとも1つのコルチコステロイドがプレドニゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がメルファランおよびサリドマイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1015]
少なくとも1つのコルチコステロイドがデキサメタゾンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1016]
少なくとも1つのコルチコステロイドがデキサメタゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がサリドマイドおよび/またはレナリドマイドを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1017]
少なくとも1つのコルチコステロイドがデキサメタゾンを含み、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がビンクリスチンおよび/またはドキソルビシンを含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1018]
インターフェロン-アルファのさらなる投与を含む、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1019]
抗体がモノクローナル抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1020]
抗体がヒトモノクローナル抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1021]
抗体がCD38のアンタゴニストである、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1022]
抗体が、本明細書の実施例19で記載した方法によって決定される場合、ヒト単球または末梢血単核細胞による顕著なIL-6の放出を誘導しない抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1023]
抗体が、本明細書の実施例20で記載した方法によって決定される場合、ヒトT細胞または末梢血単核細胞による検出可能なIFN-γの放出を誘導しない抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1024]
抗体が、CD38発現細胞によって内在化される抗体であって、例えば本明細書の実施例12で記載した方法により37℃で5～15分以内にCHO-CD38細胞によって内在化される抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1025]
抗体が、ADCCを誘導する抗体であって、例えば本明細書の実施例5で記載した方法によって決定される場合、Daudi-luc細胞で15 ng/ml未満、例えば10 ng/ml未満の$EC_{50}$値を持ち、かつMM細胞で75 ng/ml未満、例えば50 ng/ml、30 ng/ml、または10 ng/ml未満の$EC_{50}$値を持つ抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。

[請求項1026]
抗体が、補体の存在下でCDCを誘導する抗体であって、例えば本明細書の実施例6で記載し

た方法により、daudi-lucまたはCD38-CHO細胞で5 μg/ml未満、例えば1 μg/ml未満の$EC_{50}$値を持つ抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1027]
抗体がcGDPRの合成を阻害する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1028]
抗体がcADPRの合成を阻害する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1029]
抗体が、本明細書の実施例20で記載した表面プラズモン共鳴によって決定される場合、$10^{-8}$ M未満、例えば$10^{-8}$ M～$10^{-11}$ Mの範囲内、例えば$7\times10^{-9}$ M～$10^{-10}$ Mの範囲内の親和性($K_D$)でヒトCD38に結合する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1030]
抗体が、本明細書の実施例24で記載した分光光度法によって決定される場合、3 μg/mlの濃度で90分後に少なくとも25%、例えば少なくとも30%、cGDPRの合成を阻害する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1031]
抗体が、Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571(2000)に記載されるHPLC法によって決定される場合、3 μg/mlの濃度で90分後に少なくとも25%、例えば少なくとも30%、cADPRの合成を阻害する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1032]
抗体が、配列番号:10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体、または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1033]
抗体が、配列番号:5に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号:10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1034]
抗体がヒト軽鎖およびヒト重鎖可変領域を含む抗体であって、
軽鎖可変領域が、配列番号:3に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号:4に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号:5に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ重鎖可変領域が、配列番号:8に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号:9に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号:10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1035]
抗体が、配列番号:2に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域、または配列番号:2に示された配列と少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である、請求項1032～1034のいずれか一項記載の方法。
[請求項1036]
抗体が、配列番号:7に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域、または配列番号:7に示された配列と少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号:7に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む抗体である、請求項1032～1035のいずれか一項記載の方法。
[請求項1037]
抗体が、配列番号:20に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体、または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である、請求項1001～1031のいずれか一項記載の方法。
[請求項1038]
抗体が、配列番号:15に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号:20に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、請求項1001～1031のいずれか一項記載の方法。
[請求項1039]

抗体がヒト軽鎖およびヒト重鎖可変領域を含む抗体であって、
軽鎖可変領域が、配列番号:13に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号:14に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号:15に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ
重鎖可変領域が、配列番号:18に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号:19に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号:20に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、
請求項1001～1031のいずれか一項記載の方法。
[請求項1040]
抗体が、配列番号:12に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域、または配列番号:12による配列と少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である、請求項1037～1039のいずれか一項記載の方法。
[請求項1041]
抗体が、配列番号:17に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域、または配列番号:17に示された配列と少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号:17に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む抗体である、請求項1037～1040のいずれか一項記載の方法。
[請求項1042]
抗体が、配列番号:30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体、または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である、請求項1001～1031のいずれか一項記載の方法。
[請求項1043]
抗体が、配列番号:25に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号:30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、請求項1001～1031のいずれか一項記載の方法。
[請求項1044]
抗体がヒト軽鎖およびヒト重鎖可変領域を含む抗体であって、
軽鎖可変領域が、配列番号:23に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号:24に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号:25に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ
重鎖可変領域が、配列番号:28に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号:29に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号:30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である、
請求項1001～1031のいずれか一項記載の方法。
[請求項1045]
抗体が、配列番号:22に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域、または配列番号:22による配列と少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である、請求項1042～1044のいずれか一項記載の方法。
[請求項1046]
抗体が、配列番号:27に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域、または配列番号:27に示された配列と少なくとも約90%、例えば少なくとも約95%のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号:27に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む抗体である、請求項1042～1045のいずれか一項記載の方法。
[請求項1047]
抗体が、全長のIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体、例えばIgG1抗体、好ましくはIgG1,κ抗体、またはIgM抗体、好ましくはIgM,κ抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1048]
抗体が、
(i)ヒトHv1263/3M28($V_H$I)生殖系列配列に由来する重鎖可変領域アミノ酸配列およびヒトL15(VκI)生殖系列配列に由来する軽鎖可変領域アミノ酸配列;または

(ii)ヒト$V_H$3-DP-47/V3-23($V_H$III)生殖系列配列に由来する重鎖可変領域アミノ酸配列およびヒトL6(VκI)生殖系列配列に由来する軽鎖可変領域アミノ酸配列
を含むヒトモノクローナル抗体である、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1049]
抗体が抗体断片または単鎖抗体である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1050]
抗体が、細胞毒性薬剤、放射性同位体、または薬物にコンジュゲートされている、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1051]
抗体が、
前記請求項のいずれか一項で規定されたような抗体、および
ヒトエフェクター細胞に対する結合特異性
を含む二重特異性または多重特異性の分子である、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1052]
抗体が、
前記請求項のいずれか一項で規定されたような抗体、および
CD3、CD4、CD138、IL-15R、膜結合もしくは受容体結合型TNF-α、ヒトFc受容体、または膜結合もしくは受容体結合型IL-15に対する結合特異性
を含む二重特異性または多重特異性の分子である、
前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1053]
腫瘍細胞が多発性骨髄腫細胞または慢性リンパ球性白血病細胞である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1054]
腫瘍細胞が再発性または難治性の腫瘍細胞である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1055]
個体が65歳または65歳より上である、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1056]
個体が65歳未満である、請求項1001～1054のいずれか一項記載の方法。
[請求項1057]
個体が、同じ癌に対する前抗癌処置を受けていない、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1058]
個体が、同じ癌に対する前抗癌処置に応答していない、請求項1001～1056のいずれか一項記載の方法。
[請求項1059]
個体が、自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を事前に受けている、請求項1001～1056または1058のいずれか一項記載の方法。
[請求項1060]
個体が、後で自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を受けるよう登録されている、請求項1001または1003～1059のいずれか一項記載の方法。
[請求項1061]
抗体、少なくとも1つのコルチコステロイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が同時に投与される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1062]
抗体、少なくとも1つのコルチコステロイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が順次投与される、請求項1001～1060のいずれか一項記載の方法。

[請求項1063]
抗体、少なくとも1つのコルチコステロイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が全て個別に投与される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1064]
抗体、少なくとも1つのコルチコステロイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、1つまたは2つの薬学的組成物として同時投与される、請求項1001～1060のいずれか一項記載の方法。
[請求項1065]
抗体が、少なくとも1つのコルチコステロイドおよび少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤の投与の少なくとも1日前、例えば少なくとも2日前、例えば少なくとも1週間前に投与される、請求項1062記載の方法。
[請求項1066]
抗体が、1 mg/kgまたはそれ以上の用量、例えば1～20 mg/kgの用量、例えば5～20 mg/kgの用量、例えば8 mg/kgの用量で投与される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1067]
抗体が、2～12週間、例えば3～10週間、例えば4～8週間、週に1回投与される、前記請求項のいずれか一項記載の方法。
[請求項1068]
前記請求項のいずれか一項または複数項記載の特色を含む、個体でCD38を発現する細胞を伴う癌を処置する方法。
[請求項1069]
癌が多発性骨髄腫または慢性リンパ球性白血病である、請求項1068記載の方法。
[請求項1070]
少なくとも1つのコルチコステロイドおよび少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤の併用療法で投与するためか、または投与されるべき、癌の処置のための医薬の製造におけるCD38に結合する抗体の使用。
[請求項1071]
請求項1001～1067のいずれか一項または複数項記載の特色を含む、請求項1070記載の使用。
[請求項1072]
個別、順次、および/または同時投与に好適である、
i)CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii)少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
を含む、CD38を発現する腫瘍細胞の成長および/または増殖を阻害するための治療的組み合わせ。
[請求項1073]
組成物が請求項1001～1067のいずれか一項または複数項記載の特色を含む、請求項1072記載の治療的組み合わせ。
【図面の簡単な説明】
【００２５】
【図１】図１Aは、フローサイトメトリーで測定した場合の、CD38がトランスフェクトされたCHO(CHO-CD38)細胞への-003、-005、およびアイソタイプ対照抗体HuMab-KLHの結合を示す。実験設定は実施例4に記載されている。図1Bは、フローサイトメトリーで測定した場合の、CD38がトランスフェクトされたCHO(CHO-CD38)細胞への-024およびHuMab-KLHの結合を示す。実験設定は実施例4に記載されている。
【図２】図2Aは、フローサイトメトリーで測定した場合の、Daudi細胞への-003、-005、およびHuMab-KLHの結合を示す。実験設定は実施例4に記載されている。図2Bは、フローサイトメトリーで測定した場合の、Daudi細胞への-024およびHuMab-KLHの結合を示す。実験設定は実施例4に記載されている。

【図３】多発性骨髄腫細胞への-003、-005、-024、およびHuMab-KLHの結合を示す。実験設定は実施例4に記載されている。
【図４】図4Aは、リツキシマブおよびHuMab-KLHと比較して、-003および-005がADCCによってDaudi細胞の溶解を誘導する能力を示す。実験設定は実施例5に記載されている。図4Bは、HuMab-KLHと比較して、-024がADCCによってDaudi細胞の溶解を誘導する能力を示す。実験設定は実施例5に記載されている。
【図５】図5Aは、HuMab-KLHと比較して、-003、-005、および-024がADCCによって新鮮な多発性骨髄腫の腫瘍細胞の溶解を誘導する能力を示す。実験設定は実施例5に記載されている。図5Bは、HuMab-KLHと比較して、-003、-005、および-024がADCCによって新鮮な形質細胞白血病の腫瘍細胞の溶解を誘導する能力を示す。実験設定は実施例5に記載されている。
【図６】HuMab-KLHと比較して、-003および-005がADCCによってJK6L(多発性骨髄腫細胞株)の溶解を誘導する能力を示す。実験設定は実施例5に記載されている。
【図７】HuMab-KLHと比較して、-003および-005がADCCによってAMO-1(多発性骨髄腫細胞株)の溶解を誘導する能力を示す。実験設定は実施例5に記載されている。
【図８】HuMab-KLHと比較して、-003および-005によって誘導されるCDCを介したDaudi-luc細胞の溶解を示す。実験設定は実施例6に記載されている。
【図９】図9Aは、HuMab-KLHと比較して、-003および-005によって誘導されるCDCを介したCHO-CD38細胞の溶解を示す。実験設定は実施例6に記載されている。図9Bは、HuMab-KLHと比較して、-024によって誘導されるCDCを介したCHO-CD38細胞の溶解を示す。実験設定は実施例6に記載されている。
【図１０Ａ】-003、-005、およびHuMab-KLHの存在下におけるCDCを介した3％の難治性腫瘍細胞の溶解を示す。実験設定は実施例6に記載されている。
【図１０Ｂ】-003、-005、およびHuMab-KLHの存在下におけるCDCを介した9％の難治性腫瘍細胞の溶解を示す。実験設定は実施例6に記載されている。
【図１０Ｃ】-003、-005、およびHuMab-KLHの存在下におけるCDCを介した30～40％の腫瘍細胞の溶解を示す。実験設定は実施例6に記載されている。
【図１０Ｄ】-003、-005、およびHuMab-KLHの存在下におけるCDCを介した70％の腫瘍細胞の溶解を示す。実験設定は実施例6に記載されている。
【図１０Ｅ】-024およびHuMab-KLHの存在下におけるCDCを介した多発性骨髄腫細胞の溶解を示す。実験設定は実施例6に記載されている。
【図１１】-003および-005はCD38への結合を交差遮断しないということを示す。実験設定は実施例7に記載されている。
【図１２】図12Aは、-003によるマクロファージ、リンパ球、および形質B細胞の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図12Bは、-003による気管支上皮の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図12Cは、-003による筋細胞の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図12Dは、-003によるカニクイザルリンパ様組織の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。
【図１３】図13Aは、-005によるマクロファージ、リンパ球、および形質B細胞の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図13Bは、-005による気管支上皮の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図13Cは、-005による筋細胞の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図13Dは、-005によるカニクイザルリンパ様組織の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。
【図１４】図14Aは、CD31による肝内皮の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図14Bは、vWFによる肝内皮の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図14Cは、抗KLHによる肝内皮の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図14Dは、-003による肝内皮の免疫組織学的染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。図14Eは、-005による肝内皮の免疫組織学的

染色を示す。実験設定は実施例10に記載されている。
【図１５Ａ】フローサイトメトリーで測定した場合の、HuMab-KLHと比較した-003および-005のカニクイザルリンパ球に対する交差反応性を示す。実験設定は実施例11に記載されている。
【図１５Ｂ】フローサイトメトリーで測定した場合の、HuMab-KLHと比較した-003および-005のカニクイザル単球に対する交差反応性を示す。実験設定は実施例11に記載されている。
【図１５Ｃ】フローサイトメトリーで測定した場合の、HuMab-KLHと比較した-003および-005のアカゲザルPBMCに対する交差反応性を示す。実験設定は実施例11に記載されている。
【図１６】図16Aは、EtBr-クエンチングで測定した場合の-003の内在化を示す。実験設定は実施例12に記載されている。図16Bは、EtBr-クエンチングで測定した場合の-005の内在化を示す。実験設定は実施例12に記載されている。
【図１７Ａ】インビボSCIDルシフェラーゼイメージングで測定した場合の、予防セッティングにおける、抗CD20モノクローナル抗体(リツキシマブ)およびHuMab-KLHと比較しての、-003および-005によって引き起こされる腫瘍細胞の成長の阻害を示す。実験設定は実施例13に記載されている。
【図１７Ｂ】インビボSCIDルシフェラーゼイメージングで測定した場合の、治療セッティングIにおける、抗CD20モノクローナル抗体(リツキシマブ)およびHuMab-KLHと比較しての、-003および-005によって引き起こされる腫瘍細胞の成長の阻害を示す。実験設定は実施例13に記載されている。
【図１７Ｃ】インビボSCIDルシフェラーゼイメージングで測定した場合の、治療セッティングIIにおける、抗CD20モノクローナル抗体(リツキシマブ)およびHuMab-KLHと比較しての、-003および-005によって引き起こされる腫瘍細胞の成長の阻害を示す。実験設定は実施例13に記載されている。
【図１７Ｄ】インビボSCIDルシフェラーゼイメージングで測定した場合の、治療セッティングIIIにおける、HuMab-KLHと比較しての、-003および-024による腫瘍細胞成長の阻害を示す。実験設定は実施例13に記載されている。
【図１８】架橋を伴わないかまたは架橋を伴う、抗CD20モノクローナル抗体(リツキシマブ)およびHuMab-KLHと比較しての、-003および-005によるアポトーシスの誘導を示す。実験設定は実施例14に記載されている。
【図１９】抗KLH(HuMab-KLH)または-005による処置後、第14日の移植されたRA-SCIDマウス異種移植片におけるCD38陽性細胞についての組織学的スコアを示す。方法は実施例15に記載されている。
【図２０】抗KLHまたは-005による処置後、第14日の移植されたRA-SCIDマウス異種移植片におけるCD138陽性細胞についての組織学的スコアを示す。方法は実施例15に記載されている。
【図２１】移植前(A)、または抗KLH(B)もしくは-005(C)による処置後の異種移植片におけるB細胞のCD38染色を示す。方法は実施例15に記載されている。
【図２２】移植前(A)、または抗KLH(B)もしくは-005(C)による処置後の異種移植片におけるB細胞のCD138染色を示す。方法は実施例15に記載されている。
【図２３Ａ】ELISAで測定した、-003および-005の野生型および突然変異体のヒトCD38への結合を示す。23A：-003および-005のT237A突然変異体ヒトCD38への結合。23B：-003および-005のQ272R突然変異体ヒトCD38への結合。23C：-003および-005のS274F突然変異体ヒトCD38への結合。方法は実施例17に記載されている。
【図２３Ｂ】ELISAで測定した、-003および-005の野生型および突然変異体のヒトCD38への結合を示す。23A：-003および-005のT237A突然変異体ヒトCD38への結合。23B：-003および-005のQ272R突然変異体ヒトCD38への結合。23C：-003および-005のS274F突然変異体ヒトCD38への結合。方法は実施例17に記載されている。
【図２３Ｃ】ELISAで測定した、-003および-005の野生型および突然変異体のヒトCD38へ

の結合を示す。23A：-003および-005のT237A突然変異体ヒトCD38への結合。23B：-003および-005のQ272R突然変異体ヒトCD38への結合。23C：-003および-005のS274F突然変異体ヒトCD38への結合。方法は実施例17に記載されている。
【図２４】ヒトPBMCの増殖(A)、IL-6産生(B)、およびIFN-γ産生(C)に対する、HuMab-KLHと比較しての、-003および-005の効果を示す。方法はそれぞれ、実施例18、19、および20に記載されている。
【図２５Ａ】様々な濃度の-003(B)、-005(C)、-024(D)、または抗KLH(A)の存在下におけるcGDPリボースの酵素的産生を示す。方法は実施例23に記載されている。
【図２５Ｂ】様々な濃度の-003(B)、-005(C)、-024(D)、または抗KLH(A)の存在下におけるcGDPリボースの酵素的産生を示す。方法は実施例23に記載されている。
【図２５Ｃ】様々な濃度の-003(B)、-005(C)、-024(D)、または抗KLH(A)の存在下におけるcGDPリボースの酵素的産生を示す。方法は実施例23に記載されている。
【図２５Ｄ】様々な濃度の-003(B)、-005(C)、-024(D)、または抗KLH(A)の存在下におけるcGDPリボースの酵素的産生を示す。方法は実施例23に記載されている。
【図２６Ａ】CHO-CD38細胞のCDC(26A)、Daudi細胞のCDC(26B)、およびDaudi細胞のADCC(26C)における、-003と-005とMorphosys抗体TH-3079の間の比較を示す。方法は実施例24に記載されている。
【図２６Ｂ】CHO-CD38細胞のCDC(26A)、Daudi細胞のCDC(26B)、およびDaudi細胞のADCC(26C)における、-003と-005とMorphosys抗体TH-3079の間の比較を示す。方法は実施例24に記載されている。
【図２６Ｃ】CHO-CD38細胞のCDC(26A)、Daudi細胞のCDC(26B)、およびDaudi細胞のADCC(26C)における、-003と-005とMorphosys抗体TH-3079の間の比較を示す。方法は実施例24に記載されている。
【図２７】フローサイトメトリーで測定した、-005およびアイソタイプ対照抗体HuMab-KLHのEBVで形質転換されたチンパンジーB細胞への結合を示す。実験設定は実施例26に記載されている。
【図２８】単独で、ならびにその他の化合物(デキサメタゾン(Dex)およびボルテゾミブ(Bor))と組み合わせて、-005がインビトロで多発性骨髄腫細胞株UM6の細胞死を誘導する能力を示す。
【図２９－１】本発明の配列の配列表を示す。
【図２９－２】図29-2は、図29-1の続きを示す図である。
【図２９－３】図29-3は、図29-2の続きを示す図である。
【図２９－４】図29-4は、図29-3の続きを示す図である。
【図２９－５】図29-5は、図29-4の続きを示す図である。
【図２９－６】図29-6は、図29-5の続きを示す図である。
【図２９－７】図29-7は、図29-6の続きを示す図である。
【図２９－８】図29-8は、図29-7の続きを示す図である。
【図２９－９】図29-9は、図29-8の続きを示す図である。
【図２９－１０】図29-10は、図29-9の続きを示す図である。
【図２９－１１】図29-11は、図29-10の続きを示す図である。
【図２９－１２】図29-12は、図29-11の続きを示す図である。
【図２９－１３】図29-13は、図29-12の続きを示す図である。
【図２９－１４】図29-14は、図29-13の続きを示す図である。
【図２９－１５】図29-15は、図29-14の続きを示す図である。
【図２９－１６】図29-16は、図29-15の続きを示す図である。
【図２９－１７】図29-17は、図29-16の続きを示す図である。
【図２９－１８】図29-18は、図29-17の続きを示す図である。
【図２９－１９】図29-19は、図29-18の続きを示す図である。
【図２９－２０】図29-20は、図29-19の続きを示す図である。
【００２６】

配列表フリーテキスト
配列番号：1 抗体-003の$V_L$領域のヌクレオチド配列。
配列番号：2 抗体-003の$V_L$領域のアミノ酸配列。
配列番号：3 配列番号：2のaa 24～34を含む抗体-003の$V_L$ CDR1のアミノ酸配列。
配列番号：4 配列番号：2のaa 50～56を含む抗体-003の$V_L$ CDR2のアミノ酸配列。
配列番号：5 配列番号：2のaa 89～97を含む抗体-003の$V_L$ CDR3のアミノ酸配列。
配列番号：6 抗体-003の$V_H$領域のヌクレオチド配列。
配列番号：7 抗体-003の$V_H$領域のアミノ酸配列。
配列番号：8 配列番号：7のaa 31～35を含む抗体-003の$V_H$ CDR1のアミノ酸配列。
配列番号：9 配列番号：7のaa 50～66を含む抗体-003の$V_H$ CDR2のアミノ酸配列。
配列番号：10 配列番号：7のaa 99～109を含む抗体-003の$V_H$ CDR3のアミノ酸配列。
配列番号：11 抗体-005の$V_L$領域のヌクレオチド配列。
配列番号：12 抗体-005の$V_L$領域のアミノ酸配列。
配列番号：13 配列番号：12のaa 24～34を含む抗体-005の$V_L$ CDR1のアミノ酸配列。
配列番号：14 配列番号：12のaa 50～56を含む抗体-005の$V_L$ CDR2のアミノ酸配列。
配列番号：15 配列番号：12のaa 89～97を含む抗体-005の$V_L$ CDR3のアミノ酸配列。
配列番号：16 抗体-005の$V_H$領域のヌクレオチド配列。
配列番号：17 抗体-005の$V_H$領域のアミノ酸配列。
配列番号：18 配列番号：17のaa 31～35を含む抗体-005の$V_H$ CDR1のアミノ酸配列。
配列番号：19 配列番号：17のaa 50～66を含む抗体-005の$V_H$ CDR2のアミノ酸配列。
配列番号：20 配列番号：17のaa 99～111を含む抗体-005の$V_H$ CDR3のアミノ酸配列。
配列番号：21 抗体-024の$V_L$領域のヌクレオチド配列。
配列番号：22 抗体-024の$V_L$領域のアミノ酸配列。
配列番号：23 配列番号：22のaa 24～34を含む抗体-024の$V_L$ CDR1のアミノ酸配列。
配列番号：24 配列番号：22のaa 50～56を含む抗体-024の$V_L$ CDR2のアミノ酸配列。
配列番号：25 配列番号：22のaa 89～97を含む抗体-024の$V_L$ CDR3のアミノ酸配列。
配列番号：26 抗体-024の$V_H$領域のヌクレオチド配列。
配列番号：27 抗体-024の$V_H$領域のアミノ酸配列。
配列番号：28 配列番号：27のaa 31～35を含む抗体-024の$V_H$ CDR1のアミノ酸配列。
配列番号：29 配列番号：27のaa 50～66を含む抗体-024の$V_H$ CDR2のアミノ酸配列。
配列番号：30 配列番号：27のaa 99～111を含む抗体-024の$V_H$ CDR3のアミノ酸配列。
配列番号：31 ヒトCD38の配列。
配列番号：32 位置237のスレオニン残基がアラニン残基と置換されている、突然変異体ヒトCD38の配列。
配列番号：33 位置272のグルタミン残基がアルギニン残基と置換されている、突然変異体ヒトCD38の配列。
配列番号：34 位置274のセリン残基がフェニルアラニン残基と置換されている、突然変異体ヒトCD38の配列。
【発明を実施するための形態】
【００２７】
発明の詳細な説明
定義
本明細書で用いる場合の「CD38に結合する非アゴニスト抗体」または「抗CD38抗体」は、アイソタイプ対照抗体または培地のみによって誘導される増殖と比較した場合に、CD38への結合によって末梢血単核細胞の顕著な増殖を誘導しない抗体を指す(例えば、本明細書で下記の実施例18に記載した通りにアッセイされる)。ある態様において、本発明で用いる抗CD38抗体は、CD38の非アゴニストであるだけでなく、アンタゴニストでもある。
【００２８】
「CD38」および「CD38抗原」という用語は、本明細書で互換的に用いられており、かつ細胞によって天然に発現されるかまたはCD38遺伝子をトランスフェクトした細胞上に発現

される、ヒトCD38の任意の変異体、アイソフォーム、および種ホモログを含む。当技術分野において認識される、CD38の同義語には、ADPリボシルシクラーゼ1、cADPrヒドロラーゼ1、Cd38-rs1、サイクリックADP-リボースヒドロラーゼ1、I-19、NIM-R5抗原が含まれる。

【００２９】

「免疫グロブリン」という用語は、4つ全てがジスルフィド結合で相互接続された、1対の軽(L)低分子量鎖および1対の重(H)鎖という、2対のポリペプチド鎖からなる構造的に関連のある糖タンパク質のクラスを指す。免疫グロブリンの構造は十分に特徴付けされている。例えば、Fundamental Immunology第7章(Paul, W編, 第2版, Raven Press, N. Y.(1989))を参照されたい。簡潔には、各々の重鎖は、典型的には、重鎖可変領域(本明細書で$V_H$と略す)および重鎖定常領域から構成される。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメイン、$C_H1$、$C_H2$、および$C_H3$から構成される。各々の軽鎖は、典型的には、軽鎖可変領域(本明細書で$V_L$と略す)および軽鎖定常領域から構成される。軽鎖定常領域は、典型的には、1つのドメイン、$C_L$から構成される。$V_H$および$V_L$領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる、より保存された領域が散在する、相補性決定領域(CDR)とも呼ばれる、超可変性の領域(または構造的に規定されたループの配列および／もしくは形態が超可変であることができる超可変領域)にさらに細かく分けることができる。

【００３０】

各々の$V_H$および$V_L$は、典型的には、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順序で配置された、3つのCDRおよび4つのFRから構成される：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917(1987)も参照されたい)。典型的には、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.(1991)に記載された方法によって、この領域におけるアミノ酸残基のナンバリングを行う(Kabatと同様かまたはKabatによる可変ドメイン残基ナンバリングなどの語句は、本明細書において重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに関するこのナンバリングシステムを指す)。このナンバリングシステムを用いて、ペプチドの実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはCDRの短縮、または可変ドメインのFRもしくはCDRへの挿入に対応するより少ないアミノ酸または追加のアミノ酸を含んでもよい。例えば、重鎖可変ドメインは、$V_H$ CDR2の残基52の後ろの1アミノ酸挿入(Kabatによる残基52a)ならびに重鎖FR残基82の後ろの挿入残基(例えば、Kabatによる残基82a、82b、および82c)を含んでもよい。相同性のある領域での「標準的な」Kabatナンバリング配列と抗体の配列のアラインメントによって、所与の抗体について、残基のKabatナンバリングを決定してもよい。

【００３１】

本発明の文脈における「抗体」(Ab)という用語は、少なくとも約30分、少なくとも約45分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約4時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間もしくはそれより長く、約48時間もしくはそれより長く、約3、4、5、6、7日もしくはそれより長い日数などのようなかなりの期間、または任意のその他の関連性のある機能的に定義された期間(抗体の抗原への結合と関連する生理的反応を誘導、促進、増強、および／もしくは調整するのに十分な時間など)、典型的な生理的条件下で、抗原に特異的に結合する能力を有する、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそのいずれかの誘導体を指す。

【００３２】

免疫グロブリン分子の重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体(Ab)の定常領域は、免疫系の様々な細胞(エフェクター細胞など)および古典的補体系の第1成分(C1q)を含む、宿主の組織または因子への免疫グロブリンの結合を仲介してもよい。

【００３３】

抗CD38抗体は、二重特異性抗体、ダイアボディ、または同様の分子であってもよい(ダイアボディの説明については、例えば、PNAS USA 90(14), 6444-8(1993)参照)。実際、本

発明によって提供される、二重特異性抗体、ダイアボディなどは、CD38の一部に加えて、任意の好適な標的に結合してもよい。

【００３４】

上で示されたように、本明細書における抗体という用語は、そうでないように明記しないかまたは文脈上明らかに矛盾しない限り、抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体の断片を含む。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって発揮することができるということが示されている。「抗体」という用語の中に包含される結合断片の例として、(i)$V_L$、$V_H$、$C_L$、および$C_H1$ドメインからなる一価の断片である、Fab断片；(ii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価の断片である、$F(ab)_2$および$F(ab')_2$断片；(iii)$V_H$および$C_H1$ドメインから本質的になるFd断片；(iv)抗体の単一腕の$V_L$および$V_H$ドメインから本質的になるFv断片；(v)$V_H$ドメインから本質的になる、dAb断片(Ward et al., Nature 341, 544-546(1989))；(vi)単離された相補性決定領域(CDR)、ならびに(vii)任意で合成リンカーによって接続され得る2つまたはそれより多くの単離されたCDRの組み合わせが含まれる。さらに、Fv断片の2つのドメイン、$V_L$および$V_H$は、別々の遺伝子によってコードされているが、$V_L$および$V_H$領域が対を成して一価の分子(単鎖抗体または単鎖Fv(scFv)として公知、例えば、Bird et al., Science 242, 423-426(1988)およびHuston et al., PNAS USA 85, 5879-5883(1988)参照)を形成する単一のタンパク質鎖としてそれらが生成されるのを可能にするようにする合成リンカーによって、組換え法を用いて、それらを接続することができる。そうでないように言及しないかまたは文脈上明示しない限り、そのような単鎖抗体を、抗体という用語の中に包含する。ダイアボディなどの、その他の形態の単鎖抗体を、抗体という用語の中に含める。そのような断片は通常、抗体の意味の中に含まれるが、それらは全体としてかつ各々独立に本発明の独特の特色であり、異なる生物学的特性および有用性を示す。本発明の文脈におけるこれらおよびその他の有用な抗体断片をさらに本明細書で考察する。

【００３５】

抗体という用語は通常、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、キメラ抗体およびヒト化抗体などの、抗体様ポリペプチド、抗体に対する抗イデオタイプ(抗-Id)抗体、ならびに酵素的切断、ペプチド合成、および組換え技術などの、任意の公知の技術によって提供される抗原に特異的に結合する能力を保持する抗体断片(抗原結合断片)も含むということもまた理解されるべきである。作製されるような抗体は任意のアイソタイプを保有することができる。

【００３６】

「エピトープ」という用語は、抗体への特異的結合が可能なタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸または糖側鎖などの化学的に活性のある表面の分子の集団からなり、かつ通常、特異的な3次元構造特徴だけでなく、特異的な電荷特徴も有する。変性溶媒の存在下で、前者への結合は失われるが、後者への結合は失われないという点で、立体構造的エピトープおよび非立体構造的エピトープは区別される。エピトープは、結合に直接的に関与するアミノ酸残基(エピトープの免疫優勢な構成要素とも呼ばれる)および特異的に抗原に結合するペプチドによって効果的に遮断されるアミノ酸残基などの(言い換えると、アミノ酸残基が、特異的に抗原に結合するペプチドの足跡の範囲にある)結合に直接的には関与しないその他のアミノ酸残基を含んでもよい。

【００３７】

「二重特異性分子」という用語は、2つの異なる結合特異性を有する、タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド複合体などの、任意の作用物質を含むことが意図されている。例えば、本分子は、(a)細胞表面抗原および(b)エフェクター細胞の表面上のFc受容体と結合するか、または相互作用してもよい。「多重特異性分子」という用語は、2つより多くの異なる結合特異性を有する、例えば、タンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチド複合体などの、任意の作用物質を含むことが意図されている。例えば、本分子は、(a)細胞表面抗原、(b)エフェクター細胞の表面上のFc受容体、および(c)少なくとも1つのその他の構成要素と結合するか、または相互作用してもよい。した

がって、本発明には、CD38に対し、かつエフェクター細胞上のFc受容体などの、その他の細胞表面抗原または標的に対する二重特異的分子、三重特異的分子、四重特異的分子、およびその他の多重特異的分子が含まれるが、これらに限定されない。

【００３８】

「二重特異性抗体」という用語は、二重特異性分子である、任意の抗CD38抗体を含むことが意図されている。「二重特異性抗体」という用語にはダイアボディも含まれる。ダイアボディは、$V_H$および$V_L$ドメインは単一ポリペプチド鎖上に発現しているが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを用いているので、ドメインが別の鎖の相補性ドメインと対を形成することを強いられ、かつ2つの抗原結合部位を創り出している、二価の、二重特異性抗体である(例えば、Holliger, P. et al., PNAS USA 90, 6444-6448(1993), Poljak, R. J. et al., Structure 2, 1121-1123(1994)参照)。

【００３９】

本明細書で用いる場合、「エフェクター細胞」という用語は、免疫応答の認知相および活性化相とは対照的に、免疫応答のエフェクター相に関与する免疫細胞を指す。例示的な免疫細胞には、骨髄起源またはリンパ起源の細胞、例えば、リンパ球(B細胞および細胞溶解性T細胞(CTL)を含むT細胞など)、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多形核細胞、顆粒球、肥満細胞、ならびに好塩基球が含まれる。エフェクター細胞の中には、特異的Fc受容体を発現し、かつ特異的免疫機能を実行するものがある。幾つかの態様において、エフェクター細胞は、抗体依存性細胞毒性(ADCC)を誘導することができる好中球のように、ADCCを誘導することができる。例えば、FcRを発現する、単球、マクロファージは、標的細胞の特異的殺傷および免疫系のその他の構成要素への抗原の提示、または抗原を提示する細胞への結合に関与する。幾つかの態様において、エフェクター細胞は、標的抗原、標的細胞、または微生物を貪食してもよい。エフェクター細胞上の特定のFcRの発現を、サイトカインなどの液性因子によって調節することができる。例えば、FcγRIの発現は、インターフェロンγ(IFN-γ)および／またはG-CSFによって上方調節されることが分かっている。この増強された発現によって、FcγRIを持つ細胞の標的に対する細胞毒性活性が増加する。エフェクター細胞は、標的抗原または標的細胞を貪食または溶解することができる。

【００４０】

本明細書で用いる場合の、「ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図されている。本発明のヒト抗体には、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされていないアミノ酸残基(例えば、インビトロでのランダムかもしくは部位特異的な突然変異生成によるかまたはインビボでの体細胞突然変異によって導入された突然変異)が含まれてもよい。しかしながら、本明細書で用いる場合の、「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの、別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に継ぎ足された抗体を含むことが意図されていない。

【００４１】

本明細書で用いる場合、抗体が、例えば、ヒト免疫グロブリン遺伝子を持っているトランスジェニックマウスを免疫化することによるかまたはヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーをスクリーニングすることによって、ヒト免疫グロブリン配列を用いた系から得られ、かつ選択されたヒト抗体が、生殖系列のVHまたはVL可変領域遺伝子セグメントによってコードされたアミノ酸配列と、アミノ酸配列上少なくとも90％、例えば少なくとも95％、例えば少なくとも96％、例えば少なくとも97％、例えば少なくとも98％、または例えば少なくとも99％同一ならば、ヒト抗体は特定の生殖系列配列「に由来して」いる。典型的には、特定のヒト生殖系列のVHまたはVL可変領域遺伝子セグメント配列に由来するヒト抗体は、生殖系列免疫グロブリン遺伝子によってコードされるアミノ酸配列との10アミノ酸残基以下の違い、例えば5アミノ酸残基以下、例えば4、3、2、または1アミノ酸以下の違いを示すと考えられる。

【００４２】

「キメラ」抗体は、1つの抗体由来の1つまたは複数の領域、および別の種に由来する1つまたは複数のその他の抗体由来の1つまたは複数の領域を含む抗体である。一価のキメラ抗体は、キメラL鎖とのジスルフィド架橋を通して会合したキメラH鎖によって形成されたダイマー(HL)である。二価のキメラ抗体は、少なくとも1つのジスルフィド架橋を通して会合した2つのHLダイマーによって形成されたテトラマー($H_2L_2$)である。また、例えば、オリゴマー化する(例えば、IgM H鎖、またはμ鎖由来の)CH領域を利用することによって、多価のキメラ抗体を産生してもよい。典型的には、キメラ抗体は、重鎖および／または軽鎖の一部が特定の種に由来するかまたは特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一かもしくは相同である一方で、鎖の残りの部分は別の種に由来するかまたは別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体中の対応する配列と同一かもしくは相同である抗体だけでなく、それらが所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体の断片も指す(例えば、米国特許第4,816,567号およびMorrison et al., PNAS USA 81, 6851-6855(1984)参照)。キメラ抗体は当技術分野において周知の組換え過程によって産生される(例えば、Cabilly et al., PNAS USA 81, 3273-3277(1984)、Morrison et al., PNAS USA 81, 6851-6855(1984)、Boulianne et al., Nature 312, 643-646(1984)、欧州特許第125023号、Neuberger et al., Nature 314, 268-270(1985)、欧州特許第171496号、欧州特許第173494号、国際公開公報第86/01533号、欧州特許第184187号、Sahagan et al., J. Immunol. 137, 1066-1074(1986)、国際公開公報第87/02671号、Liu et al., PNAS USA 84, 3439-3443(1987)、Sun et al., PNAS USA 84, 214-218(1987)、Better et al., Science 240, 1041-1043(1988)、およびHarlow et al., Antibodies: A Loboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.,(1988)参照)。

【００４３】

「ヒト化」抗体は、重鎖および軽鎖のフレームワークならびに定常ドメイン中のあるアミノ酸が、ヒトにおける免疫応答を回避するかまたは抑止するように突然変異が導入されている、非ヒト種に由来する抗体である。非ヒト(例えばマウス)抗体のヒト化形態は、非ヒト免疫グロブリンに由来する最小限の配列を含むキメラ抗体である。大体において、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、特異性、および親和性などの所望の抗原結合特徴を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類などの非ヒト種の超可変領域(ドナー抗体)由来の残基で置き換えられているヒト免疫グロブリン(レシピエント抗体)である。幾つかの例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク領域(FR)残基は、対応する非ヒト残基で置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体またはドナー抗体に見出されない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能をさらに最適化するためになされる。一般に、ヒト化抗体は、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応しかつFR領域の全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFR領域である、少なくとも1つおよび典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むと考えられる。ヒト化抗体はまた任意で、免疫グロブリン定常領域(Fc)の少なくとも一部、典型的にはヒト免疫グロブリンの定常領域(Fc)の少なくとも一部を含むと考えられる。さらなる詳細については、Jones et al., Nature 321, 522-525(1986)、Riechmann et al., Nature 332, 323-329(1988)、およびPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2, 593-596(1992)を参照されたい。

【００４４】

本明細書で用いる場合の、「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性および親和性を示す。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する単一の結合特異性を示す抗体を指す。ヒトモノクローナル抗体を、不死化細胞と融合した、ヒト重鎖トランスジーンおよび軽鎖トランスジーンを含むゲノムを有する、トランスジェニックマウスなどの、トランスジェニックかまたはトランスクロモソーマルの(transchromosomal)非ヒト動物から得られたB細胞を含むハイブリドー

マで作製してもよい。モノクローナル抗体はmAbと省略されてもよい。

【００４５】

本明細書で用いる場合、「特異的結合」とは、所定の抗原に結合する抗体を指す。典型的には、抗体は、組換えCD38をリガンドとしてかつ抗体を分析物として用いて、BIAcore3000計器で表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって決定した場合、約$10^{-7}$ Mもしくはそれ未満、例えば約$10^{-8}$ Mもしくはそれ未満、例えば約$10^{-9}$ Mもしくはそれ未満、約$10^{-10}$ Mもしくはそれ未満、または約$10^{-11}$ Mもしくはさらにそれ未満の$K_D$に対応する親和性で結合する。抗体は、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)への結合に対するその親和性よりも少なくとも10倍低い、例えば少なくとも100倍低い、例えば少なくとも1000倍低い、例えば少なくとも10,000倍低い、例えば少なくとも100,000倍低い$K_D$に対応する親和性で所定の抗原に結合してもよい。親和性がより低い量は、抗体の$K_D$に依存しており、それゆえに抗体の$K_D$が非常に低い(すなわち、抗体が極めて特異的である)場合、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも低い量は少なくとも10,000倍である。

【００４６】

本明細書における特異性という用語は、CD38のその他の部分(その他の抗CD38抗体によって結合されるその他のエピトープを含む)との検出可能な反応性をほんのわずかしか有さないかまたは全く有さない一方で、抗CD38抗体などの、CD38結合ペプチドがCD38内部のエピトープを認識する能力を指す。特異性は、本明細書で記載したような競合アッセイによって相対的に決定することができる。特異性は、より具体的には、本明細書で記載したエピトープ同定／特徴解析技術または当技術分野において公知のそれらの同等物のいずれかによって決定することができる。

【００４７】

特定の抗原決定基に特異的な抗体はそれでもなお、CD38との何らかの生物学的文脈において存在し得るその他の生体分子と交差反応する可能性がある。より典型的には、抗CD38抗体は、その他の種由来のCD38ホモログと交差反応する可能性がある。一方または両方の文脈において、典型的に、そのような交差反応性の抗体は、関連性のある構造および／または環境因子に関してヒトCD38に選択的である。

【００４８】

本明細書における「選択性」という用語は、特定の領域、標的、またはペプチド；典型的には、1つまたは複数のその他の生物学的な分子、構造、細胞、組織などとは対照的な、CD38中の領域またはエピトープに対する、抗CD38抗体の優先的結合を指す。ある態様において、本発明で用いる抗CD38抗体は、結腸癌細胞の文脈におけるCD38の一部に選択的である(すなわち、抗CD38抗体は、結腸癌細胞のその他の構成要素よりもCD38の部分に選択的に結合すると考えられる)。

【００４９】

本明細書で用いる、「$k_d$」($sec^{-1}$)という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡速度定数を指すことが意図されている。該値は$k_{off}$値とも称される。

【００５０】

本明細書で用いる、「$k_a$」($M^{-1}\times sec^{-1}$)という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡速度定数を指すことが意図されている。

【００５１】

本明細書で用いる、「$K_D$」(M)という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指すことが意図されている。

【００５２】

本明細書で用いる、「$K_A$」($M^{-1}$)という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の会合平衡定数を指すことが意図されており、$k_a$を$k_d$で割ることによって得られる。

【００５３】

本明細書で用いる場合、「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス(例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM)を指す。

【００５４】
「標的細胞」は、個体における任意の望ましくない細胞を意味するものとする。幾つかの態様において、標的細胞は、CD38を発現または過剰発現する細胞である。CD38を発現する細胞には、典型的には、髄質胸腺細胞、活性化したTおよびB細胞、80％の休止期のNK細胞および単球、リンパ節胚中心リンパ芽球、形質B細胞および幾つかの濾胞内細胞、樹状細胞、正常骨髄細胞、特定の前駆体細胞、50～80％の臍帯血細胞、赤血球、ならびに血小板などの、造血細胞が含まれる。CD38は、腸の上皮内細胞および固有層リンパ球などの、非造血細胞によって、脳のプルキンエ細胞および神経原線維変化によって、前立腺の上皮細胞、膵臓のβ細胞、骨の破骨細胞、目の網膜細胞、ならびに平滑筋および横紋筋の筋鞘によって、発現される可能性もある。悪性細胞に関して、CD38は、多発性骨髄腫、原発性または続発性の形質細胞白血病、B細胞慢性リンパ球性白血病、B細胞急性リンパ球性白血病、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、原発性の全身性アミロイドーシス、マントル細胞リンパ腫、前リンパ球性／骨髄球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、濾胞性リンパ腫、およびNK細胞白血病を含むが、これらに制限されない、種々の悪性血液疾患で発現している。
【００５５】
本明細書で用いる場合、「個体」という用語には、任意のヒトまたは非ヒトの動物が含まれる。「非ヒト動物」という用語には、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などのような、哺乳動物および非哺乳動物が含まれる。
【００５６】
「処置」とは、症状または疾患状態を緩和するか、改善するか、または根絶する(治癒する)目的で有効量の本発明の治療活性化合物の投与を意味する。
【００５７】
本発明の局面および態様
第一の主な局面において、本発明は、それを必要とする個体でCD38を発現する腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害するための方法であって、個体に対する
i)CD38に結合する、すなわち、特異的に結合する非アゴニスト抗体、
ii)少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
の投与を含む方法に関する。
【００５８】
さらなる主な局面において、本発明は、それを必要とする個体でCD38を発現する腫瘍細胞を伴う癌を処置するための方法であって、個体に対する
i)CD38に結合する、すなわち、特異的に結合する非アゴニスト抗体、
ii)任意で少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii)任意で少なくとも1つの、非アルキル化非コルチコステロイド化学療法剤などの、非コルチコステロイド化学療法剤
の投与、続いて自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を含む方法に関する。
【００５９】
本発明の上記の方法のある態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、細胞毒性薬剤および／または血管形成阻害剤を含む。さらなる態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、アルキル化薬剤を含む。
【００６０】
なおさらなる態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、メルファラン、メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、およびカルボプラチンなどの、その他のプラチナ誘導体からなる群より選択される1つまたは複数の薬剤を含む。

【００６１】
さらなる態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、サリドマイド(Thalomid(登録商標))またはサリドマイド類似体、例えば、CC-5013(レナリドマイド、Revlimid(商標))もしくはCC4047(Actimid(商標))などの、グルタミン酸誘導体を含む。
【００６２】
なおさらなる態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、ボルテゾミブ(Velcade(登録商標))などの、プロテアソーム阻害剤またはビンクリスチンなどの、ビンカアルカロイドまたはドキソルビシンなどの、アントラサイクリンを含む。
【００６３】
本発明の方法のある態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドは、グルココルチコイドを含む。さらなる態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドは、プレドニゾンまたはデキサメタゾンを含む。
【００６４】
本発明のさらなる態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはプレドニゾンを含みかつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はメルファランを含む。
【００６５】
本発明のなおさらなる態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはプレドニゾンを含みかつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はサリドマイドを含む。
【００６６】
本発明のなおさらなる態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはプレドニゾンを含みかつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はメルファランおよびサリドマイドを含む。
【００６７】
本発明のなおさらなる態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含みかつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はサリドマイドおよび／またはレナリドマイドを含む。
【００６８】
本発明のなおさらなる態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含みかつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はビンクリスチンおよび／またはドキソルビシンを含む。
【００６９】
本発明の方法のある態様において、CD38に結合する非アゴニスト抗体は、ヒトモノクローナル抗体などの、モノクローナル抗体である。
【００７０】
本発明の方法のさらなる態様において、抗体はCD38のアンタゴニストである。
【００７１】
本発明のさらなる態様において、抗体は
- 本明細書の実施例19に記載した方法によって決定される場合、ヒト単球もしくは末梢血単核細胞による顕著なIL-6の放出を誘導しない抗体
および／または
- 本明細書の実施例20に記載した方法によって決定される場合、ヒトT細胞もしくは末梢血単核細胞による検出可能なIFN-γの放出を誘導しない抗体
および／または
- 本明細書の実施例12に記載した方法により37℃で5～15分以内にCHO-CD38細胞によって内在化されるような、CD38発現細胞によって内在化される抗体
および／または
- 本明細書の実施例5に記載した方法によって決定される場合、Daudi-luc細胞で15 ng/ml未満、例えば10 ng/ml未満の$EC_{50}$値を持ち、かつMM細胞で75 ng/ml未満、例えば50 ng/

ml、30 ng/ml、または10 ng/ml未満の$EC_{50}$値を持つような、ADCCを誘導する抗体
および／または
- 本明細書の実施例6に記載した方法により、daudi-lucもしくはCD38-CHO細胞で5 μg/ml未満、例えば1 μg/ml未満の$EC_{50}$値を持つような、補体の存在下でCDCを誘導する抗体
および／または
- cGDPRの合成を阻害する抗体
および／または
- cADPRの合成を阻害する抗体
および／または
- 本明細書の実施例20に記載した表面プラズモン共鳴によって決定される場合、$10^{-8}$ M未満、例えば$10^{-8}$ M～$10^{-11}$ Mの範囲内、例えば$7\times10^{-9}$ M～$10^{-10}$ Mの範囲内の親和性($K_D$)でヒトCD38に結合する抗体
および／または
- 本明細書の実施例24に記載した分光光度法によって決定される場合、3 μg/mlの濃度で90分後に少なくとも25%、例えば少なくとも30%、cGDPRの合成を阻害する抗体
および／または
- Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571(2000)に記載されたHPLC法によって決定される場合、3 μg/mlの濃度で90分後に少なくとも25%、例えば少なくとも30%、cADPRの合成を阻害する抗体
である。

【００７２】
ある態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、抗体-003である。-003は、配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体である。

【００７３】
別の態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、抗体-005である。-005は、配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体である。

【００７４】
さらなる態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、抗体-024である。-024は、配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体である。

【００７５】
ある態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、それぞれ、配列番号：1および配列番号：6に示されたそれらの可変領域中のヌクレオチド配列を含むヒト軽鎖およびヒト重鎖の核酸によってコードされるヒトCD38に結合する抗体である。

【００７６】
ある態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、それぞれ、配列番号：11および配列番号：16に示されたそれらの可変領域中のヌクレオチド配列を含むヒト軽鎖およびヒト重鎖の核酸によってコードされるヒトCD38に結合する抗体である。

【００７７】
ある態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、それぞれ、配列番号：21および配列番号：26に示されたそれらの可変領域中のヌクレオチド配列を含むヒト軽鎖およびヒト重鎖の核酸によってコードされるヒトCD38に結合する抗体である。

【００７８】
またさらなる態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、国際公開公報第2005/103083号(Morphosys)に記載された抗体のうちの1つ、特に国際公開公報第2005/103083号の図1bに示された配列および／または図2Bに示された配列のうちの1つまたは複数を含む抗体である。

【００７９】

抗体は、主に6つの重鎖および軽鎖の相補性決定領域(CDR)にあるアミノ酸残基を通じて標的抗原と相互作用する。この理由のために、CDR外の配列よりもCDR内のアミノ酸配列が、個々の抗体間で多様である。CDR配列は大部分の抗体-抗原相互作用に関与するので、異なる特性を持つ異なる抗体由来のフレームワーク配列に継ぎ足された特定の天然の抗体由来のCDR配列を含む発現ベクターを構築することによって、特定の天然の抗体の特性を模倣する組換え抗体を発現させることが可能である(例えば、Riechmann, L. et al., Nature 332, 323-327(1998)、Jones, P. et al., Nature 321, 522-525 (1986)、およびQueen, C. et al., PNAS USA 86, 10029-10033(1989)参照)。

【００８０】

抗体重鎖CDR3ドメインが抗原に対する抗体の結合特異性／親和性に特に重要な役割を果たしていることは当技術分野において周知であるので(Ditzel HJ, et al., J Immunol. 157 (2), 739-49 (1996)、Barbas SM et al., J. Am. Chem. Soc. 116, 2161-2162 (1994)、およびBarbas SM et al., Proc Natl Acad Sci USA 92 (7), 2529-33 (1995))、本発明で用いる抗体は、-003または-005または-024の重鎖CDR3を含んでもよい。本発明で用いる抗体はまた、-003または-005または-024の重鎖および軽鎖CDR3を含んでもよい。

【００８１】

したがって、本発明の方法のさらなる態様において、抗体は、配列番号：10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である。

【００８２】

ある態様において、実施例の項に記載したようなELISAの使用によって、競合を決定する。

【００８３】

別の態様において、実施例の項に記載したようなFACSの使用によって、競合を決定する。

【００８４】

別の態様において、抗体は、配列番号：5に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号：10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である。

【００８５】

別の態様において、抗体は、ヒト軽鎖およびヒト重鎖の可変領域を含む抗体であり、軽鎖可変領域は、配列番号：3に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号：4に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号：5に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ重鎖可変領域は、配列番号：8に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号：9に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号：10に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む。

【００８６】

別の態様において、抗体は、配列番号：2に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域または配列番号：2に示された配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である。

【００８７】

別の態様において、抗体は、配列番号：7に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域、または配列番号：7に示された配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号：7に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む抗体である。

【００８８】

別の態様において、抗体は、配列番号：20に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体、または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である。

【００８９】

別の態様において、抗体は、配列番号：15に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号：20に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である。

【００９０】
別の態様において、抗体は、ヒト軽鎖およびヒト重鎖の可変領域を含む抗体であり、軽鎖可変領域は、配列番号：13に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号：14に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号：15に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ重鎖可変領域は、配列番号：18に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号：19に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号：20に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む。
【００９１】
別の態様において、抗体は、配列番号：12に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域、または配列番号：12による配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である。
【００９２】
別の態様において、抗体は、配列番号：17に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域または配列番号：17に示された配列と、少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号：17に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む、抗体である。
【００９３】
別の態様において、抗体は、配列番号：30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体、または例えば、該抗体と同じエピトープに結合することによって、該抗体とCD38結合を競合する抗体である。
【００９４】
別の態様において、抗体は、配列番号：25に示された配列を有する$V_L$ CDR3および配列番号：30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む抗体である。
【００９５】
別の態様において、抗体は、ヒト軽鎖およびヒト重鎖の可変領域を含む抗体であり、軽鎖可変領域は、配列番号：23に示された配列を有する$V_L$ CDR1、配列番号：24に示された配列を有する$V_L$ CDR2、および配列番号：25に示された配列を有する$V_L$ CDR3を含み、かつ重鎖可変領域は、配列番号：28に示された配列を有する$V_H$ CDR1、配列番号：29に示された配列を有する$V_H$ CDR2、および配列番号：30に示された配列を有する$V_H$ CDR3を含む。
【００９６】
別の態様において、抗体は、配列番号：22に示されたアミノ酸配列を有する$V_L$領域または配列番号：22による配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_L$領域を含む抗体である。
【００９７】
別の態様において、抗体は、配列番号：27に示されたアミノ酸配列を有する$V_H$領域または配列番号：27による配列と少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％のアミノ酸配列同一性を有する$V_H$領域、または配列番号：27に示された配列と比較して1～5個、例えば1～3個のアミノ酸置換、欠失、もしくは付加を有する$V_H$領域を含む抗体である。
【００９８】
本発明の方法のある態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、メルファラン、メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、およびカルボプラチンなどの、その他のプラチナ誘導体からなる群より選択される1つまたは複数の薬剤を含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有する

ヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。
【００９９】
本発明の方法のある態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はメルファランを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。
【０１００】
別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、サリドマイド(Thalomid(登録商標))またはサリドマイド類似体、例えば、CC-5013(レナリドマイド、Revlimid(商標))もしくはCC4047(Actimid(商標))などの、グルタミン酸誘導体を含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。
【０１０１】
別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、サリドマイド(Thalomid(登録商標))またはサリドマイド類似体、例えば、CC-5013(レナリドマイド、Revlimid(商標))もしくはCC4047(Actimid(商標))などの、グルタミン酸誘導体を含み、かつ抗体は、配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体である。
【０１０２】
別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、ボルテゾミブ(Velcade(登録商標))などの、プロテアソーム阻害剤を含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。
【０１０３】
別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含み、
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、ボルテゾミブ(Velcade(登録商標))などの、プロテアソーム阻害剤を含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、

- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１０４】

別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、ビンクリスチンなどの、ビンカアルカロイドを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１０５】

別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、ドキソルビシンなどの、アントラサイクリンを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１０６】

別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはグルココルチコイドを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１０７】

別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはプレドニゾンを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１０８】

別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはプレドニゾンを含み、かつ

少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はメルファランを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１０９】

別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはプレドニゾンを含み、かつ
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はサリドマイドを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１１０】

別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはプレドニゾンを含み、かつ
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はメルファランおよびサリドマイドを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１１１】

別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１１２】

別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含み、かつ
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はサリドマイドおよび／またはレナリドマイドを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒ

トモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１１３】

別の態様において、少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含み、かつ
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はビンクリスチンおよび／またはドキソルビシンを含み、かつ
抗体は、
- 配列番号：2の配列からなる$V_L$領域および配列番号：7の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、
- 配列番号：12の配列からなる$V_L$領域および配列番号：17の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体、ならびに
- 配列番号：22の配列からなる$V_L$領域および配列番号：27の配列からなる$V_H$領域を有するヒトモノクローナルIgG1抗体
からなる群より選択される。

【０１１４】

本発明での使用に好適な抗体には、実施例の抗体の変異体も含まれる。CD38抗体の文脈で用いる$V_L$、$V_H$、またはCDRの機能的変異体は、抗体が親抗体の親和性／結合力および／または特異性／選択性の少なくとも相当な割合(少なくとも約50％、60％、70％、80％、90％、95％、もしくはそれより多く)を保持するのを依然として可能にし、かつ場合によっては、そのような抗体は親抗体よりも大きい親和性、選択性、および／または特異性と関連する可能性がある。

【０１１５】

「変異体」抗CD38抗体は、CDRまたはその他の$V_H$および／もしくは$V_L$配列中の、置換、欠失、挿入、または末端配列付加である、1つまたは複数の好適なアミノ酸残基改変(そのような変化によって、向上しないにせよ、親抗体のエピトープ結合特徴の少なくとも相当な量が保持されると仮定すれば)により親抗体(典型的には免疫化によって作製される)と異なる抗体である。

【０１１６】

したがって、例えば、抗体変異体において、1つまたは複数のアミノ酸残基を、1つまたは複数のCDRなどの、親抗体の1つもしくは複数の超可変領域にまたは親抗体の1つもしくは複数の超可変領域の近くに導入するかまたは挿入してもよい。抗CD38抗体変異体は、この場合もやはり親抗体のエピトープ結合特徴の少なくとも相当な量が保持されるならば、任意の数の挿入されたアミノ酸残基を含んでもよい。本発明の抗CD38抗体変異体は、例えば、約1～30個の挿入されたアミノ酸残基、例えば約1～10個、例えば約2～10個、例えば2～5個、または例えば約1～5個の挿入されたアミノ酸残基を含んでもよい。同様に、本発明の抗CD38抗体変異体は、例えば、約1～30個の欠失したアミノ酸残基、例えば約1～10個、例えば約2～10個、例えば2～5個、または例えば約1～5個の欠失したアミノ酸残基を含んでもよい。同様に、本発明の抗CD38抗体変異体は、例えば、約1～30個の置換されたアミノ酸残基、例えば約1～10個、例えば約2～10個、例えば2～5個、または例えば約1～5個の置換されたアミノ酸残基を含んでもよい。同様に、本発明のために有用な抗CD38抗体変異体は、例えば、約1～30個の末端配列アミノ酸残基付加、例えば約1～10個、例えば約2～10個、例えば2～5個、または例えば約1～5個の末端配列アミノ酸残基付加を含んでもよい。本発明の抗体変異体はまた、変異体が1つまたは複数のCD38エピトープに関して親抗体の親和性、特異性、および／または選択性の少なくとも相当な割合を保有すると仮定すれば、そのような挿入、欠失、置換、および末端配列アミノ酸残基付加のうちの2つまた

は複数の組み合わせを含んでもよい。

【０１１７】

ある態様において、本発明で用いる抗体は、配列番号：10または配列番号：20または配列番号：30のいずれか1つによる配列との少なくとも約80％、例えば少なくとも約85％、例えば少なくとも約90％、例えば少なくとも約95％の配列同一性を有する配列から本質的になる変異体$V_H$ CDR3を含み、本抗体は、それぞれ、配列番号：10または配列番号：20または配列番号：30の変異体$V_H$ CDR3配列を有する抗体のエピトープ結合特徴の少なくとも相当な割合(少なくとも約50％、60％、70％、80％、90％、95％、またはそれより多く)を有し、例えばそれぞれ、配列番号：7または配列番号：17または配列番号：27の$V_H$配列を有する抗体、例えばそれぞれ、配列番号：7の$V_H$配列および配列番号：2の$V_L$配列を有する抗体、または配列番号：17の$V_H$配列および配列番号：12の$V_L$配列を有する抗体、または配列番号：27の$V_H$配列および配列番号：22の$V_L$配列を有する抗体である。

【０１１８】

2つの配列間の同一性率は、配列によって共有される同一位置の数の関数であり(すなわち、相同性(％)＝同一位置の数／位置の総数×100)、2つの配列の最適アラインメントのために導入される必要がある、ギャップの数、および各々のギャップの長さを考慮に入れている。2つの配列間の配列の比較および同一性率の決定を、下記の非限定的な実施例に記載するような、数学的アルゴリズムを用いて遂行してもよい。

【０１１９】

NWSgapdna.CMPマトリックス、ならびに40、50、60、70、または80というギャップ加重および1、2、3、4、5、または6という長さ加重を用いる、GCGソフトウェアパッケージ(http://www.gcg.comで入手可能)中のGAPプログラムを用いて、2つのヌクレオチド配列間の同一性率を決定してもよい。また、PAM120加重残基表、12というギャップ長ペナルティー、および4というギャップペナルティーを用いる、ALIGNプログラム(第2版)に組み入れられたE. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci 4, 11-17(1988)のアルゴリズムを用いて、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性率を決定してもよい。さらに、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックス、ならびに16、14、12、10、8、6、または4というギャップ加重および1、2、3、4、5、または6という長さ加重を用いる、GCGソフトウェアパッケージ(http://www.gcg.comで入手可能)中のGAPプログラムに組み入れられたNeedleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444-453(1970)のアルゴリズムを用いて、2つのアミノ酸配列間の同一性率を決定してもよい。

【０１２０】

CDR変異体の配列は、主に保存的置換によって、親抗体配列のCDRの配列と異なってもよく；変異体における置換の、例えば、少なくとも約35％、約50％またはそれより多く、約60％またはそれより多く、約70％またはそれより多く、約75％またはそれより多く、約80％またはそれより多く、約85％またはそれより多く、約90％またはそれより多く、約95％またはそれより多く(例えば、約65～99％)は、保存的アミノ酸残基交換である。本発明の文脈において、以下の3つの表のうちの1つまたは複数に反映されるアミノ酸のクラス内の置換によって、保存的置換を定義してもよい。

保存的置換のためのアミノ酸残基のクラス

| | |
|---|---|
| 酸性残基 | Asp および Glu |
| 塩基性残基 | Lys, Arg, および His |
| 親水性非荷電残基 | Ser, Thr, Asn, および Gln |
| 脂肪族非荷電残基 | Gly, Ala, Val, Leu, および Ile |
| 非極性非荷電残基 | Cys, Met, および Pro |
| 芳香族残基 | Phe, Tyr, および Trp |

代替の保存的アミノ酸残基置換のクラス

| | | | |
|---|---|---|---|
| 1 | Ala (A) | Ser (S) | Thr (T) |
| 2 | Asp (D) | Glu (E) | |
| 3 | Asp (N) | Gln (Q) | |
| 4 | Arg (R) | Lys (K) | |
| 5 | Ile (I) | Leu (L) | Met (M) |
| 6 | Phe (F) | Tyr (Y) | Trp (W) |

アミノ酸残基の代替の物理的および機能的分類

| | |
|---|---|
| アルコール基含有残基 | SおよびT |
| 脂肪族残基 | I, L, V, およびM |
| シクロアルケニル関連残基 | F, H, W, およびY |
| 疎水性残基 | A, C, F, G, H, I, L, M, R, T, V, W, およびY |
| 負に帯電した残基 | DおよびE |
| 極性残基 | C, D, E, H, K, N, Q, R, S, およびT |
| 正に帯電した残基 | H, K, およびR |
| 小さい残基 | A, C, D, G, N, P, S, T, およびV |
| 非常に小さい残基 | A, G, およびS |
| ターン形成に関与する残基 | A, C, D, E, G, H, K, N, Q, R, S, P, およびT |
| 柔軟性のある残基 | Q, T, K, S, G, P, D, E, およびR |

【０１２１】

より保存的な置換のグループには、バリン-ロイシン-イソロイシン、フェニルアラニン-チロシン、リジン-アルギニン、アラニン-バリン、およびアスパラギン-グルタミン：が含まれる。また、例えば、Creighton(1984)Proteins: Structure and Molecular Properties(第2版、1993), W. H. Freeman and Companyに記載された原理を用いて、追加のアミノ酸の群を定式化してもよい。

【０１２２】

超可変領域挿入を行なって変異体抗体を作製する場合、公知の抗体における当該の超可変領域の長さの典型的な範囲を考慮に入れるべきである。例えば、軽鎖可変ドメインの第一の超可変領域について、挿入は、実質的に同様で、それゆえに予期される適当なサイズを保持しながら、親抗体の$V_L$ CDR1配列に導入されてもよく、それはKabat et al., 前記によれば、例えば、典型的には、全体として約9～20(例えば、約10～17)残基を有する。同様に、$V_L$ CDR2は典型的には、約5～10残基の全体の長さを有し；$V_L$ CDR3は典型的には、約7～20残基の長さを有し；$V_H$ CDR1は典型的には、約10～15残基の長さを有し；$V_H$ CDR2は典型的には、約15～20残基の長さを有し；かつ$V_H$ CDR3は典型的には、約6～30残基(例えば、3～25残基)の長さを有する。$V_H$領域における挿入は典型的には、$V_H$ CDR3および典

型的には、Kabatに記載されているようなアラインメントおよびナンバリングを用いて、親$V_H$ CDR3の残基97～102周辺などの(例えば、親$V_H$ CDR3配列の残基番号100に隣接するか、または親$V_H$ CDR3配列の残基番号100に対して配列上C末端側にある)、ドメインのC末端付近でなされる。とりわけ、標的抗原に対する親抗体の最初の結合親和性が、ランダムに産生された抗体変異体を容易にスクリーニングし得るほどのものである場合、その超可変領域中の挿入されたアミノ酸残基を持つ抗体変異体をランダムに調製してもよい。例えば、ファージディスプレイは、そのようなランダム変異体をスクリーニングする便利な方法を提供する。

【０１２３】

さらなる態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、CD38への結合について、配列番号：2の$V_L$配列および配列番号：7の$V_H$配列を有する抗体(抗体-003など)、または配列番号：12の$V_L$配列および配列番号：17の$V_H$配列を有する抗体(抗体-005など)、または配列番号：22の$V_L$配列および配列番号：27の$V_H$配列を有する抗体(抗体-024など)と競合する(競合的に阻害する)かまたは交差競合する(すなわち、エピトープ結合を相対的に部分的に阻害する)その能力に関して特徴付けられている抗体である。そのような抗体は、例えば、配列番号：2の$V_L$配列および配列番号：7の$V_H$配列を有する抗体、もしくは配列番号：12の$V_L$配列および配列番号：17の$V_H$配列を有する抗体、もしくは配列番号：22の$V_L$配列および配列番号：27の$V_H$配列を有する抗体によって結合されるエピトープと同一であるかまたは該エピトープと重複するエピトープに結合する抗体に由来する、Fab断片であってもよい。2つまたはそれより多くの抗体によるCD38またはCD38の部分への結合の競合を、任意の好適な技術によって決定してもよい。ある態様において、例えば、実施例7、8、および9に記載したように、競合を決定する。

【０１２４】

ELISAおよび／またはFACS解析で決定した場合、競合が約5％よりも顕著に大きい相対阻害を表すことがよくある。より高い閾値の相対阻害を、特定の文脈(例えば、競合解析を用いて、CD38に結合する別のペプチドまたは分子(例えば、CD31抗原、EndoCAM、GPIIA'、PECAM-1、血小板／内皮細胞接着分子、または天然の抗CD38抗体とも呼ばれる、CD31などのCD38の天然の結合パートナー)の結合を阻止するという意図された機能を考慮して設計された新しい抗体を選択またはスクリーニングする場合)において好適なレベルの競合であることの基準／決定因子として設定することが望ましい場合がある。したがって、例えば、抗体を十分に競合的であるとみなす前に、少なくとも約10％相対阻害が検出されるか；少なくとも約15％相対阻害が検出されるか；または少なくとも約20％相対阻害が検出される、競合性についての基準を設定することが可能である。競合抗体に属するエピトープが抗原中に密接して位置する場合、競合は、約40％よりも大きいCD38結合の相対阻害(例えば、少なくとも約45％阻害、例えば少なくとも約50％阻害、例えば少なくとも約55％阻害、例えば少なくとも約60％阻害、例えば少なくとも約65％阻害、例えば少なくとも約70％阻害、例えば少なくとも約75％阻害、例えば少なくとも約80％阻害、例えば少なくとも約85％阻害、例えば少なくとも約90％阻害、例えば少なくとも約95％阻害、またはそれより高いレベルの相対阻害)により特徴付けられる可能性がある。

【０１２５】

さらなる態様において、本発明で用いる非アゴニストCD38抗体は、配列番号：2の$V_L$配列および配列番号：7の$V_H$配列を有する抗体(抗体-003など)、または配列番号：12の$V_L$配列および配列番号：17の$V_H$配列を有する抗体(抗体-005など)、または配列番号：22の$V_L$配列および配列番号：27の$V_H$配列を有する抗体(抗体-024など)によっても特異的に結合されるCD38エピトープに特異的に結合する抗体である。

【０１２６】

配列番号：2の$V_L$配列および配列番号：7の$V_H$配列を有する抗体(抗体-003など)、または配列番号：12の$V_L$配列および配列番号：17の$V_H$配列を有する(抗体-005など)抗体、または配列番号：22の$V_L$配列および配列番号：27の$V_H$配列を有する抗体(抗体-024など)によって結合されるCD38エピトープを、標準的なマッピングおよび特徴解析技術によって同定して

もよく、そのさらなる微細な点を任意の好適な技術によって同定してもよく、その数多くの例は当業者に利用可能である。また、これらの技術を用いて、一般に抗CD38抗体のエピトープを同定しかつ／または特徴付けてもよい。そのようなマッピング／特徴解析法の1つの例として、CD38タンパク質中の露出したアミン／カルボキシルの化学修飾を用いるエピトープ「フットプリンティング」によって、抗CD38抗体のエピトープを決定してもよい。そのようなフットプリンティング技術の1つの具体的な例は、受容体およびリガンドタンパク質のアミドプロトンの水素／重水素交換、結合、ならびに逆交換が起こり、タンパク質結合に関与する骨格アミド基が逆交換から保護され、それゆえに重水素化されないままであると考えられる、HXMS(マススペクトロメトリーによって検出される水素-重水素交換)の使用である。この時点でペプシンによるタンパク質分解、ファストマイクロボア高速液体クロマトグラフィー分離、および／またはエレクトロスプレーイオン化マススペクトロメトリーによって関連性のある領域を同定してもよい。例えば、Ehring H, Analytical Biochemistry, 267(2) 252-259 (1999)および／またはEngen, J. R. and Smith, D. L. (2001) Anal. Chem. 73, 256A-265Aを参照されたい。好適なエピトープ同定技術の別の例は、典型的には遊離の抗原および抗体などの、抗原結合ペプチドと複合体を形成した抗原の2次元NMRスペクトル中のシグナルの位置を比較する、核磁気共鳴エピトープマッピング(NMR)である。抗原は典型的には、$^{15}$Nで選択的に放射性同位体標識されており、そのため抗原に対応するシグナルのみがNMRスペクトル中で見られ、抗原結合ペプチドからのシグナルは見られない。抗原結合ペプチドとの相互作用に関与するアミノ酸から発生する抗原シグナルは、典型的には、遊離の抗原のスペクトルと比較して、複合体のスペクトル中の位置を移動させると考えられており、結合に関与するアミノ酸はそのように同定されてもよい。例えば、Ernst Schering Res Found Workshop. (44), 149-67(2004)、Huang et al., Journal of Molecular Biology 281(1), 61-67(1998)、およびSaito and Patterson, Methods. 9(3), 516-24(1996)を参照されたい。

【０１２７】

エピトープマッピング／特徴解析はまた、マススペクトロメトリー法を用いて行なってもよい。例えば、Downward, J Mass Spectrom. 35(4), 493-503(2000)およびKiselar and Downard, Anal Chem. 71(9), 1792-801(1999)を参照されたい。

【０１２８】

プロテアーゼ消化技術もまた、エピトープマッピングおよび同定技術の文脈において有用である場合がある。例えばCD38に対して約1：50の比のトリプシンを37℃およびpH 7～8での終夜(O/N)消化で用いることによる、プロテアーゼ消化、それに続くペプチド同定のためのマススペクトロメトリー(MS)解析によって、抗原決定基関連領域／配列を決定してもよい。その後、トリプシン消化に供された試料と、抗体とインキュベートし、その後例えば、トリプシンによる消化に供された(それによって結合物の足跡を示す)試料との比較により、抗体によってトリプシン切断から保護されたペプチドを同定してもよい。キモトリプシン、ペプシンなどのその他の酵素を、同様にかまたは代わりとして、同様のエピトープ特徴解析法で用いてもよい。これらの測定において配列番号：2の$V_L$配列および配列番号：7の$V_H$配列を有する抗体(抗体-003など)、または配列番号：12の$V_L$配列および配列番号：17の$V_H$配列を有する抗体(抗体-005など)、または配列番号：22の$V_L$配列および配列番号：27の$V_H$配列を有する抗体(抗体-024など)と顕著に同じ結果を与える抗体を、それぞれ配列番号：2の$V_L$配列および配列番号：7の$V_H$配列を有する抗体(抗体-003など)、または配列番号：12の$V_L$配列および配列番号：17の$V_H$配列を有する抗体(抗体-005など)、または配列番号：22の$V_L$配列および配列番号：27の$V_H$配列を有する抗体(抗体-024など)と同じエピトープに結合する抗体であると見なす。同様の技術の考察については、例えば、Manca, Ann Ist Super Sanita. 27(1), 15-9(1991)を参照されたい。

【０１２９】

エピトープをマッピングする際に潜在的に役立つその他の方法には、結晶学技術、X線回折技術(1970年代～1980年代にPoljakおよびその他によって開発されたX線回折／配列研究技術など)、ならびにマルチピンペプチド合成技術(Multipin Peptide Synthesis Techn

ology)の適用が含まれる。また、配列解析および3次元構造解析およびドッキングなどのコンピュータに基づく方法を用いて、抗原決定基を同定してもよい。また、例えば、個々のモノクローナル抗体のFab断片の構造のドッキングを伴うCD38の構造を用いた分子モデリングによって、エピトープを決定してもよい。これらおよびその他のマッピング法は、Epitope Mapping A Practical Approach(Westwood and Hay編)2001 Oxford University Pressで考察されている。

【０１３０】

本発明で用いる抗体は、CD38に少なくとも部分的に含まれる1つまたは複数のエピトープに対する任意の好適な親和性および／または結合力を有してもよい。親和性は、そのようなエピトープへの抗体の結合の強さを指す。典型的には、親和性は、[Ab]×[Ag]/[Ab-Ag]と定義される、解離定数$K_d$で測定され、式中、[Ab-Ag]は抗体-抗原複合体(または抗体-抗原複合体)のモル濃度であり、[Ab]は結合していない抗体のモル濃度であり、かつ[Ag]は結合していない抗原のモル濃度である。親和性定数$K_a$は、1／$K_d$によって定義される。競合的阻害によって特異性および親和性を決定するための好適な方法を、例えばHarlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.,(1988)、Colligan et al., 編, Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley InterScience N. Y.,(1992, 1993)、およびMuller, Meth. Enzymol. 92, 589-601(1983)に見出すことができる。

【０１３１】

本発明で用いる抗CD38抗体は、CD38中に少なくとも部分的に含まれる少なくとも1つのエプトープに対して約$10^4$～約$10^{10}$ $M^{-1}$の範囲の親和性を有してもよい。そのような抗体は、-003および-005および-024と少なくとも同じ程度に大きいCD38に対する親和性を有してもよく、幾つかの態様において、-003および-005および-024と少なくともほぼ同じ程度に大きい親和性を有する。本明細書の別の場所に記載した方法、または当技術分野におけるそれらの公知の同等物のいずれかによって、親和性を決定してもよい。親和性を決定するのに使用し得る1つの方法の例は、Munson & Pollard, Anal. Biochem, 107, 220(1980)のスキャッチャード解析で提供されている。また、平衡法(例えば酵素連結免疫吸着アッセイ(ELISA)または放射性免疫アッセイ(RIA))もしくは反応速度論アッセイ(例えばBIACORE(商標)解析)によって、結合親和性を決定してもよい。

【０１３２】

典型的には、本発明で用いる抗CD38抗体の解離定数は、約100 nM未満、約50 nM未満、約10 nM未満、約5 nMもしくはそれ未満、約1 nMもしくはそれ未満、約0.5 nMもしくはそれ未満、約0.1 nMもしくはそれ未満、約0.01 nMもしくはそれ未満、または約0.001 nMもしくはそれ未満ですらある。

【０１３３】

本発明での使用に好適な抗CD38抗体の非限定的な例には、(a)(i)ヒトB細胞表面抗原特異性がある可変領域およびヒト定常領域を含む2つの同一なキメラ重鎖、ならびに(ii)2つの同一な全(すなわち、非キメラの)ヒト軽鎖を含む、完全で機能的な免疫グロブリン分子；(b)(i)示したような可変領域およびヒト定常領域を含む2つの同一なキメラ重鎖、ならびに(ii)2つの同一な全(すなわち、非キメラの)非ヒト軽鎖を含む、完全で機能的な免疫グロブリン分子；(c)一価抗体、すなわち、(i)示したような可変領域、およびヒト定常領域を含む2つの同一なキメラ重鎖、ならびに(ii)その一方のみが重鎖の可変領域と同じ特異性を有する、2つの異なる軽鎖を含む、完全で機能的な免疫グロブリン分子が含まれる。結果として得られる抗体分子は、その一方の末端にのみ結合し、それゆえに二価結合をすることができない。別の例示として、本発明によって提供される免疫グロブリン関連ペプチドには、以下が含まれると言ってもよい：(a)免疫グロブリン分子全体；(b)scFv；(c)モノクローナル抗体；(d)ヒト抗体；(e)キメラ抗体；(f)ヒト化抗体；(g)Fab断片；(h)Fab'断片；(i)$F(ab')_2$断片；(j)Fv分子；および(k)ジスルフィド連結したFv分子。

【０１３４】

ある態様において、本発明で用いる抗体はポリクローナル抗体である。ある態様におい

て、本発明で用いる抗体モノクローナル抗体である。さらなる態様において、本発明で用いる抗体はヒトモノクローナル抗体である。別のさらなる態様において、本発明で用いる抗体はヒト化抗体である。別のさらなる態様において、本発明で用いる抗体はキメラ抗体である。別のさらなる態様において、本発明で用いる抗体は、全体にヒトとは異なる哺乳動物種が起源であるモノクローナル抗体である。さらなる態様において、本発明で用いる抗体は完全にマウスのモノクローナル抗体である。

【０１３５】

ある態様において、本発明で用いる抗体は、真核細胞内でグリコシル化されている。別の態様において、本発明で用いる抗体は、放射性同位体を付着するためのキレート剤リンカーをさらに含む。さらなる態様において、本発明で用いる抗体は、実質的に単離された形態にある。

【０１３６】

モノクローナル抗体は、均一な構造および特異性を有する均質な抗体集団を含む組成物を指す。典型的には、モノクローナル抗体は、実質的に均質な抗体から得られる抗体であり、すなわち、個々の抗体は少量で存在し得る起こり得る天然の突然変異を除いて同一である集団を含む。モノクローナル抗体は極めて特異的であり、かつ各々のモノクローナル抗体は典型的には単一のエピトープに対しており、それは異なるエピトープに対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的である。抗体がモノクローナルであるということは、任意の特定の方法による抗体の産生が必要とされると解されるべきではない。例えば、本発明のモノクローナル抗体を、最初にKohler et al., Nature 256, 495(1975)によって記載されたハイブリドーマ法によって産生してもよく、または組み換えDNA法によって産生してもよい。また、モノクローナル抗体を、例えば、Clackson et al., Nature 352, 624-628(1991)およびMarks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597(1991)に記載された技術を用いてファージ抗体ライブラリーから単離してもよい。

【０１３７】

モノクローナル抗体を任意の好適な源から得てもよい。したがって、例えば、モノクローナル抗体を、例えば、表面上に抗原を発現する細胞の形態にある関心対象の抗原か、または関心対象の抗原をコードする核酸で免疫化したマウスから得られるマウス脾臓B細胞から調製したハイブリドーマから得てもよい。また、モノクローナル抗体を、免疫化したヒトまたはラット、イヌ、霊長類などのような非ヒト哺乳動物の抗体発現細胞に由来するハイブリドーマから得てもよい。

【０１３８】

あるいは、クローン化した抗体遺伝子を、微生物などの原核細胞、例えば単鎖Fv抗体の産生用の大腸菌(E.coli)、藻類、および昆虫細胞を含む、その他の発現系で発現させることができる。さらに、抗体を、トランスジェニック非ヒト動物中で、例えばヒツジおよびウサギ由来の乳、もしくはメンドリ由来の卵などで、またはトランスジェニック植物中で産生することができる。例えば、Verma, R., et al., J. Immunol. Meth. 216, 165-181(1998)；Pollock, et al., J. Immunol. Meth. 231, 147-157(1999)；およびFischer, R., et al., Biol. Chem. 380, 825-839(1999)を参照されたい。

【０１３９】

ある態様において、CD38に対するヒトモノクローナル抗体を、マウス系ではなくヒト免疫系の一部を持つトランスジェニックまたはトランスクロモソーマルのマウスを用いて作製してもよい。そのようなトランスジェニックおよびトランスクロモソミック(transchromosomic)マウスは、それぞれ、本明細書でHuMAbマウスおよびKMマウスと称されるマウスを含み、かつ本明細書で「トランスジェニックマウス」と総称される。そのようなマウスで作製されたヒトモノクローナル抗体をHuMabと略してもよい。

【０１４０】

HuMAbマウスは、内在性のμおよびκ鎖座を不活性化する標的突然変異と共に、再配置されていないヒト重(μおよびγ)鎖ならびにκ軽鎖の免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子小座(miniloci)を含む(Lonberg, N. et al., Nature 368, 856-8

59(1994))。したがって、マウスはマウスIgMまたはκの発現の低下を示し、かつ免疫化に応答して、導入されたヒト重鎖および軽鎖トランスジーンは、クラススイッチングおよび体細胞突然変異を経て高親和性のヒトIgG、κモノクローナル抗体を生み出す(Lonberg, N. et al.(1994)、前記；Lonberg, N. Handbook of Experimental Pharmacology 113, 49-101(1994)、Lonberg, N. and Huszar, D., Intern. Rev. Immunol. Vol. 13 65-93(1995)、およびHarding, F. and Lonberg, N. Ann. N.Y. Acad. Sci 764 536-546(1995)に概説されている)。HuMAbマウスの調製は、Taylor, L. et al., Nucleic Acids Research 20, 6287-6295(1992)、Chen, J. et al., International Immunology 5, 647-656(1993)、Tuaillon et al., J. Immunol. 152, 2912-2920(1994)、Taylor, L. et al., International Immunology 6, 579-591(1994)、Fishwild, D. et al., Nature Biotechnology 14, 845-851(1996)に詳細に記載されている。米国特許第5,545,806号、米国特許第5,569,825号、米国特許第5,625,126号、米国特許第5,633,425号、米国特許第5,789,650号、米国特許第5,877,397号、米国特許第5,661,016号、米国特許第5,814,318号、米国特許第5,874,299号、米国特許第5,770,429号、米国特許第5,545,807号、国際公開公報第98/24884号、国際公開公報第94/25585号、国際公開公報第93/1227号、国際公開公報第92/22645号、国際公開公報第92/03918号、および国際公開公報第01/09187号も参照されたい。

【０１４１】

HCo7マウスは、それらの内在性軽鎖(カッパ)遺伝子におけるJKD破壊(Chen et al., EMBO J. 12, 821-830(1993)に記載されたような)、それらの内在性重鎖遺伝子におけるCMD破壊(国際公開公報第01/14424号の実施例1に記載されたような)、KCo5ヒトカッパ軽鎖トランスジーン(Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851(1996)に記載されたような)、およびHCo7ヒト重鎖トランスジーン(米国特許第5,770,429号に記載されたような)を有する。

【０１４２】

HCo12マウスは、それらの内在性軽鎖(カッパ)遺伝子におけるJKD破壊(Chen et al., EMBO J. 12, 821-830(1993)に記載されたような)、それらの内在性重鎖遺伝子におけるCMD破壊(国際公開公報第01/14424号の実施例1に記載されたような)、KCo5ヒトカッパ軽鎖トランスジーン(Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851(1996)に記載されたような)、およびHCo12ヒト重鎖トランスジーン(国際公開公報第01/14424号の実施例2に記載されたような)を有する。KMマウス系統では、内在性のマウスカッパ軽鎖遺伝子は、Chen et al., ENBO J. 12, 811-820(1993)に記載されたようにホモ接合性に破壊され、かつ内在性のマウス重鎖遺伝子は、国際公開公報第01/01987号の実施例1に記載されたようにホモ接合性に破壊されている。このマウス系統は、Fishwild et al., Nature Biotechnology 14, 845-851(1996)に記載されたような、ヒトカッパ軽鎖トランスジーン、KCo5を持つ。このマウス系統はまた、国際公開公報第02/43478号に記載されたような第14番染色体断片hCF(SC20)から構成されるヒト重鎖トランスクロモソームを持つ。

【０１４３】

KMマウスは、ヒト重鎖トランスクロモソームおよびヒトカッパ軽鎖トランスジーンを含む。マウスの免疫化によって、マウス免疫グロブリンではなくヒト免疫グロブリンの産生がもたらされるように、内在性のマウス重鎖および軽鎖遺伝子もKMマウスにおいて破壊されている。ヒト免疫グロブリンを作製するためのKMマウスの構築およびそれらの使用は、国際公開公報第02/43478号に詳細に記載されている。これらのトランスジェニックマウス由来の脾臓細胞を用いて、周知の技術によりヒトモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを作製してもよい。

【０１４４】

本発明で用いるヒトモノクローナルもしくはポリクローナル抗体、または本発明で用いるその他の種が起源である抗体はまた、関心対象の免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列についてトランスジェニックである別の非ヒト哺乳動物または植物の作製ならびにそこからの回収可能な形態での抗体の産生を通じて、トランスジェニックで作製してもよい。哺乳動物でのトランスジェニック産生に関連して、抗体を、ヤギ、ウシ、またはその他の哺乳

動物の乳で産生し、かつヤギ、ウシ、またはその他の哺乳動物の乳から回収してもよい。例えば、米国特許第5,827,690号、米国特許第5,756,687号、米国特許第5,750,172号、および米国特許第5,741,957号を参照されたい。

【０１４５】

さらに、本発明で用いるヒト抗体または本発明で用いるその他の種由来の抗体を、当技術分野において周知の技術を用いて、ファージディスプレイ、レトロウイルスディスプレイ、リボソームディスプレイ、およびその他の技術を含むが、これらに限定されるわけではない、ディスプレイ型の技術を通じて作製してもよく、結果として得られる分子を、そのような技術が当技術分野において周知であるので、親和性成熟などの、さらなる成熟に供してもよい(例えばHoogenboom et al., J. Mol. Biol. 227, 381(1991)(ファージディスプレイ)、Vaughan et al., Nature Biotech 14, 309(1996)(ファージディスプレイ)、Hanes and Plucthau, PNAS USA 94, 4937-4942(1997)(リボソームディスプレイ)、Parmley and Smith, Gene 73, 305-318(1988)(ファージディスプレイ)、Scott TIBS 17, 241-245(1992)、Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382(1990)、Russel et al., Nucl. Acids Research 21, 1081-1085(1993)、Hoogenboom et al., Immunol. Reviews 130, 43-68(1992)、Chiswell and McCafferty TIBTECH 10, 80-84(1992)、および米国特許第5,733,743号参照)。ディスプレイ技術を利用してヒトのものではない抗体を産生する場合、そのような抗体を、例えば本明細書中の別の場所に記載したように、ヒト化してもよい。

【０１４６】

ヒト化抗体の作り方の例を、例えば米国特許第6,054,297号、米国特許第5,886,152号、および米国特許第5,877,293号に見出すことが可能である。また、キメラ免疫グロブリン遺伝子の構築用のIg cDNAの使用も当技術分野において公知である(例えば、Liu et al., PNAS USA 84, 3439(1987)およびJ.Immunol. 139, 3521(1987)参照)。

【０１４７】

抗CD38抗体を、ヒトリンパ球に由来するmRNAから調製したヒト$V_L$および$V_H$ cDNAで作製し得る、scFvファージディスプレイライブラリーなどの、組換えコンビナトリアル抗体ライブラリーから回収してもよい。そのようなライブラリーを調製しかつスクリーニングするための方法は当技術分野において公知である。ファージディスプレイライブラリーを作製するための多くの市販のキットがある。抗体ディスプレイライブラリーを作製しかつスクリーニングする際に使用し得るその他の方法および試薬もある(例えば米国特許第5,223,409号、国際公開公報第92/18619号、国際公開公報第91/17271号、国際公開公報第92/20791号、国際公開公報第92/15679号、国際公開公報第93/01288号、国際公開公報第92/01047号、国際公開公報第92/09690号、Fuchs et al., Bio/Technology 9, 1370-1372(1991)、Hay et al., Hum. Antibod. Hybridomas 3, 81-85(1992)、Huse et al., Science 246, 1275-1281(1989)、McCafferty et al., Nature 348, 552-554(1990)、Griffiths et al., EMBO J 12, 725-734(1993)、Hawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896(1992)、Clackson et al., Nature 352, 624-628(1991)、Gram et al., PNAS USA 89, 3576-3580(1992)、Garrad et al., Bio/Technology 9, 1373-1377(1991)、Hoogenboom et al., Nuc Acid Res 19, 4133-4137(1991)、およびBarbas et al., PNAS USA 88, 7978-7982(1991)参照)。好適な$V_L$および$V_H$の核酸配列を任意の適当な方法を用いて選択してもよい。例えば、$V_L$および$V_H$の核酸を、国際公開公報第93/06213号に記載されたエピトープインプリンティング法を利用することによって選択してもよい。scFvライブラリーなどの、抗体ライブラリーを、例えば国際公開公報第92/01047号、McCafferty et al., Nature 348, 552-554(1990)、およびGriffiths et al., EMBO J 12, 725-734(1993)に記載された方法のような、公知でかつ好適な方法を(抗原としてのヒトCD38含有ペプチドと共に)用いて調製しかつスクリーニングしてもよい。そのような抗体ライブラリーは、より包括的な免疫応答を与えるために；免疫原性ペプチド、小分子、その他の抗CD38抗体などのためのスクリーニング法(例えば、競合アッセイによる)における道具として；ならびに／または診断的な方法および組成物における(例えば、任意でその他の抗体と関連したそのような抗体のパネルを含む免疫アッセイチップを標準的な技術によって調製してもよい)、治療的に使用し得る本

発明の特色である。ひとたび最初のヒト$V_L$および$V_H$セグメントが選択されれば、最初に選択された$V_L$および$V_H$セグメントの異なる対をCD38含有ペプチドの結合についてスクリーニングする、「ミックス・アンド・マッチ」実験を行ない、望ましい$V_L/V_H$対の組み合わせを選択してもよい。例えば、ペプチドの反応性を、ELISAまたはその他の好適なエピトープ解析法によって決定してもよい(そのような技術および原理の考察のために、例えばScott, J.K. and Smith, G.P. Science 249, 386-390(1990)、Cwirla et al., PNAS USA 87, 6378-6382(1990)、Felici et al., J. Mol. Biol. 222, 301-310(1991)、およびKuwabara et al., Nature Biotechnology 15, 74-78(1997)を参照されたい)。抗体を、抗原に対するそれらの親和性によっておよび／または抗原からの解離に関するそれらの反応速度論(解離速度)によって選択してもよい(例えばHawkins et al., J. Mol. Biol. 226, 889-896(1992)参照)。

【０１４８】

また、関心対象の抗原を、マイクロタイタープレートまたはビーズなどの、固体表面上に固定化するパニング技術を用いて、ヒト単鎖Fv(scFv)およびFab抗体断片などの、高親和性抗体ペプチドをそのようなライブラリーから単離してもよい(例えばBarbas and Burton, Trends. Biotechnol. 14, 230-234(1996)およびAujame et al., Hum. Antibodies 8, 155-68(1997)参照)。大きなナイーブライブラリーのファージディスプレイもまた、免疫化を伴わないで直接的にヒト抗体を単離することを可能にする(例えばHaard et al., J. Biol. Chem. 274(26), 18218-18230(1999)参照)。

【０１４９】

本発明での使用に好適な抗体を、補体固定の能力を提供するか、またはしないかのそれらの能力に基づいて選択してもよい。以下を含むが、これらに限定されるわけではない、補体固定およびCDCの能力がある多くの抗体のアイソタイプがある：マウスIgM、マウスIgG2a、マウスIgG2b、マウスIgG3、ヒトIgM、ヒトIgG1、およびヒトIgG3。含まれないアイソタイプには、ヒトIgG2およびヒトIgG4が含まれるが、これらに限定されるわけではない。アイソタイプ決定ならびに抗体の補体固定およびCDCの機能的特徴を改変するためのその他の方法は、当技術分野において公知である。

【０１５０】

本発明で用いる抗CD38抗体を、任意の好適な種類の細胞または動物における組換え発現によって調製してもよい。抗体産生のための好適な方法が当技術分野において公知であり、かつ例えばHarlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.,(1988)、Harlow and Lane: Using Antibodies: A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Laboratory Press(1999))、米国特許第4,376,110号、およびAusubel et al., 編, Current Protocols In Molecular Biology, Greene Publishing Assoc. and Wiley InterScience N. Y.,(1987, 1992)に記載された方法を含む。最初にKohler et al., Nature 256, 495(1975)によって記載されたハイブリドーマ法を用いるか、またはその他の周知の、後に開発された方法によって、モノクローナル抗体を作ってもよい(例えば、Goding, Monoclonal Antibodies: Principle and Practice, 59-103頁(Academic Press, 1986)参照)。本発明の抗CD38抗体の産生に有用なハイブリドーマもまた本発明によって提供される。任意の好適な種類の骨髄腫、異種骨髄腫、ホブラストイド(phoblastoid)細胞、形質細胞腫、またはその他のその同等物、および任意の好適な種類の抗体発現細胞を用いて、化学的融合、電気的融合、または任意のその他の好適な技術によって、そのようなハイブリドーマを形成してもよい。また、形質転換された不死化B細胞が、本発明の抗体を効率的に産生するために用いられてもよく、かつ本発明によっても提供される。そのような細胞を、エプスタインバーウイルス、または形質転換遺伝子による形質転換などの、標準的な技術によって産生してもよい。(例えば、Kennett R. H.らによって編集されたMonoclonal Antibodies, Plenum Press, N. Y. 1980, pp 19-33の「Continuously Proliferating Human Cell Lines Synthesizing Antibody of Predetermined Specificity」, Zurawaki, V. R. et al.を参照されたい。)

【０１５１】

抗CD38抗体をコードする外来性核酸を含む組換え細胞を、任意の好適な技術(例えば、リン酸カルシウム沈殿で促進されるトランスフェクション、受容体を介する標的化およびトランスフェクション、バイオリスティック(biolistic)送達、エレクトロポレーション、デキストランを介するトランスフェクション、リポソームを介する形質転換、プロトプラスト融合、直接的なマイクロインジェクションなどによって細胞内に送達される抗体をコードする配列を含む、裸のDNAプラスミドベクター、ウイルスベクター、侵襲的な細菌細胞ベクター、またはその他の全細胞ベクターなどによるトランスフェクション／形質転換)によって調製してもよい。細胞を形質転換／トランスフェクションする方法は、当技術分野において周知である(例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press,(第2版, 1989および第3版, 2001)ならびにF. Ausubel et al., 編, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York(1987)参照)。そのような組換え細胞は、本発明の特色である。

【０１５２】

組換えタンパク質発現の宿主として利用可能な細胞株は、当技術分野において周知であり、かつAmerican Type Culture Collection(ATCC)から入手可能な多くの不死化細胞株を含む。これらには、とりわけ、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、NSO、SP2細胞、HeLa細胞、ベビーハムスター腎臓(BHK)細胞、サル腎臓細胞(COS)、ヒト肝細胞癌細胞(例えば、Hep G2)、A549細胞、および多くのその他の細胞株が含まれる。使用し得るその他の細胞株は、Sf9細胞などの、昆虫細胞株である。抗CD38抗体などの、タンパク質をコードする核酸(または核酸を含むベクター)を哺乳動物の宿主細胞に導入する場合、宿主細胞でのタンパク質の発現を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによるかまたは宿主細胞が成長する培養培地中へのタンパク質の分泌によって、タンパク質を産生してもよい。抗体を、標準的なタンパク質精製法を用いて、培養培地から回収してもよい。また、分泌シグナルなしで直接発現させる場合、抗体を宿主細胞ライセートから回収してもよい。

【０１５３】

抗CD38抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳動物の宿主に導入する場合、宿主細胞での抗体の発現および宿主細胞が成長する培養培地中への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間、宿主細胞を培養することによって、抗体を産生する。細胞培養、細胞ライセート、および(例えば、抗CD38抗体を産生するトランスジェニック動物の腹水からの)動物由来の抗体の精製を、例えば、免疫親和性カラム精製；硫酸沈殿；クロマトフォーカシング；調製的SDS-PAGEなどを含む当技術分野において公知の任意の数の好適な技術の適用によって達成してもよい。

【０１５４】

また、本発明のヒトモノクローナル抗体を、従来のモノクローナル抗体の方法論を含む、種々のその他の技術、例えば、Kohler and Milstein, Nature 256, 495(1975)の標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術によって産生してもよい。また、例えば、ヒト抗体遺伝子のライブラリーを用いたファージディスプレイ技術などの、モノクローナル抗体を産生するためのその他の技術を利用してもよい。ある態様において、本発明の抗CD38抗体を、マウス系で作製されたハイブリドーマの使用によって産生する。マウスでのハイブリドーマ産生は、非常によく確立された手順である。免疫プロトコルおよび融合用の免疫化脾臓細胞の単離のための技術は、当技術分野において公知である。融合パートナー(例えば、マウス骨髄腫細胞)および融合手順もまた公知である。

【０１５５】

CD38に対する完全にヒトのモノクローナル抗体を作製するために、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含むトランスジェニックまたはトランスクロモソーマルマウス(例えば、HCo12、HCo7、またはKMマウス)を、例えば、Lonberg et al.,(1994), 前記、Fishwild et al., (1996), 前記、および国際公開公報第98/24884号によって記載されたように、CD38抗原の濃縮調製物および／またはCD38を発現する細胞で免疫化してもよい。あるいは、ヒトCD38

をコードするDNAでマウスを免疫化してもよい。最初の注入時に、マウスは6～16週齢であってもよい。例えば、CD38抗原の濃縮調製物(5～50μg)を用いて、HuMAbマウスを腹腔内で免疫化してもよい。また、精製または濃縮されたCD38抗原の調製物を用いる免疫化によって抗体が結果的に生じない事象においては、免疫応答を促進するために、例えば、細胞株などの、CD38を発現する細胞で免疫化してもよい。

【０１５６】

様々な抗原での蓄積経験により、最初に完全フロイントアジュバント中のCD38発現細胞で腹腔内(i.p.)または皮下(s.c.)に免疫化し、次いでPBS中のCD38発現細胞で隔週に(合計10回まで)i.p.で免疫化した場合、HuMAbトランスジェニックマウスが最も良く応答することが示されている。免疫化プロトコルの間ずっと、免疫反応を、眼窩後採血によって得られる血漿試料でモニターしてもよい。血漿をFACS解析でスクリーニングしてもよく、十分な力価の抗CD38ヒト免疫グロブリンを有するマウスを融合に用いてもよい。実施例4のためのCD38発現細胞で静脈内に、かつ屠殺および脾臓の除去の4および3日前に、マウスをブーストしてもよい。

【０１５７】

ヒトCD38に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫化マウス由来の脾臓細胞およびリンパ節細胞を単離し、マウス骨髄腫細胞株などの、適当な不死化細胞株に融合してもよい。その後、結果として得られるハイブリドーマを、抗原特異的な抗体の産生についてスクリーニングしてもよい。例えば、免疫化マウス由来の脾臓リンパ球の1細胞懸濁液を、50％ PEG(w/v)でSP2/0という非分泌性のマウス骨髄腫細胞(ATCC, CRL 1581)に融合してもよい。細胞を、平底マイクロタイタープレート中にウェル当たりおよそ1×105でプレーティングし、その後、通常の試薬のほかに10％ 胎仔クローン血清、5～10％ origenハイブリドーマクローニング因子(IGEN)、および1×HAT(Sigma)を含む選択培地中で2週間インキュベーションしてもよい。およそ2週間後、HATをHTで置き換えた培地中で細胞を培養してもよい。その後、個々のウェルを、ヒトカッパ軽鎖を含む抗体についてはELISAで、CD38特異性についてはCD38発現細胞を用いたFACS解析でスクリーニングしてもよい。ひとたび大規模なハイブリドーマの成長が起これば、通常10～14日後に、培地を観察してもよい。抗体分泌ハイブリドーマを再プレーティングし、再度スクリーニングしてもよく、ヒトIgGが依然として陽性である場合には、抗CD38モノクローナル抗体を限界希釈によって少なくとも2度サブクローニングしてもよい。その後、安定なサブクローンをインビトロで培養し、特徴解析のために組織培養培地中で抗体を作製してもよい。

【０１５８】

また、本発明のヒト抗体を、例えば、当技術分野において周知であるような組換えDNA技術および遺伝子トランスフェクション法の組み合わせを用いて宿主細胞トランスフェクトーマで産生してもよく、例えばMorrison, S., Science 229, 1202(1985)を参照されたい。

【０１５９】

例えば、抗体、またはその抗体断片を発現させるために、部分長または全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAを、標準的な分子生物学技術(例えばPCR増幅、部位特異的突然変異生成)によって得てもよく、遺伝子が転写および翻訳制御配列と機能的に連結されるように発現ベクターに挿入してもよい。この文脈において、「機能的に連結される」という用語は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというそれらの意図された機能を果たすように、抗体遺伝子がベクターにライゲートされるということを意味することが意図されている。発現ベクターおよび発現制御配列を、使用される発現宿主細胞と適合するように選ぶ。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子を別々のベクターに挿入してもよく、またはより典型的には、両方の遺伝子を同じ発現ベクターに挿入してもよい。抗体遺伝子を、標準的な方法(例えば、抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的な制限部位のライゲーション、または制限部位が存在しない場合のブラント末端ライゲーション)によって発現ベクターに挿入してもよい。$V_H$セグメントがベクタ

ー内のCHセグメントに機能的に連結されかつ$V_L$セグメントがベクター内のCLセグメントに機能的に連結されるように、本明細書で記載した抗体の軽鎖および重鎖の可変領域を用いて、既に所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域をコードしている発現ベクターにそれらを挿入することによって任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を創り出してもよい。さらにまたは代わりに、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を容易にするシグナルペプチドをコードしてもよい。シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、抗体鎖遺伝子をベクターにクローニングしてもよい。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドであってもよくまたは異種シグナルペプチド(すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド)であってもよい。

【０１６０】

抗体鎖遺伝子に加えて、組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を可能にしかつ制御する調節配列を持つ。さらに、組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列(例えば、複製の起点)および選択可能マーカー遺伝子などの、追加の配列を持ってもよい。選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする(例えば米国特許第4,399,216号、米国特許第4,634,665号、および米国特許第5,179,017号参照)。例えば、典型的に、選択可能マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞に対して、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキサートなどの、薬物に対する抵抗性を付与する。選択可能マーカー遺伝子の例として、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子(メトトレキサート選択／増幅と共にdhfr宿主細胞で使用するため)およびneo遺伝子(G418選択用)が含まれる。

【０１６１】

軽鎖および重鎖の発現のために、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを、標準的な技術によって宿主細胞にトランスフェクトする。宿主細胞は、原核生物かまたは哺乳動物などの、真核生物の宿主細胞であってもよい。例えば、抗原結合断片を原核生物の宿主細胞で発現させてもよく、全長抗体を真核生物の宿主細胞で発現させてもよい。

【０１６２】

ある態様において、抗体を、哺乳動物宿主細胞などの、真核生物細胞で発現させる。本発明の組換え抗体を発現させるための哺乳動物宿主細胞の例として、CHO細胞(例えばR. J. Kaufman and P. A. Sharp, Mol. Biol. 159, 601-621(1982)に記載されたような、DHFR選択可能マーカーと共に用いられる、Urlaub and Chasin, PNAS USA 77, 4216-4220(1980)に記載された、dhfr-CHOを含む)、NS/0骨髄腫細胞、COS細胞、HEK293細胞、およびSP2.0細胞が含まれる。特に、NS/0骨髄腫細胞の使用に関して、発現系の別の例は、国際公開公報第87/04462号、国際公開公報第89/01036号、および欧州特許第338,841号に開示されているGS(glutamine synthetase)遺伝子発現系である。

【０１６３】

抗体遺伝子を、微生物などの、原核細胞、例えばscFv抗体の産生のための大腸菌、藻類、および昆虫細胞を含む、その他の発現系で発現させてもよい。さらに、抗体を、ヒツジおよびウサギ由来の乳の中もしくはメンドリ由来の卵の中など、トランスジェニック非ヒト動物中か、またはトランスジェニック植物中で産生してもよい。例えばVerma, R. et al., J. Immunol. Meth. 216, 165-181(1998)、Pollock et al., J. Immunol. Meth. 231, 147-157(1999)、およびFischer, R. et al., Biol. Chem. 380, 825-839(1999)を参照されたい。

【０１６４】

二重特異性および多重特異性抗体

本発明のある態様において、使用する抗体を誘導体化するかまたは別の機能性分子、例えば別のペプチド(Fab'断片など)もしくはタンパク質に連結し、複数の結合部位または標的エピトープに結合する二重特異性または多重特異性分子を作製してもよい。例えば、本発明で用いる抗体は、(例えば化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性の会合によるか、または別の方法で)別の抗体、ペプチド、または結合ミメティックなどの、1つま

たは複数のその他の結合分子に機能的に連結されてもよい。

【０１６５】

したがって、本発明には、CD38に対する少なくとも1つの第一の結合特異性および第二の標的エピトープに対する第二の結合特異性を含む二重特異性および多重特異性分子が含まれる。本発明のある態様において、第二の標的エピトープは、Fc受容体、例えばヒトFcγRI(CD64)もしくはヒトFcα受容体(CD89)、またはT細胞受容体、例えばCD3である。ある態様において、本発明は、FcγR、FcαR、またはFcεR発現エフェクター細胞(例えば、単球、マクロファージ、または多形核細胞(PMN))、およびCD38を発現する標的細胞の両方に結合することができる二重特異性および多重特異性の分子を提供する。これらの二重特異性および多重特異性の分子は、CD38発現細胞をエフェクター細胞に標的化し、かつCD38発現細胞の食作用、抗体依存的な細胞性細胞毒性(ADCC)、サイトカイン放出、またはスーパーオキシドアニオンの発生などの、Fc受容体を介するエフェクター細胞活性を誘発する。

【０１６６】

ある態様において、本発明で用いる二重特異性および多重特異性の分子は、結合特異性として、例えば、Fab、Fab'、F(ab')2、Fv、またはscFvを含む、少なくとも1つのさらなる抗体を含む。さらなる抗体はまた、軽鎖もしくは重鎖のダイマーか、またはLadner et al.に、米国特許第4,946,778号に記載されたようなFvもしくは単鎖構築物などのその任意の最小断片であってもよい。抗体はまた、米国特許第2003/0118592号および米国特許第2003/0133939号に開示されたような結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質であってもよい。

【０１６７】

ある態様において、Fc受容体に対する結合特異性はヒトモノクローナル抗体によって与えられ、その結合はヒト免疫グロブリンG(IgG)によって阻止されない。本明細書で用いる場合、「IgG受容体」という用語は、第1番染色体に位置する8つのγ鎖遺伝子のいずれかを指す。これらの遺伝子は、3つのFc*受容体クラス：FcγRI(CD64)、FcγRII(CD32)、およびFcγRIII(CD16)にグループ分けされる合計12の膜貫通型または可溶型の受容体アイソフォームをコードする。ある態様において、Fcγ受容体は、ヒト高親和性FcγRIである。これらのモノクローナル抗体の産生および特徴解析は、Fanger et al.によって、国際公開公報第88/00052号および米国特許第4,954,617号に記載されている。これらの抗体は、受容体のFcγ結合部位とは異なる部位でFcγRI、FcγRII、またはFcγRIIIのエピトープに結合し、したがって、それらの結合は生理学的レベルのIgGによって実質的に阻止されない。本発明で有用な特異的抗FcγRI抗体は、mAb 22、mAb 32、mAb 44、mAb 62、およびmAb 197である。その他の態様において、抗Fcγ受容体抗体は、ヒト化形態のmAb 22(H22)である。H22抗体の産生および特徴解析は、Graziano, R. F. et al., J. Immunol. 155(10), 4996-5002(1995)および国際公開公報第94/10332号に記載されている。H22抗体産生細胞株は、HA022CL1という名称の下で1992年11月4日にAmerican Type Culture Collectionに寄託され、CRL 11177というアクセッション番号を有する。

【０１６８】

ある態様において、Fc受容体に対する結合特異性は、ヒトIgA受容体、例えば、Fcα受容体(FcαI(CD89))に結合する抗体によって与えられ、その結合は、ある態様において、ヒト免疫グロブリンA(IgA)によって阻止されない。「IgA受容体」という用語は、第19番染色体上に位置する1つのα-遺伝子(FcαRI)の遺伝子産物を含むことが意図されている。この遺伝子は、幾つかの選択的にスプライシングされる55～110kDaの膜貫通アイソフォームをコードすることが知られている。FcαRI(CD89)は、単球／マクロファージ、好酸性、および好中性の顆粒球上に構成的に発現しているが、非エフェクター細胞集団上には発現していない。FcαRIは、IgA1およびIgA2の両方に対する中間の親和性を有しており、親和性はG-CSFまたはGM-CSFなどのサイトカインへの曝露によって増加する(Morton H. C. et al., Critical Reviews in Immunology 16, 423-440(1996))。IgAリガンド結合ドメインの外側でFcαRIと結合する、A3、A59、A62、およびA77として同定された、4つのFcαRI特異的モノクローナル抗体が記載されている(Monteiro, R. C. et al., J. Immunol. 148,

1764(1992))。

【０１６９】

それらが(1)主に免疫エフェクター細胞、例えば、単球、PMN、マクロファージ、および樹状細胞上で発現しており；(2)高レベルで発現しており(例えば細胞当たり5,000～100,000個)；(3)細胞毒性活性(例えば、ADCC、食作用)のメディエーターであり；かつ(4)それらに標的される、自己抗原を含む、抗原の抗原提示の増強を仲介するので、FcαRI、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIII、とりわけFcγRIIおよびFcγRIIIは、本発明で使用するためのトリガー受容体の例である。

【０１７０】

例示的な二重特異性抗体分子は、(i)一方がCD38に対する特異性、もう一方が第二の標的に対する特異性を有する一緒にコンジュゲートされた2つの抗体、(ii)CD38に特異的な1つの鎖および第二の分子に特異的な第二の鎖を有する1つの抗体、ならびに(iii)CD38および第二の分子に対する特異性を有する単鎖抗体を含む。典型的には、第二の標的／第二の分子は、CD38以外の分子である。ある態様において、第二の分子は、癌胎児性抗原(CEA)、前立腺特異的抗原(PSA)、RAGE(腎性抗原)、α-フェトタンパク質、CAMEL(メラノーマ上のCTLによって認識される抗原)、CT抗原(例えば、MAGE-B5、-B6、-C2、-C3、およびD；Mage-12；CT10；NY-ESO-1、SSX-2、GAGE、BAGE、MAGE、ならびにSAGEなど)、ムチン抗原(例えば、MUC1、ムチン-CA125など)、ガングリオシド抗原、チロシナーゼ、gp75、C-myc、Mart1、MelanA、MUM-1、MUM-2、MUM-3、HLA-B7、ならびにEp-CAMなどの癌抗原／腫瘍関連抗原である。ある態様において、第二の分子は、α5β3インテグリンなどの、癌関連インテグリンである。ある態様において、第二の分子は、血管内皮成長因子(VEGF)、繊維芽細胞成長因子(FGF)、上皮成長因子(EGF)、上皮成長因子受容体(EGFR)、アンジオジェニン、およびその受容体、特に癌の進行と関連する受容体(例えばHER1～HER4受容体のうちの1つ)などの、血管形成因子またはその他の癌関連成長因子である。本明細書で考察するその他の癌進行関連タンパク質もまた、好適な第二の分子である可能性がある。ある態様において、第二の分子は、CD138などの多発性骨髄腫細胞の表面上に発現した分子である。

【０１７１】

ある態様において、本発明で用いる二重特異性抗体は、ダイアボディである。

【０１７２】

本発明で用いる二重特異性および多重特異性抗体を、化学的技術(例えばD. M. Kranz et al., PNAS USA 78, 5807(1981)参照)、「ポリドーマ」技術(米国特許第4,474,893号参照)、または組換えDNA技術を用いて、作ってもよい。

【０１７３】

コンジュゲート

ある態様において、本発明は、細胞毒素、化学療法薬物、免疫抑制剤、または放射性同位体などの、治療的部分にコンジュゲートされたCD38抗体を用いる。そのようなコンジュゲートを、本明細書では「免疫コンジュゲート」と称する。1つまたは複数の細胞毒素を含む免疫コンジュゲートを「免疫毒素」と称する。

【０１７４】

細胞毒素または細胞毒性薬剤には、細胞にとって有害である(例えば、殺傷する)任意の薬剤が含まれる。当技術分野において周知であるこれらのクラスの薬物、およびそれらの作用の機構の説明については、Goodman et al., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis Of Therapeutics, 第8版, Macmillan Publishing社, 1990を参照されたい。抗体免疫毒素の調製に関連するさらなる技術は、例えばVitetta, Immunol. Today 14, 252(1993)および米国特許第5,194,594号に提供されている。

【０１７５】

本発明に有用な免疫コンジュゲートを形成するための好適な治療薬剤には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、エチジウムブロマイド、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、アクチノ

マイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、代謝拮抗剤(例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリビンなど)、アルキル化薬剤(例えばメクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、およびカルボプラチンなどの、その他のプラチナ誘導体など)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ダウノルビシン(以前はダウノマイシン)、ドキソルビシン、イダルビシン、ミトラマイシン、カリケアミシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン(AMC)など)、ジフテリア毒素ならびに関連分子(例えばジフテリアA鎖ならびにその活性断片およびハイブリッド分子など)、リシン毒素(例えばリシンAまたは脱グリコシル化リシンA鎖毒素など)、コレラ毒素、志賀毒素様毒素(SLT-I、SLT-II、SLT-IIV)、LT毒素、C3毒素、志賀毒素、百日咳毒素、破傷風毒素、大豆Bowman-Birkプロテアーゼ阻害剤、緑膿菌外毒素、アロリン、サポリン、モデクシン、ゼラニン、アブリンA鎖、モデクシンA鎖、アルファ-サルシン、シナアブラギリ(Aleurites fordii)タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ(Phytolacca americana)タンパク質(PAPI、PAPII、およびPAP-S)、ニガウリ(momordica charantia)阻害剤、クルシン、クロチン、サパオナリア オフィシナリス(sapaonaria officinalis)阻害剤、ゼロニン、マイトジェリン、レストリクトシン、フェノマイシン、ならびにエノマイシン毒素が含まれる。本明細書中の別の場所に記載したような抗体と組み合わせて投与し得る、治療薬剤もまた、本発明で用いる抗体へのコンジュゲーションに有用な治療的部分の候補である可能性がある。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を保有するタンパク質またはポリペプチドであってもよい。そのようなタンパク質には、例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、もしくはジフテリア毒素などの、酵素活性のある毒素、もしくはその活性断片；腫瘍壊死因子もしくはインターフェロン-γなどのタンパク質；または、例えば、リンホカイン、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、もしくはその他の成長因子およびミトコンドリアから単離されるアポトーシス誘導タンパク質などの生体応答修飾因子が含まれてもよい。

【０１７６】

抗体のコンジュゲート、およびそのような細胞毒性部分を、種々の二官能性タンパク質カップリング薬剤を用いて作製してもよい。そのような試薬の例として、SPDP、IT、ジメチルアジピミデートHClなどのイミドエステルの二官能性誘導体、ジスクシンイミジルスベリン酸などの活性エステル、グルタルアルデヒドなどのアルデヒド、ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなどのビス-アジド化合物、ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなどのビス-ジアゾニウム誘導体、トリレン2,6-ジイソシアネートなどのジイソシアネート、および1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなどのビス-活性フルオリン化合物、ならびに抗有糸分裂薬剤(例えば、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ドセタキセル、パクリタキセル、およびビノレルビン)が含まれる。

【０１７７】

ある態様において、本発明は、免疫調整サイトカイン、幹細胞成長因子、(TNFαなどのTNFのような)リンホトキシン、または造血因子などの、免疫調整因子にコンジュゲートされた抗CD38抗体を提供する。コンジュゲートとして有用であり得るそのような分子の例として、IL-1、IL-2、IL-3、IL-6、IL-10、IL-12、IL-18、およびIL-21、コロニー刺激因子(例えば顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)および顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)など)、インターフェロン(例えばIFNα、IFNβ、およびIFNγなど)、「S1因子」と名付けられた幹細胞成長因子、エリスロポイエチン、ならびにトロンボポイエチン、その活性断片、その誘導体、その変異体、またはその任意の組み合わせが含まれる。

【０１７８】
そのような治療的部分を、抗体にコンジュゲートするための技術は周知であり、例えばMonoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al.,(編), pp.243-56(Alan R. Liss社 1985)の中のArnon et al.,「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」、Controlled Drug Delivery(第2版), Robinson et al.,(編), pp.623-53(Marcel Dekker社 1987)の中のHellstrom et al.,「Antibodies For Drug Delivery」、Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al.,(編), pp.475-506(1985)の中のThorpe,「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」、Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al.,(編), pp.303-16(Academic Press 1985)の中の「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」、およびThorpe et al.,「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」, Immunol. Rev. 62, 119-58(1982)を参照されたい。

【０１７９】
さらに有用なコンジュゲート置換基には、抗癌レチノイドが含まれる。タキサンコンジュゲート(例えばJaime et al., Anticancer Res. 21(2A), 1119-28(2001)参照)、シスプラチンコンジュゲート、タプシガーギンコンジュゲート、リノール酸コンジュゲート、カリケアミシンコンジュゲート(例えばDamle et al., Curr Opin Pharmacol. 3(4), 386-90(2003)参照)、ドキソルビシンコンジュゲート、ゲルダナマイシンコンジュゲートなどもまた、癌の処置を促進するのに有用である場合がある(一般に、Trail et al., Cancer Immunol Immunother. 52(5), 328-37(2003)参照)。

【０１８０】
製剤化および投与の様式
本発明で用いる薬剤を、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第19版, Gennaro, 編, Mack Publishing社, Easton, PA, 1995に開示されている技術などの従来の技術に従って、薬学的に許容される担体または希釈剤だけでなく、任意のその他の公知のアジュバントおよび賦形剤と共に製剤化してもよい。

【０１８１】
薬学的に許容される担体または希釈剤だけでなく、任意のその他の公知のアジュバントおよび賦形剤も、本発明で用いる選ばれた化合物および選ばれた投与の様式に好適であるべきである。薬学的組成物の担体およびその他の構成要素に対する好適性を、選ばれた化合物または薬学的組成物の所望の生物学的特性に対する顕著な負の影響の欠如(例えば、抗原結合に対する実質的な影響に及ばない(10%またはそれ未満の相対阻害、5%またはそれ未満の相対阻害など))に基づいて決定する。

【０１８２】
本発明で用いる薬学的組成物にはまた、希釈剤、充填剤、塩、緩衝剤、界面活性剤(例えば、Tween-80などの、非イオン性界面活性剤)、安定化剤、安定化剤(例えば、糖もしくは無タンパク質アミノ酸)、防腐剤、組織固定剤、可溶化剤、および／または薬学的組成物中に含まれることに好適なその他の材料が含まれてもよい。

【０１８３】
薬学的組成物中の活性成分の実際の投薬レベルを、患者にとって毒性がない状態で、特定の患者、組成物、および投与の様式について所望の治療応答を達成するのに有効である活性成分の量を得るように変えてもよい。選択される投薬レベルは、利用される特定の組成物、またはそのエステル、塩、もしくはアミドの活性、投与の経路、投与の時間、利用されている特定の化合物の排出の速度、処置の継続期間、利用される特定の組成物と組み合わせて用いられるその他の薬物、化合物、および／または材料、処置されている患者の年齢、性別、体重、状態、全般的な健康および以前の病歴、ならびに医療技術分野において周知の同様の因子を含む、種々の薬物動態学的因子に依存すると考えられる。

【０１８４】

薬学的組成物を任意の好適な経路および様式で投与してもよい。インビボおよびインビトロで本発明の化合物を投与する好適な経路は当技術分野において周知であり、かつ当業者によって選択されることができる。

【０１８５】

本発明で用いる化合物を、経口、経鼻、吸入可能、局所(口腔、経皮、および舌下を含む)、直腸、膣、ならびに／または非経口の経路などの、任意の好適な経路を介して投与してもよい。

【０１８６】

ある態様において、本発明で用いる薬学的組成物の1つまたは複数を、例えば、不活性希釈剤または吸収できる食用担体を用いて経口で投与する。活性成分を、硬殻もしくは軟殻のゼラチンカプセルに封入してもよく、圧縮して錠剤にしてもよく、または対象の食事に直接組み入れてもよい。経口投与に好適である薬学的組成物には、当技術分野において適当であることが知られているような担体を含む、摂取可能な錠剤、口腔錠剤、トローチ、カプセル、エリキシル、懸濁液、シロップ、ウエハースなどが含まれる。経口投与を可能にするために、化合物をその不活性化を防止する材料でコーティングするか、または化合物を該材料と同時に投与する必要がある場合がある。

【０１８７】

ある態様において、本発明で用いる化合物の1つまたは複数を非経口で投与する。

【０１８８】

本明細書で用いる場合の「非経口投与」および「非経口で投与する」という語句は、通常は注射による、腸内および局所への投与以外の投与の様式を意味し、ならびに上皮、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心腔内、皮内、腹腔内、腱内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、頭蓋内、胸腔内、硬膜外、および胸骨内の注射および注入を含む。

【０１８９】

ある態様において、化合物を静脈内または皮下の注射または注入によって投与する。

【０１９０】

ある態様において、本発明で用いる化合物を結晶形態で皮下注射により投与する。Yang et al., PNAS USA, 100(12), 6934-6939(2003)を参照されたい。

【０１９１】

本発明で用いる薬学的組成物を、経口、経鼻、局所(口腔、経皮、および舌下を含む)、直腸、膣、ならびに／または非経口の投与などの、特定の投与の経路用に製剤化してもよい。薬学的組成物を、単位剤形で便宜的に提示してもよくかつ薬学の技術分野において公知の任意の方法によって調製してもよい。単一剤形を生み出すために担体材料と組み合わせ得る活性成分の量は、処置される対象、および投与の特定の様式に応じて変わると考えられる。単一剤形を生成するために担体材料と組み合わせ得る活性成分の量は通常、治療効果をもたらす組成物の量であると考えられる。通常、100パーセントのうち、この量は、活性成分の約0.01％～約99％、例えば、約0.1％～約70％、例えば、約1％～約30％の範囲にまで及ぶと考えられる。

【０１９２】

選択された投与の経路に関わらず、薬学的に許容される塩の形態もしくは好適な水和形態で使用し得る、本発明で用いる化合物、および／または薬学的組成物を、当業者に公知の従来の方法によって、薬学的に許容される剤形に製剤化してもよい。「薬学的に許容される塩」とは、親化合物の所望の生物学的活性を保持しかつ任意の非所望の毒物学的影響を与えない塩を指す(例えばBerge, S. M. et al., J. Pharm. Sci. 66, 1-19(1977)参照)。そのような塩の例として、酸添加塩および塩基添加塩が含まれる。酸添加塩には、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などのような、無毒性の無機酸に由来する塩だけでなく、脂肪族のモノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族のスルホン酸などのような無毒性の有機酸に由来する塩も含まれる。塩基添加塩には、ナトリウム、カリウ

ム、マグネシウム、カルシウムなどのような、アルカリ土類金属に由来する塩だけでなく、N,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどのような、無毒性の有機アミンに由来する塩も含まれる。

【０１９３】

薬学的に許容される担体には、本発明で用いる化合物と生理学的に適合する任意および全ての好適な溶媒、分散剤、コーティング剤、抗菌薬剤および抗真菌薬剤、等張化剤(isotonicity agent)、酸化防止剤、ならびに吸収遅延薬剤などが含まれる。

【０１９４】

薬学的組成物において利用し得る好適な水性および非水性の担体の例として、水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水、エタノール、デキストロース、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびその好適な混合物、オリーブ油、コーン油、ピーナッツ油、綿実油、および胡麻油などの、植物油、カルボキシメチルセルロースコロイド溶液、トラガカントゴム、およびエチルオレアートなどの、注射可能な有機エステル、ならびに／または様々な緩衝剤が含まれる。その他の担体は薬学の技術分野において周知である。

【０１９５】

薬学的に許容される担体には、滅菌注射可能水溶液または分散液および滅菌注射可能溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末が含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。任意の従来の媒質または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、薬学的組成物におけるその使用が包含される。

【０１９６】

適切な流動性を、例えば、レシチンなどの、コーティング材料の使用によって、分散液の場合には要求される粒子サイズの維持によって、およびサーファクタントの使用によって維持してもよい。

【０１９７】

本発明で用いる薬剤を含む薬学的組成物はまた、薬学的に許容される酸化防止剤、例えば(1)アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、重亜硫酸ナトリウムなどのような、水溶性酸化防止剤；(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、プロピルガレート、アルファ-トコフェロールなどのような、油溶性酸化防止剤；および(3)クエン酸、エチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などのような、金属キレート薬剤を含んでもよい。

【０１９８】

薬学的組成物はまた、糖、マンニトール、ソルビトール、グリセロールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムなどの、等張化剤を組成物中に含んでもよい。

【０１９９】

薬学的に許容される希釈剤には生理食塩水および水性緩衝剤溶液が含まれる。

【０２００】

本発明で用いる薬学的組成物はまた、薬学的組成物の貯蔵寿命または有効性を向上させ得る、防腐剤、湿潤薬剤、乳化薬剤、分散薬剤、防腐剤、および緩衝剤などの、選ばれた投与の経路に適当な1つまたは複数のアジュバントを含んでもよい。本発明の化合物を、例えばラクトース、スクロース、粉末(例えば、スターチ粉末)、アルカン酸のセルロースエステル、ステアリン酸、滑石、ステアリン酸マグネシウム、酸化マグネシウム、リン酸および硫酸のナトリウム塩およびカルシウム塩、アカシア、ゼラチン、アルギン酸ナトリウム、ポリビニルピロリジン、ならびに／またはポリビニルアルコールと混和してもよい。アジュバントのその他の例は、QS21、GM-CSF、SRL-172、ヒスタミン二塩酸塩、サイモカルチン(thymocartin)、Tio-TEPA、モノホスホリル脂質A／マイコバクテリア組成物、ミョウバン、不完全フロイントアジュバント、モンタニドISA、リビアジュバント系、Titer

Maxアジュバント、シンテックスアジュバント製剤、免疫刺激複合体(ISCOM)、ゲルブアジュバント、CpGオリゴデオキシヌクレオチド、リポ多糖、およびポリイノシン酸：ポリシチジル酸である。

【０２０１】

微生物の存在の防止を、滅菌処理、ならびに様々な抗菌薬剤および抗真菌薬剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などを含めることの両方によって確認してもよい。さらに、注射可能な薬学的形態の持続的吸収を、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延させる薬剤を含めることによってもたらしてもよい。

【０２０２】

本発明の化合物を含む本発明の薬学的組成物にはまた、それゆえに好適な塩が含まれてもよい。任意の好適な形態のアルカリ土類金属塩(例えば、緩衝剤塩)などの、任意の好適な塩を、本発明で用いる化合物の安定化に用いてもよい。好適な塩には、典型的には、塩化ナトリウム、コハク酸ナトリウム、硫酸ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、および塩化カルシウムが含まれる。ある態様において、アルミニウム塩は、薬学的組成物中の本発明で用いる化合物の安定化に用いられており、そのアルミニウム塩はまた、そのような組成物を患者に投与する場合、アジュバントとしての役割を果たしてもよい。

【０２０３】

本発明で用いる化合物を、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル化送達系を含む、制御放出製剤などの、速やかな放出から化合物を守ると考えられる担体と共に調製してもよい。そのような担体には、ゼラチン、モノステアリン酸グリセリン、ジステアリン酸グリセリン、単独かもしくはロウと一緒のエチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸などの、生体分解性で、生体適合性のポリマー、または当技術分野において周知のその他の材料が含まれる。そのような製剤の調製のための方法は通常、当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J. R. Robinson, 編, Marcel Dekker 社, New York, 1978を参照されたい。

【０２０４】

ある投与の経路で組成物を投与するために、化合物をその不活性化を防止する材料でコーティングするか、または化合物を該材料と同時に投与する必要がある場合がある。例えば、本発明の方法で用いる化合物を、適当な担体、例えば、リポソーム、または希釈剤中で対象に投与してもよい。リポソームには、従来のリポソームだけでなく、水中油中水型CGFエマルジョンも含まれる(Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7, 27(1984))。

【０２０５】

投与の経路に応じて、活性化合物を、化合物を不活性化し得る酸およびその他の自然条件の作用から化合物を守る材料の中にコーティングしてもよい。例えば、化合物を適当な担体、例えば、リポソーム中で対象に投与してもよい。リポソームには、従来のリポソームだけでなく、水中油中水型CGFエマルジョンも含まれる(Strejan et al., J. Neuroimmunol. 7, 27(1984))。

【０２０６】

本発明のある態様において、本発明の化合物をリポソーム中に製剤化してもよい。さらなる態様において、リポソームには標的化部分が含まれる。さらなる態様において、リポソーム中の化合物を、ボーラス注射によって、所望の領域に近い部位、例えば、炎症もしくは感染の部位、または腫瘍の部位に送達する。組成物は、簡単な注射可能性(syringability)が存在する程度に流動性でなければならない。それは製造および保存の条件下で安定でなければならず、かつ細菌および真菌などの微生物の汚染作用から守られなければならない。

【０２０７】

ある態様において、本発明で用いる化合物を、胎盤を横断するそれらの輸送を防止する

かまたは低下させるように製剤化してもよい。これを、当技術分野において公知の方法のよって、例えば、化合物のPEG化によるかまたは$F(ab')_2$断片の使用によって行なってもよい。Cunningham-Rundles C et al., J Immunol Methods. 152, 177-190(1992)、およびLandor M., Ann Allergy Asthma Immunol 74, 279-283(1995)をさらに参照することができる。

【０２０８】

非経口投与のための薬学的に許容される担体には、滅菌注射可能水溶液または分散液および滅菌注射可能溶液または分散液の即時調製用の滅菌粉末が含まれる。薬学的活性物質のためのそのような媒質および薬剤の使用は、当技術分野において公知である。任意の従来の媒質または薬剤が活性化合物と不適合である場合を除いて、薬学的組成物におけるその使用が包含される。また、補助的な活性化合物を組成物中に組み入れてもよい。

【０２０９】

注射用の薬学的組成物は典型的には、製造および保存の条件下で、滅菌かつ安定でなければならない。組成物を、溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または高い薬物濃度に好適なその他の指示された構造物として製剤化してもよい。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびその好適な混合物、オリーブ油などの、植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの、有機エステルを含む水性または非水性の溶媒または分散剤であってもよい。適切な流動性を、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散液の場合には要求される粒子サイズの維持によって、およびサーファクタントの使用によって維持してもよい。多くの場合、等張化剤、例えば、糖、グリセロール、マンニトール、ソルビトールなどのポリアルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましいと考えられる。例えば、組成物中にモノステアリン酸塩およびゼラチンなどの、吸収を遅延させる薬剤を含めることによって、注射可能組成物の持続的吸収をもたらしてもよい。滅菌注射可能溶液は、例えば、上で列挙したような成分の1つまたは組み合わせと共に必要とされる量の活性化合物を適当な溶媒中に組み入れ、必要に応じて、その後滅菌微量濾過によって調製してもよい。通常、分散液は、塩基性分散媒質および例えば、上で列挙した成分由来の必要とされるその他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化合物を組み入れることによって調製する。滅菌注射可能溶液の調製用の滅菌粉末の場合、調製の方法の例は、活性成分と以前に滅菌濾過したその溶液由来の任意の追加の所望の成分の粉末を生成する真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)である。

【０２１０】

滅菌注射可能溶液は、上で列挙した成分の1つまたは組み合わせと共に必要とされる量の活性化合物を適当な溶媒中に組み入れ、必要に応じて、その後滅菌微量濾過によって調製してもよい。通常、分散液は、塩基性分散媒質および上で列挙した成分由来の必要とされるその他の成分を含む滅菌ビヒクル中に活性化合物を組み入れることによって調製する。滅菌注射可能溶液の調製用の滅菌粉末の場合、調製の方法の例は、活性成分と以前に滅菌濾過したその溶液由来の任意の追加の所望の成分の粉末を生成する真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)である。

【０２１１】

本発明の方法のある態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、静脈内投与または経口投与される、メルファランを含む。

【０２１２】

本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、サリドマイド(Thalomid(登録商標))またはサリドマイド類似体、例えば、CC-5013(レナリドマイド、Revlimid(登録商標))もしくはCC4047(Actimid(登録商標))などの、経口投与される、グルタミン酸誘導体を含む。

【０２１３】

本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、静脈内投与される、ボルテゾミブ(Velcade(登録商標))などの、プロテアソーム阻害

剤を含む。
【０２１４】
本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、静脈内投与される、ビンクリスチンなどの、ビンカアルカロイドを含む。
【０２１５】
本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、静脈内投与される、ドキソルビシンなどの、アントラサイクリンを含む。
【０２１６】
本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、経口投与される、プレドニゾンを含む。
【０２１７】
本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤は、経口投与される、プレドニゾンを含む。
【０２１８】
処置されるべき患者および疾患
本発明の併用療法によって処置し得る個体には、例えば、酵素活性、シグナル伝達、サイトカイン発現の誘導、増殖もしくは分化の誘導、および／もしくは溶解の誘導などの、CD38機能を阻害すること、ならびに／またはCD38発現細胞の数を削除する／低下させることによって是正または改善し得る障害を有するヒト患者が含まれる。
【０２１９】
例えば、抗CD38抗体を用いて、インビボまたはインビトロにおける1つまたは複数の以下の生物学的活性を引き出してもよい：CD38機能の阻害(酵素活性、シグナル伝達、サイトカイン発現の誘導、増殖もしくは分化の誘導、および／または溶解の誘導など)、ヒトエフェクター細胞の存在下でCD38を発現する細胞の食作用もしくはADCCを仲介すること、および補体の存在下でCD38を発現する細胞のCDCを仲介することによって、またはアポトーシスによってCD38発現細胞を殺傷することにより、CD38を発現する細胞を殺傷すること。
【０２２０】
ある態様において、本明細書で記載した免疫コンジュゲートを用いて、本発明の免疫コンジュゲートにおける治療的部分のような標的化合物を用いることによって、化合物(例えば、治療薬剤、標識、細胞毒素、免疫抑制剤など)を、それらの表面に結合したCD38を有する細胞に標的化してもよい。
【０２２１】
ある態様において、本発明は、本発明の免疫コンジュゲートを投与することによって、それらの表面に結合したCD38を有する細胞を殺傷するための方法を提供する。
【０２２２】
本発明は、対象でCD38を発現する細胞が関与する障害を処置するための方法であって、それを必要とする対象に対する、治療的有効量の
i) CD38に結合する非アゴニスト抗体、
ii) 少なくとも1つのコルチコステロイド、および
iii) 少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
の投与を含む、方法を提供する。抗CD38抗体を用いて、ある種の障害と関連するCD38誘導性の活性を阻害するかまたはCD38を発現する細胞の数を削減するかもしくは低下させる。
【０２２３】
本発明のある態様において、CD38を発現する細胞が関与する障害は、例えば、B細胞リンパ腫、形質細胞悪性腫瘍、T/NK細胞リンパ腫、および骨髄性悪性腫瘍を含むCD38を発現する腫瘍細胞の存在を特徴とする障害などの、腫瘍原性障害である。
【０２２４】
そのような腫瘍原性疾患の例として、前駆体B細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫およびB細胞非ホジキンリンパ腫を含むB細胞リンパ腫／白血病；急性前骨髄球性白血病、急性

リンパ芽球性白血病、および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)などの、成熟B細胞新生物、B細胞急性リンパ球性白血病、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫(MCL)、低悪性度、中悪性度、および高悪性度のFLを含む、濾胞性リンパ腫(FL)、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯B細胞リンパ腫(MALT型、結節および脾臓型)、ヘアリー細胞白血病、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、形質細胞骨髄腫、形質細胞白血病、移植後リンパ増殖性障害、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、形質細胞白血病、ならびに未分化大細胞リンパ腫(ALCL)が含まれる。

【０２２５】

ある態様において、CD38を発現する細胞が関与する障害は、多発性骨髄腫である。

【０２２６】

B細胞非ホジキンリンパ腫の例は、リンパ腫様肉芽腫症、原発性滲出性リンパ腫、血管内大B細胞リンパ腫、縦隔大B細胞リンパ腫、重鎖疾患(γ、μ、およびα疾患を含む)、シクロスポリン誘導性のリンパ腫、およびメトトレキサート誘導性のリンパ腫などの、免疫抑制薬剤による治療によって誘導されるリンパ腫である。

【０２２７】

本発明のある態様において、CD38を発現する細胞が関与する障害は、ホジキンリンパ腫であってもよい。

【０２２８】

CD38を発現する細胞が関与する障害の例は、T細胞前リンパ球性白血病、T細胞大顆粒リンパ球性白血病、攻撃性NK細胞白血病、成人T細胞白血病／リンパ腫、節外NK/T細胞リンパ腫、鼻腔型、腸症型のT細胞リンパ腫、肝脾T細胞リンパ腫、皮下脂肪織炎様T細胞リンパ腫、芽球性NK細胞リンパ腫、菌状息肉症／セザリー症候群、原発性皮膚CD30陽性T細胞リンパ増殖性障害(原発性皮膚未分化大細胞リンパ腫C-ALCL、リンパ腫様丘疹症、境界病変)、血管免疫芽球性Tリンパ腫、不特定の末梢T細胞リンパ腫、および未分化大細胞リンパ腫などの、成熟T細胞およびNK細胞新生物を含むT細胞およびNK細胞に由来する悪性腫瘍であってもよい。

【０２２９】

骨髄細胞に由来する悪性腫瘍の例として、急性前骨髄球性白血病を含む、急性骨髄性白血病、および慢性骨髄性白血病を含む、慢性骨髄増殖性疾患が含まれる。

【０２３０】

投薬および処置レジメン

本発明による処置には、使用する「治療的有効量」の医薬が含まれる。「治療的有効量」は、所望の治療結果を達成するために、必要な投薬量で、必要な期間、有効な量を指す。治療的有効量は、個体の疾患状態、年齢、性別、および体重、ならびに医薬が個人において所望の応答を誘発する能力によって変化する可能性がある。治療的有効量はまた、治療的に有益な効果が抗体または抗体部分の任意の毒性効果または有害効果に優る量でもある。本併用療法の文脈において、治療量には、その他の化合物との組み合わせでのみ治療的に有効である量、例えば、少な過ぎて単一治療では有効ではないと考えられる量が含まれる。

【０２３１】

また、腫瘍治療のための「治療的有効量」を、疾患の進行を安定化するその能力によって測定してもよい。化合物が癌を阻害する能力を、ヒト腫瘍における有効性の予測となる動物モデル系において評価してもよい。あるいは、組成物のこの特性を、化合物が細胞成長を阻害するかまたはアポトーシスを誘導する能力を当業者に公知のインビトロアッセイで調べることによって評価してもよい。治療的有効量の治療的化合物は、腫瘍サイズを減少させるか、またはさもなければ患者における症状を改善する可能性がある。当業者は、対象のサイズ、対象の症状の重症度、および選択された特定の組成物または投与の経路などの因子に基づいてそのような量を決定することができると考えられる。

【０２３２】

投薬レジメンを、最適な所望の応答(例えば、治療応答)を提供するように適合させる。例えば、単回ボーラスを投与してもよいし、経時的に数回に分けた用量を投与してもよいし、または治療状況の要件によって示される場合に、用量を比例的に低下させるかもしくは増加させてもよい。非経口組成物を、投与の簡便性および投薬量の均一性のために、単位剤形で製剤化してもよい。本明細書で用いる場合の単位剤形は、処置されるべき対象のための1回分の投薬量として適した物理的に別個の単位を指し；各々の単位は、必要とされる薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された所定の量の活性化合物を含む。本発明の単位剤形についての仕様は、(a)活性化合物の独特の特徴および達成されるべき特定の治療効果、ならびに(b)個体における感受性の処置のためのそのような活性化合物を調合する技術分野に固有の限界によって決定され、かつそれらに直接的に依存する。

【０２３３】

本発明で用いる抗CD38抗体についての有効投薬量および投薬レジメンは、処置されるべき疾患または状態に依存しかつ当業者によって決定されてもよい。本発明で用いる治療的有効量の抗CD38抗体についての例示的で、非限定的な範囲は、約0.1～100mg/kg、例えば約0.1～50mg/kg、例えば約0.1～20mg/kg、例えば約0.1～10mg/kg、例えば約0.5mg/kg、例えば約0.3、約1、約3mg/kgである。別の態様において、抗体は1mg/kgまたはそれ以上、例えば1～20mg/kgの用量、例えば5～20mg/kgの用量、例えば8mg/kgの用量で投与される。

【０２３４】

当技術分野における普通の技術を有する医師または獣医は、必要とされる薬学的組成物の有効量を容易に決定し、処方してもよい。例えば、医師または獣医は、薬学的組成物で利用される医薬の用量を所望の治療効果を達成するために必要とされるレベルよりも低いレベルで開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量を徐々に増加させることができると考えられる。一般に、本発明の組成物の好適な日用量は、治療効果をもたらすのに有効な最小の用量である化合物の量であると考えられる。そのような有効用量は通常、上記の因子によると考えられる。投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下であってもよく、例えば標的の部位の近くに投与されてもよい。望ましい場合、有効な日用量の薬学的組成物を、1日を通じて適当な間隔で別々に投与される2回、3回、4回、5回、6回、またはそれより多くの分割用量として、任意で、単位剤形で投与してもよい。本発明の化合物を単独で投与することは可能であるが、化合物を上記のような薬学的組成物として投与することが好ましい。

【０２３５】

ある態様において、抗CD38抗体を、10～500 mg/$m^2$、例えば200～400 mg/$m^2$などで、週投薬量で注入によって投与してもよい。そのような投与を、例えば1～8回、例えば3～5回、繰り返してもよい。投与を、2～24時間、例えば2～12時間などの期間にわたる連続的注入によって行なってもよい。

【０２３６】

ある態様において、抗CD38抗体を、毒性のある副作用を低下させるために、例えば24時間を上回るような、長い期間にわたってゆっくりとした連続的注入によって投与してもよい。

【０２３７】

ある態様において、抗CD38抗体を、8回まで、例えば4～6回の間、250 mg～2000 mg、例えば300 mg、500 mg、700 mg、1000 mg、1500 mg、または2000 mgなどの週投薬量で注入によって投与してもよい。投与を、2～24時間、例えば2～12時間などの期間にわたる連続的注入によって行なってもよい。そのようなレジメンを、必要に応じて1回または複数回、例えば、6か月～12か月後に、繰り返してもよい。例えば生物学的試料を採取し、抗CD38抗体の抗原結合領域を標的する抗イデオタイプ抗体を用いることにより、投与時の血中の本発明の化合物の量を測定することによって、投薬量を決定するかまたは調整し調整てもよい。

【０２３８】

さらなる態様において、抗CD38抗体を、2～12週間、例えば3～10週間、例えば4～8週間、週1回投与してもよい。

【０２３９】

ある態様において、抗CD38抗体を、例えば、6か月またはそれを上回る期間、週1回などの、維持治療によって投与してもよい。

【０２４０】

ある態様において、抗CD38抗体を、抗CD38抗体の1回の注入、それに続く放射性同位体にコンジュゲートした抗CD38抗体の注入を含むレジメンによって投与してもよい。レジメンを、例えば、7～9日後に繰り返してもよい。

【０２４１】

非限定的な例として、本発明による処置を、24、12、8、6、4、もしくは2時間毎の単一用量もしくは分割用量、または任意のその組み合わせを用いて、処置の開始後1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、もしくは40日のうちの少なくとも1つの日に、もしくはあるいは、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、もしくは20週のうちの少なくとも1つの週に、または任意のその組み合わせで、1日当たり約0.1～100 mg/kg、例えば0.5、0.9、1.0、1.1、1.5、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、45、50、60、70、80、90、または100 mg/kgなどの量の抗体の1日投薬量として提供してもよい。

【０２４２】

本発明の方法のある態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はメルファランを含み、かつ少なくとも1つのコルチコステロイドはプレドニゾンを含む。典型的には、メルファランは静脈内(IV)に投薬されるが、それを例えば、1日当たり0.2～0.25 mg/kgまたは例えば、 7～9 mg/m2の範囲で、経口(PO)で用いることができる。プレドニゾンを、例えば、2 mg/kgで4日間、4～6週毎に投薬してもよい(Alexanian et al., J Am Med Assoc 1969;208:1680)。その他の態様において、メルファランを、高用量レジメンにおいて140 mg/m2(IV)までの単一用量かまたは25～75 mg/m2(IV)の範囲の中間用量で用いることができ、1つの例は、1～4、9～12、17～20日目に5週毎のサイクルで投与される40 mg/dである(Tsakanikas et al., Oncology 1991 ;48:369, Richardson PG Am J Oncol 2005;4:737)。

【０２４３】

本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はサリドマイド(Thalomid(登録商標))を含み、かつ少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含む。サリドマイドを、例えば、200 mg/d(PO)の用量で、または例えば、50～400 mg/dの範囲で、例えば、毎日投与されるかもしくは順次、例えば、各28日サイクルの1～4、9～12、17～20日目に、投与されるかのいずれかの40 mg/dのデキサメタゾンの用量と共に用いることができる(Rajkumar SV J Clin Oncol 2006;24:431)。

【０２４４】

本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はレマリドマイドを含み、かつ少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含む。レナリドマイドを、例えば、毎日(PO)投与される25 mg/dの用量で投与することができ、かつデキサメタゾンを、例えば、(PO)投与される40 mg/dの範囲で、例えば、28日サイクルの1～4、9～12、17～20日目に、任意で後に各周期の1～4日目のみに投与することができる(Rajkumar SV, ASH 2004)。

【０２４５】

本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はボルテゾミブ(Velcade(登録商標))を含む。ボルテゾミブを、例えば、デキサメタゾンとの組み合わせで用いることができる。この組み合わせを、誘導および維持セッティング両方で用いることができる。1つの例は、1、4、8、および11日目に21日毎のサイクルで(

誘導フェーズ、通常8サイクルまで)、それに続いて維持用に1、8、11、15、および22日目に5週毎のサイクル毎でのボルテゾミブ1.3 mg/m2(Richardson PG N Engl J Med 2005;352:2487)である。

【０２４６】

本発明の方法の別の態様において、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤はビンクリスチンおよびドキソルビシンを含み、かつ少なくとも1つのコルチコステロイドはデキサメタゾンを含む。ビンクリスチンを、例えば、1日当たり0.4 mgの、連続的なIV注入によって(1～4日目に4週毎のサイクルで)投与してもよく、ドキソルビシンを、例えば、1～4日目に4週毎のサイクルで9 mg/m2/dの用量の連続的IV注入で投与されてもよい。デキサメタゾンを、例えば、1～4、9～12、17～21日目に4週毎のサイクルで40 mg投薬することができる。あるいは、ペグ化したリポソーム性ドキソルビシンを(1週毎のサイクルで40 mg/m2の用量で)用いることができる(Rifkin Cancer 2006; 106:848)。

【０２４７】

さらなる組み合わせ

本発明の併用療法をその他の医薬とさらに組み合わせてもよく、すなわち、処置されるべき疾患または状態に関連のあるさらなる治療薬剤と組み合わせてもよい。そのような投与は、同時か、個別か、または順次であってもよい。同時投与については、適当な場合、薬剤を1つの組成物としてまたは別々の組成物として投与してもよい。

【０２４８】

したがって、本発明は、上記のようなCD38を発現する細胞が関与する障害を処置するための方法であって、以下に記載するような1つまたは複数の追加の治療薬剤と組み合わせた本発明の三重治療を含む方法を提供する。

【０２４９】

ある態様において、本発明の併用療法には、少なくとも1つの化学療法剤、少なくとも1つの抗炎症薬剤、または少なくとも1つの免疫抑制薬剤および／もしくは免疫調整薬剤の投与が含まれてもよい。

【０２５０】

ある態様において、そのような化学療法剤を、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、フルダラビン、5-フルオロウラシル、デカルバジン、ヒドロキシウレア、アスパラギナーゼ、ゲムシタビン、クラドリビン、および同様の薬剤などの、代謝拮抗物質より選択してもよい。

【０２５１】

ある態様において、そのような化学療法剤を、ダクチノマイシン(以前はアクチノマイシン)、ブレオマイシン、ダウノルビシン(以前はダウノマイシン)、イダルビシン、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、アントラマイシン(AMC)、および同様の薬剤などの、抗生物質より選択してもよい。

【０２５２】

ある態様において、そのような化学療法剤を、タキサン、例えばドセタキセル、およびパクリタキセルなどの、抗有糸分裂剤より選択してもよい。

【０２５３】

ある態様において、そのような化学療法剤を、トポテカンなどの、トポイソメラーゼ阻害剤より選択してもよい。

【０２５４】

ある態様において、そのような化学療法剤を、ErbB1(EGFR)の阻害剤(例えばゲフィニチブ(Iressa(登録商標))、セツキシマブ(Erbitux(登録商標))、エルロチニブ(Tarceva(登録商標))、2F8(国際公開公報第2002/100348号で開示されている)、および同様の薬剤など)、ErbB2(Her2/neu)の阻害剤(例えばトランスツズマブ(Herceptin(登録商標))および同様の薬剤など)、ならびに同様の薬剤などの、成長因子阻害剤より選択してもよい。ある態様において、そのような成長因子阻害剤は、SCH-66336およびR115777などの、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤であってもよい。ある態様において、そのような成長因子阻

害剤は、ベバシズマブ(Avastin(登録商標))などの、血管内皮成長因子(VEGF)阻害剤であってもよい。

【０２５５】

ある態様において、そのような化学療法剤は、イマチニブ(グリベック、グリーベックSTI571)、ラパチニブ、PTK787/ZK222584、および同様の薬剤などの、チロシンキナーゼ阻害剤であってもよい。

【０２５６】

ある態様において、そのような化学療法剤は、ヒストンデアセラーゼ阻害剤であってもよい。そのようなヒストンデアセラーゼ阻害剤の例として、SAHA(ヒドロキサム酸スベロイラニリド)などの、ヒドロキサム酸に基づくハイブリッドの極性化合物が含まれる。

【０２５７】

ある態様において、そのような化学療法剤は、SCIO-469などの、P38a MAPキナーゼ阻害剤であってもよい。

【０２５８】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、それを必要とする対象に対する少なくとも1つの血管形成、新生血管新生、および／またはその他の血管新生の阻害剤の投与がさらに含まれる。

【０２５９】

そのような血管形成阻害剤は、ウロキナーゼ阻害剤、マトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤(例えばマリマスタット、ネオバスタット、BAY 12-9566、AG 3340、BMS-275291、および同様の薬剤など)、内皮細胞遊走および増殖の阻害剤(例えばTNP-470、スクアラミン、2-メトキシエストラジオール、コンブレタスタチン、エンドスタチン、アンジオスタチン、ペニシルアミン、SCH66336(Schering-Plough社, Madison, NJ)、R115777(Janssen Pharmaceutica社, Titusville, NJ)、および同様の薬剤など)、血管形成成長因子のアンタゴニスト(ZD6474、SU6668、血管形成作用物質および／またはそれらの受容体(例えばVEGF、bFGF、およびアンジオポイエチン-1)に対する抗体、Sugen 5416、SU5402、抗血管形成リボザイム(例えばアンジオザイム)、インターフェロンα(例えばインターフェロンα2a)、スラミン、ならびに同様の薬剤)、VEGF-Rキナーゼ阻害剤およびその他の抗血管形成チロシンキナーゼ阻害剤(例えばSU011248)、内皮特異的インテグリン／生存シグナルの阻害剤(例えばビタキシンおよび同様の薬剤)、銅アンタゴニスト／キレート剤(例えばテトラチオモリブデート、カプトプリル、および同様の薬剤)、カルボキシアミド-トリアゾル(CAI)、ABT-627、CM101、インターロイキン-12(IL-12)、IM862、PNU145156Eだけでなく、血管形成を阻害するヌクレオチド分子(例えばアンチセンスVEGF-cDNA、アンジオスタチンをコードするcDNA、p53をコードするcDNA、および欠損VEGF受容体-2をコードするcDNA)ならびに同様の薬剤も含まれる。

【０２６０】

血管形成、新生血管新生、および／またはその他の血管新生のそのような阻害剤のその他の例は、抗血管形成ヘパリン誘導体および関連分子(例えば、ヘパリナーゼIII)、テモゾロマイド、NK4、マクロファージ遊走阻害因子(MIF)、シクロオキシゲナーゼ-2阻害剤、低酸素誘導因子1の阻害剤、抗血管形成大豆イソフラボン、オルチプラズ、フマジリン、およびその類似体、ソマトスタチン類似体、ポリ硫酸ペントサン、テコガランナトリウム、ダルテパリン、ツムスタチン、トロンボスポンジン、NM-3、コンブレスタチン、カンスタチン、アバスタチン、その他の関連標的に対する抗体(例えば抗アルファ-v／ベータ-3インテグリンおよび抗キニノスタチンmAbなど)、ならびに同様の薬剤である。

【０２６１】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、癌抗原／腫瘍関連抗原(例えば、上皮細胞接着分子(EpCAM/TACSTD1)、ムチン1(MUC1)、癌胎児性抗原(CEA)、腫瘍関連糖タンパク質72(TAG-72)、gp100、Melan-A、MART-1、KDR、RCAS1、MDA7)、癌関連ウイルスワクチン(例えば、ヒトパピローマウイルスワクチン)、腫瘍由来熱ショックタンパク質、および同様の作用物質などの、抗癌免疫原の投与がさらに含まれる。本明細書中の別の場所に記

載された多くのその他の好適な癌抗原／腫瘍関連抗原および当技術分野において公知の同様の分子を、同様にまたは代わりに、そのような態様において用いてもよい。抗癌免疫原性ペプチドには、BEC2抗イデオタイプ抗体、ミツモマブ、CeaVac、および関連抗イデオタイプ抗体、MG7抗体に対する抗イデオタイプ抗体、ならびにその他の抗癌抗イデオタイプ抗体などの抗イデオタイプ「ワクチン」も含まれる(例えばBirebent et al., Vaccine. 21(15), 1601-12(2003)、Li et al., Chin Med J.(Engl). 114(9), 962-6(2001)、Schmitt et al., Hybridoma. 13(5), 389-96(1994)、Maloney et al., Hybridoma. 4(3), 191-209(1985)、Raychardhuri et al., J Immunol. 137(5), 1743-9(1986)、Pohl et al., Int J Cancer. 50(6), 958-67(1992)、Bohlen et al., Cytokines Mol Ther. 2(4), 231-8(1996)、およびMaruyama, J Immunol Methods. 264(1-2), 121-33(2002)参照)。そのような抗イデオタイプAbを、任意で担体にコンジュゲートしてもよく、担体は、合成(典型的には不活性)の分子担体、タンパク質(例えばキーホールリンペットヘモシアニン(KLH))(例えばOchi et al., Eur J Immunol. 17(11), 1645-8(1987)参照)、または細胞(例えば赤血球-例えばWi et al., J Immunol Methods. 122(2), 227-34(1989)参照)であってもよい。

【０２６２】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、ビスホスホネートの投与がさらに含まれる。潜在的に好適なビスホスホネートの例は、パミドロネート(Aredia(登録商標))、ゾレドロン酸(Zometa(登録商標))、クロドロネート(Bonefos(登録商標))、リセンドロネート(Actonel(登録商標))、イバンドロネート(Boniva(登録商標))、エチドロネート(Didronel(登録商標))、アレンドロネート(Fosamax(登録商標))、チルドロネート(Skelid(登録商標))、インカドロネート(Yamanouchi Pharmaceutical)、およびミノドロネート(YM529, Yamanouchi)である。

【０２６３】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、コロニー刺激因子の投与がさらに含まれる。好適なコロニー刺激因子の例は、フィルグラスチム(Neupogen(登録商標))およびペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標))などの、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、ならびにサルグラモスチム(Leukine(登録商標))などの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)である。

【０２６４】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、赤血球産生薬剤の投与がさらに含まれる。好適な赤血球産生薬剤の例は、エポエチンアルファ(例えばProcrit(登録商標)、Epogen(登録商標)、およびEprex(登録商標))ならびにエポエチンベータ(例えばNeoRecormon(登録商標))などの、エリスロポイエチン(EPO)ならびに赤血球産生刺激タンパク質(例えばAranesp(登録商標))である。

【０２６５】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、抗癌サイトカイン、ケモカイン、またはその組み合わせの投与がさらに含まれる。好適なサイトカインおよび成長因子の例として、IFNγ、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFNα(例えばIFNα2b)、IFNβ、GM-CSF、CD40L、Flt3リガンド、幹細胞因子、アンセスチム、およびTNFαが含まれる。好適なケモカインには、ヒトCXCおよびC-Cケモカインファミリー由来のIP-10、MCP-3、MIG、およびSDF-1αなどのGlu-Leu-Arg(ELR)陰性ケモカインが含まれてもよい。好適なサイトカインには、サイトカイン誘導体、サイトカイン変異体、サイトカイン断片、およびサイトカイン融合タンパク質が含まれる。

【０２６６】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、FcαまたはFcγ受容体の発現または活性を調整する、例えば増強するかまたは阻害する、薬剤の投与がさらに含まれる。この使用に好適な薬剤の例として、インターロイキン-1(IL-1)、インターロイキン-2(IL-2)、インターロイキン-6(IL-6)、フィルグラスチム(Neupogen(登録商標))およびペグフィルグラスチム(Neulasta(登録商標))などの、顆粒球コロニー刺激因子(G-CSF)、ならびにサルグ

ラモスチム(Leukine(登録商標))などの顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(GM-CSF)、インターフェロン-γ(IFN-γ)、ならびに腫瘍壊死因子(TNF)が含まれる。

【０２６７】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、細胞周期制御／アポトーシス調節因子(または「調節薬剤」)の投与がさらに含まれる。細胞周期制御／アポトーシス調節因子には、(i)cdc-25などの細胞周期制御／アポトーシス調節因子を標的および調整する分子(例えばNSC 663284など)、(ii)細胞周期を過剰刺激するサイクリン依存的キナーゼ(例えばフラボピリドル(L868275、HMR1275)、7-ヒドロキシスタウロスポリン(UCN-01、KW-2401)、およびロスコビチン(R-ロスコビチン、CYC202)など)、ならびに(iii)テロメラーゼ調整因子(例えばBIBR 1532、SOT-095、GRN163、ならびに例えば米国特許第6,440,735号および米国特許第6,713,055号に記載された組成物など)が含まれてもよい。アポトーシス経路に干渉する分子の非限定的な例として、TNF関連アポトーシス誘導リガンド(TRAIL)／アポトーシス-2リガンド(Apo-2L)、IL-6産生の阻害をもたらすNF-κB遮断を誘導する薬剤、TRAIL受容体を活性化する抗体、IFN、アンチセンスBcl-2、および$As_2O_3$(三酸化ヒ素、Trisenox(登録商標))が含まれる。

【０２６８】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、抗アンドロゲンおよび抗エストロゲン治療に有用な薬剤などの、ホルモン調節薬剤の投与がさらに含まれる。そのようなホルモン調節薬剤の例は、タモキシフェン、イドキシフェン、フルベストラント、ドロロキシフェン、トレミフェン、ラロキシフェン、ジエチルスチルベストロール、エチニルエストラジオール／エチニル、抗アンドロゲン剤(例えばフルタミド／ユーレキシン(eulexin)など)、プロゲスチン(例えばカプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、メドロキシプロゲステロン／プロベラ、酢酸メゲストール／メゲース)、アドレノコルチコステロイド(例えばヒドロコルチゾン、プレドニソンなど)、黄体ホルモン放出ホルモン(およびその類似体ならびにブセレリンおよびゴセレリンなどのその他のLHRHアゴニスト)、アロマターゼ阻害剤(例えばアナストラゾール／アリミデックス、アミノグルテチミド／シトラデン、エキセメスタンなど)、ホルモン阻害剤(例えばオクトレオチド／サンドスタチンなど)、ならびに同様の薬剤である。

【０２６９】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、抗アネルギー薬剤(例えば腫瘍および癌抗原に対する寛容性を破壊する小分子化合物、タンパク質、糖タンパク質、または抗体)の投与がさらに含まれる。そのような化合物の例は、MDX-010(Phan et al., PNAS USA 100, 8372(2003))などの、CTLA-4の活性を阻止する分子である。

【０２７０】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、ヒト組換え野生型p53/SCH58500などをコードする複製欠損アデノウイルスなどの腫瘍抑圧遺伝子を含む核酸もしくはベクター；オンコジーン、突然変異が導入されているかもしくは脱調節されている遺伝子に標的化されたアンチセンス核酸；または突然変異が導入されているかもしくは脱調節されている遺伝子に標的化されたsiRNAの投与がさらに含まれる。腫瘍抑圧遺伝子標的の例として、例えば、BRCA1、RB1、BRCA2、DPC4(Smad4)、MSH2、MLH1、およびDCCが含まれる。

【０２７１】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、ジーナセンス(オーグメロセン(augmerosen)／G3139)、LY900003(ISIS 3521)、ISIS 2503、OGX-011(ISIS 112989)、LE-AON/LEraf-AON(リポソームにカプセル化されたc-rafアンチセンスオリゴヌクレオチド／ISIS-5132)、MG98、およびPKCα、クラスタリン、IGFBP、タンパク質キナーゼA、サイクリンD1、またはBcl-2hを標的とするその他のアンチセンス核酸などの、抗癌核酸の投与がさらに含まれる。

【０２７２】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、抗癌阻害RNA分子の投与がさらに含まれる(例えばLin et al., Curr Cancer Drug Targets. 1(3), 241-7(2001)、Erratum in:

Curr Cancer Drug Targets. 3(3), 237(2003)、Lima et al., Cancer Gene Ther. 11(5), 309-16(2004)、Grzmil et al., Int J Oncol. 4(1), 97-105(2004)、Collis et al., Int J Radiat Oncol Biol Phys. 57(2 Suppl), S144(2003)、Yang et al., Oncogene. 22(36), 5694-701(2003)、およびZhang et al., Biochem Biophys Res Commun. 303(4), 1169-78(2003)参照)。

【０２７３】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、ウイルス、ウイルスタンパク質などの投与がさらに含まれる。通常インビボで1回またはほんの数回の複製が可能であり、かつ腫瘍細胞に標的化される、複製欠損ウイルスが、例えばそのような組成物および方法の有用な構成要素であってもよい。そのようなウイルス剤は、GM-CSFおよび／またはIL-2などの、免疫刺激物質をコードする核酸を含むかまたは該核酸と関連してもよい。天然腫瘍溶解性ウイルスおよびそのような組換え腫瘍溶解性ウイルス(例えばHSV-1ウイルス、レオウイルス、複製欠損アデノウイルス、および複製感受性アデノウイルスなど)の両方が、そのような方法および組成物の有用な構成要素であってもよい(例えばShah et al., J Neurooncol. 65(3), 203-26(2003)、Stiles et al., Surgery. 134(2), 357-64(2003)、Sunamura et al., Pancreas. 28(3), 326-9(2004)、Teshigahara et al., J Surg Oncol. 85(1), 42-7(2004)、Varghese et al., Cancer Gene Ther. 9(12), 967-78(2002)、Wildner et al., Cancer Res. 59(2), 410-3(1999)、Yamanaka, Int J Oncol. 24(4), 919-23(2004)、およびZwiebel et al., Semin Oncol. 28(4), 336-43(2001)参照)。

【０２７４】

さらなる態様において、本発明の併用療法は、「全細胞」および「養子」免疫治療法をさらに伴ってもよい。例えば、そのような方法は、免疫系細胞(例えば$CD4^+$および／もしくは$CD8^+$ T細胞などの、腫瘍浸潤リンパ球(TIL)(例えば腫瘍特異的抗原および／もしくは遺伝子増強で拡大したT細胞)、抗体発現B細胞もしくはその他の抗体産生／提示細胞、樹状細胞(例えば、抗サイトカインを発現する組換え樹状細胞、GM-CSFおよび／もしくはFlt3-LなどのDC拡大作用物質と共に培養した樹状細胞、ならびに／もしくは腫瘍関連抗原を取り込んだ樹状細胞)、抗腫瘍NK細胞、いわゆるハイブリッド細胞、またはその組み合わせ)の注入または再注入を含んでもよい。細胞ライセートも、そのような方法および組成物において有用である可能性がある。そのような局面で有用であり得る臨床治験における細胞「ワクチン」には、Canvaxin(商標)、APC-8015(Dendreon)、HSPPC-96(Antigenics)、およびMelacine(登録商標)細胞ライセートが含まれる。また、任意でミョウバンなどのアジュバントと混和した、癌細胞から放出される抗原、およびその混合物(例えばBystryn et al., Clinical Cancer Research Vol. 7, 1882-1887, July 2001参照)が、そのような方法および組み合わせ組成物における構成要素であってもよい。

【０２７５】

さらなる態様において、本発明の併用療法は、内部ワクチン接種法の適用をさらに含んでもよい。内部ワクチン接種とは、患者における、薬物誘導型または放射線誘導型の腫瘍細胞の細胞死などの、誘導された腫瘍または癌の細胞死を指し、それは(i)全体としての腫瘍細胞、または(a)分泌タンパク質、糖タンパク質、もしくはその他の産物、(b)膜に会合しているタンパク質もしくは糖タンパク質もしくは膜に会合しているかもしくは膜に挿入されているその他の構成要素、および／または(c)細胞内タンパク質もしくはその他の細胞内構成要素を含む、(ii)腫瘍細胞の一部に対する免疫応答の誘発を典型的にもたらす。内部ワクチン接種によって誘導される免疫応答は、液性である(すなわち、抗体－補体を介する)かまたは細胞を介する(例えば、内部で殺傷された腫瘍細胞もしくはその一部を認識する内在性の細胞毒性Tリンパ球の発生および／もしくは増加)であってもよい。

【０２７６】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、補体の投与がさらに含まれる。したがって、抗CD38抗体を含む組成物を血清または補体と共に使用することも本発明の範囲内にある。これらの組成物において、補体は、例えばコンジュゲーションによって抗CD38抗体のすぐ近くにあるか、または同時投与のために適合させてもよい。あるいは、抗CD38抗体

および補体または血清を個別に投与してもよい。

【０２７７】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、分化誘導薬剤、レチノイン酸、およびレチノイン酸類似体(例えばall transレチノイン酸、13-cisレチノイン酸、および同様の薬剤など)、ビタミンD類似体(例えばセオカルシトールおよび同様の薬剤など)、ErbB3、ErbB4、IGF-IR、インスリン受容体、PDGFRa、PDGFRベータ、Flk2、Flt4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FGFR4、TRKA、TRKC、c-met、Ron、Sea、Tie、Tie2、Eph、Ret、Ros、Alk、LTK、PTK7、ならびに同様の薬剤の投与がさらに含まれる。

【０２７８】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、カテプシンB、カテプシンDデヒドロゲナーゼ活性の調整因子、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(例えばグルタチルシステインシンターゼおよび乳酸デヒドロゲナーゼなど)、または同様の薬剤の投与がさらに含まれる。

【０２７９】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、エストラムスチンおよびエピルビシンの投与がさらに含まれる。

【０２８０】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、17-アリルアミノゲルダナマイシンのようなHSP90阻害剤、PSA、CA125、KSAなどのような腫瘍抗原に対する抗体、インテグリンβ1のようなインテグリン、VCAMの阻害剤、または同様の薬剤の投与がさらに含まれる。

【０２８１】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、カルシニューリン阻害剤(例えばバルスポダール、PSC 833、およびその他のMDR-1またはp-糖タンパク質阻害剤など)、TOR阻害剤(例えばシロリムス、エヴェロリムス、およびラパマイシンなど)、ならびに「リンパ球ホーミング」機構の阻害剤(例えばFTY720など)、ならびに接着分子阻害剤などの細胞シグナル伝達に対する効果を有する薬剤(例えば抗LFAなど)の投与がさらに含まれる。

【０２８２】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、放射線治療がさらに含まれる。

【０２８３】

放射線療法は放射線を含んでもよく、または患者への放射性医薬の関連投与が提供される。放射線の源は処置されている患者にとって外部または内部のいずれかであってもよい(放射線処置は、例えば、外部ビーム放射線治療(EBRT)、小線源治療(BT)、または骨格標的放射線治療の形態であってもよい)。そのような方法を実施する際に使用し得る放射性元素には、例えば、ラジウム、セシウム-137、イリジウム-192、アメリシウム-241、金-198、コバルト-57、銅-67、テクネチウム-99、ヨウ素-123、ヨウ素-131、およびインジウム-111が含まれる。

【０２８４】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、自己末梢幹細胞移植または骨髄移植がさらに含まれる。

【０２８５】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、整形外科的介入がさらに含まれる。

【０２８６】

整形外科的介入を、多発性骨髄腫などの、CD38を発現する細胞が関与する障害の処置で用いて、痛みを制御するかまたは機能もしくは可動性を保持するのに役立ててもよい。そのような介入には、物理的治療、骨折を予防もしくは処置するための骨の固定、または骨折を直すための外科手術(小手術または大手術)が含まれる。

【０２８７】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、腫瘍の内側へのCD38抗体または組み合わせ組成物の接近を促進する1つまたは複数の薬剤の送達がさらに含まれる。そのような方法を、例えば、腫瘍の硬さをほぐすことができる、リラキシンの送達と関連させて行な

ってもよい(例えば米国特許第6,719,977号参照)。ある態様において、本発明で用いる抗CD38抗体を細胞貫通ペプチド(CPP)に結合させてもよい。細胞貫通ペプチドおよび関連ペプチド(例えば人工的に作製された細胞貫通抗体など)は、例えばZhao et al., J Immunol Methods. 254(1-2), 137-45(2001)、Hong et al., Cancer Res. 60(23), 6551-6(2000)、Lindgren et al., Biochem J. 377(Pt 1), 69-76(2004)、Buerger et al., J Cancer Res Clin Oncol. 129(12), 669-75(2003)、Pooga et al., FASEB J. 12(1), 67-77(1998)、およびTseng et al., Mol Pharmacol. 62(4), 864-72(2002)に記載されている。

【０２８８】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、少なくとも1つの抗炎症薬剤の投与がさらに含まれる。

【０２８９】

ある態様において、そのような抗炎症薬剤を、ステロイド薬物およびNSAID(非ステロイド抗炎症薬物)より選択してもよい。

【０２９０】

ある態様において、そのような抗炎症薬剤を、アスピリンおよびその他のサリチル酸、Cox-2阻害剤(例えばロフェコキシブおよびセレコキシブなど)、NSAID(例えばイブプロフェン、フェノプロフェン、ナプロキセン、スリンダック、ジクロフェナック、ピロキシカム、ケトプロフェン、ジフルニサル、ナブメトン、エトドラック、オキサプロジン、およびインドメタシンなど)、抗IL6R抗体、抗IL8抗体(例えば、国際公開公報第2004/058797号に記載された10F8)、抗IL15抗体、抗IL15R抗体、抗CD4抗体、抗CD11a抗体(例えば、エファリズマブ)、抗アルファ-4／ベータ-1インテグリン($V_LA4$)抗体(例えば、ナタリズマブ)、炎症性疾患の処置用のCTLA4-Ig、プレドニゾロン、プレドニゾン、メトトレキサートなどの疾患を修飾する抗リウマチ薬物(DMARD)、ヒドロキシクロロキン、スルファサラジン、ピリミジン合成阻害剤(例えばレフルノミドなど)、IL-1受容体遮断薬剤(例えばアナキンラなど)、TNF-α遮断薬剤(例えばエタネルセプト、インフリキシマブ、およびアダリムマブなど)、ならびに同様の薬剤より選択してもよい。

【０２９１】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、それを必要とする対象に対する少なくとも1つの免疫抑制薬剤および／または免疫調整薬剤の投与がさらに含まれる。

【０２９２】

ある態様において、そのような免疫抑制薬剤および／または免疫調整薬剤を、シクロスポリン、アザチオプリン、ミコフェノール酸、ミコフェノレートモフェチル、プレドニゾンなどのコルチコステロイド、メトトレキサート、金塩、スルファサラジン、抗マラリア薬、ブレキナール、レフルノミド、ミゾリビン、15-デオキシスペルグアリン、6-メルカプトプリン、シクロホスファミド、ラパマイシン、タクロリムス(FK-506)、OKT3、抗胸腺細胞グロブリン、チモペンチン、チモシン-α、および同様の薬剤より選択してもよい。

【０２９３】

ある態様において、そのような免疫抑制薬剤および／または免疫調整薬剤を、IL-2受容体のp75に結合する抗体、もしくは例えばMHC、CD2、CD3、CD4、CD7、CD28、B7、CD40、CD45、IFNγ、TNF-α、IL-4、IL-5、IL-6R、IL-6；IGF、IGFR1、IL-7、IL-8、IL-10、CD11a、もしくはCD58に結合する抗体、またはそれらのリガンドに結合する抗体などの、免疫抑制抗体より選択してもよい。

【０２９４】

ある態様において、そのような免疫抑制薬剤および／または免疫調整薬剤を、可溶型IL-15R、IL-10、B7分子(B7-1、B7-2、その変異体、およびその断片)、ICOS、ならびにOX40、陰性T細胞調節因子の阻害剤(例えばCTLA4に対する抗体など)、ならびに同様の薬剤より選択してもよい。

【０２９５】

さらなる態様において、本発明の併用療法には、抗C3b(i)抗体の投与がさらに含まれる。

【０２９６】
さらなる態様において、本発明の併用療法には、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤(例えばフェニルブチレート)ならびに／またはDNA修復作用物質(例えば、DNA修復酵素およびジメリシンなどの関連組成物)の投与がさらに含まれる。
【０２９７】
さらなる態様において、本発明の併用療法には、抗癌指向性の光力学治療(例えば、任意で光感作剤の使用を伴って実施し得る - 抗癌レーザー治療、例えばZhang et al., J Control Release. 93(2), 141-50(2003)参照)、抗癌音波および衝撃波治療(例えばKambe et al., Hum Cell. 10(1), 87-94(1997)参照)、ならびに／または抗癌栄養補助治療(例えばRoudebush et al., Vet Clin North Am Small Anim Pract. 34(1), 249-69, viii(2004)およびRafi, Nutrition. 20(1), 78-82(2004)参照)がさらに含まれる。
【０２９８】
本明細書でそうでないように指示しないかまたはさもなければ文脈上明らかに矛盾しない限り、本明細書で記載した方法は全て、任意の好適な順序で行なうことができる。
【０２９９】
本明細書で引用した特許、係属特許出願、およびその他の刊行物は全て、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。
【０３００】
本発明を、さらなる限定として解されるべきではない以下の実施例によってさらに例証する。
【実施例】
【０３０１】
実施例1
ルシフェラーゼをトランスフェクトした(Daudi-luc)細胞の作製
Daudi細胞(バーキットリンパ腫が起源である)の培養を、10% FCS(Optimum C241, Wisent社, St. Bruno, QC, Canada)、2 mM L-グルタミン、100 IU/mlペニシリン、100 mg/mlストレプトマイシン、1 mMピルビン酸ナトリウム(全てGibco BRL, Life Technologies, Paisley, Scotlandから得た)を補充したRPMI 1640培養培地中で培養した。培地を週に2回補給した。トランスフェクションの前に、細胞を分割し、生存および最適な成長を確実にするために1～1.5×$10^6$細胞／mlで播種した。
【０３０２】
ルシフェラーゼトランスフェクション
8.2×$10^6$ $CD38^+$ Daudi細胞を、(10% dFCS, Gibco BRLを補充した)350 μl RPMI中に採取し、エレクトロポレーションキュベット(Biorad, Hemel Hempstead, Herts, UK)に移した。その後、GTS(Aldevron, Fargo, ND, USA)からの40 μg gWIZルシフェラーゼおよびピューロマイシン耐性を付与する、10 μg pPurベクター(BD Biosciences, Alphen a/d Rijn, The Netherlands)を添加した。細胞を氷上で10分間静置した後、細胞をエレクトロポレートした(250V, 950μF；Gene Pulser II, Biorad Laboratories GmbH, Munchen, Germany)。細胞を再び氷上で静置し、(10% FCSを補充した)40 ml RPMI中に採取した。その後、細胞を96ウェル組織培養プレート中に全てプレーティングした(ウェル当たり100 μl)。48時間後、ピューロマイシン(最終濃度：1 μg/ml；Sigma-Aldrich Chemie BV, Zwijndrecht, The Netherlands)を添加した。ピューロマイシン耐性クローンを、24ウェル組織培養プレート中でさらに成長させた。
【０３０３】
ルシフェラーゼ活性の決定
ルシフェラーゼアッセイシステム(#E4030, Promega, Madison, WI, USA)を用いて、細胞のルシフェラーゼ活性を決定した。1×$10^5$細胞をエッペンドルフ遠心分離機で遠心分離し(13.500 rpm, 1分)、ペレットを100 μl PBS中で洗浄した。遠心分離(13.500 rpm, 1分)後、ペレットを20 μlレポーター溶解緩衝剤(Promega)で溶解し、凍結し、融解した。遠心分離(13,500 rpm, 1分)後、20 μl上清を捨て、100 μlルシフェラーゼアッセイ試薬を

(Promegaの特別のルミノメーターチューブ中に)添加した。発光をルミノメーター(LB9507, Berthold, Vilvoorde, Belgium)中で測定した(10秒)。

【０３０４】

実施例2

マウスの免疫化およびハイブリドーマの作製

-003についての免疫化プロトコル

HCo12マウスを2週間毎に20 μgの精製HA-CD38で免疫化した。最初の免疫化を、100 μlの完全フロイントアジュバント(CFA)と混合した、100 μl PBSの存在下で、i.p.で行なった。この最初の免疫化の後、続く精製HA-CD38によるブースト(13×)を、100 μlの不完全フロイントアジュバント(IFA)と混合した、100 μl PBSの存在下で、s.c.およびi.p.で交互に行なった。力価の拡張後、マウスを、PBA中の20 μg HA-CD38で、i.v.でブーストした。

【０３０５】

-005および-024についての免疫化プロトコル

HCo12マウスを2週間毎に20 μg精製HA-CD38とNIH-3T3-CD38トランスフェクト細胞で交互に免疫化した。最初の免疫化を、100 μl CFAと混合した、100 μl PBS中の$5\times10^6$細胞で、i.p.で行ない、2回目およびその後のHA-CD38による免疫化を、100 μl IFAと混合した、100μl PBSの存在下で、s.c.で行なった。その後のトランスフェクト細胞による免疫化を、200 μl PBSの存在下で行なった。力価の拡張後、マウスを、PBS中の20 μg HA-CD38で、i.v.でブーストした。

【０３０６】

CD38に対するヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

マウス脾臓細胞をHCo12マウスから単離し、標準的なプロトコルに基づいてPEGでマウス骨髄腫細胞株に融合させた。その後、結果として得られるハイブリドーマを、ヒト抗体産生についてはELISAで、CD38特異性については、FACS解析でヒトCD38トランスフェクトNS/0細胞を用いてかつELISAで組換えHA-CD38タンパク質結合を用いて、スクリーニングした。それぞれ、-003、-005、および-024という、ヒトモノクローナル抗CD38抗体を発現する3つのハイブリドーマ細胞株を選択した。

【０３０７】

実施例3

CD38によるNIH細胞のトランスフェクション

NIH-3T3-CD38細胞を産生するためのベクター(pclpuroCD38)をM. Glennie教授(Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UK)から得た。NIH-3T3細胞(DSMZ、ACC 59；150,000細胞／ウェル；0.5 ml；96ウェル平底プレート、Greiner)を(グルコース[4.5 g/l]、10% FCS、L-グルタミン、ピルビン酸-Na；BioWhittakerを補充した)DMEM中で24時間培養した。その後、DNA(0.8 μg)およびリポフェクトアミン(Invitrogen, Breda, The Netherlands)をDMEM中で希釈し、混合した(20分、室温)。その後、混合物(100 μl)を各ウェルに添加し、およびインキュベートした(終夜、37℃)。

【０３０８】

CD38発現のスクリーニング

NIH-3T3-CD38細胞を(1 ml PBS中で)洗浄し、トリプシン処理した(200 μl、トリプシン-EDTA、BioWhittaker)。その後、1 mlのDMEMを添加し、混合物をピペッティングしてFACSチューブに入れた。遠心分離後(1200 rpm、5分)、細胞をFACS緩衝剤(FB；PBS、0.05% BSA、0.02% $NaN_3$)中で洗浄し、1 ml FBに再懸濁した。遠心分離後(1200 rpm、5分)、上清を除去し、マウス抗ヒトCD38-PEを添加した(1/50希釈、Sanquin、Amsterdam、The Netherlands)。細胞をFB中で2回洗浄した後、フローサイトメトリーで得るために細胞をFBに再懸濁した。

【０３０９】

拡大および選択

トリプシン処置後、細胞を(グルコース 4.5 g/l、2 mM L-グルタミン、およびピューロ

マイシン(2 μg/ml)BioWhittakerを補充した)DMEM中のT25フラスコ(Greiner)に移した。ピューロマイシン含有培地にして2週間後に、ピューロマイシン耐性細胞を安定なCD38発現についてフローサイトメトリーで検査した。NIH-3T3-CD38選択細胞を限界希釈でサブクローニングした。これらの細胞を拡大した後、15個のNIH-3T3-CD38クローン全てをCD38発現についてスクリーニングした。CD38high NIH-3T3-CD38細胞を、使用するまで液体窒素(-80℃)中で凍結した。

【０３１０】

NIH-3T3-CD38細胞の培養

細胞を(グルコース(4.5 g/l)、10% FCS、2 mM L-グルタミン、ピルビン酸-Na、ペニシリン、ストレプトマイシンを補充した)DMEM中で培養した。細胞を、トリプシン／EDTAの使用によって週に2回継代し、$1\times10^6$細胞／T75フラスコの濃度で播種した。CD38high NIH-3T3-CD38細胞を、使用するまで液体窒素(-80℃)中で凍結した。

【０３１１】

HA-CD38抗原の精製

セファロース4B(Amersham Bioscience, Uppsala, Sweden)を、抗CD38抗体(Serotec, Oxford, UK)とカップリングした。カラム(カラムチューブHR5/20は12 cmベッド高まで詰められている、カラム容量2.4 ml；最大流速0.5 ml／分)を、少なくとも5カラム容量(CV)のPBSで平衡化した。試料を濾過し、カラムに充填した。シグナルがベースラインに戻るまで、カラムをPBSで洗浄した(およそ3CV)。溶出をpH 2の0.1 Mグリシンで実行した。溶出分画を1%(v/v) 2 M Tris-HCl、pH 9で中和した。

【０３１２】

抗CD38抗体の精製

ヒト抗CD38抗体を組織培養上清から精製した。まず、上清を0.20 μMデッドエンドフィルターに通して濾過した。その後、上清を5 mlプロテインAカラム(rProtein A FF, Amersham Bioscience)に充填し、0.1 Mクエン酸-NaOH、pH 3で溶出した。溶出物を2 M Tris-HCl、pH 9ですぐに中和し、12.6 mMリン酸ナトリウム、140 mM NaCl、pH 7.4(B. Braun, Oss, The Netherlands)に対して終夜透析した。透析後、試料を0.20 μMデッドエンドフィルターに通して滅菌濾過した。

【０３１３】

His-CD38バッチの精製

本タンパク質は、CD38の細胞外ドメインの配列を含むDNAコンストラクトを持つ、His-CD38発現細胞の細胞培養上清中に存在する。付加的なポリHisタグ配列がコンストラクト中に含まれており、かつ本タンパク質のN末端に存在する。このタグによって、固相化した金属親和性クロマトグラフィーによる精製が可能になる。この過程において、クロマトグラフィー樹脂上に固定されたキレート剤は、$Co^{2+}$陽イオンによって電荷を帯びている。実際、6つのヒスチジンアミノ酸を含む配列は、$Co^{2+}$に強く結合する。それゆえ、Hisタグ付きCD38タンパク質がそのようなカラムに強く結合するのに対し、培養上清中に存在するその他のタンパク質はカラムを素通りするかまたは洗い流されると考えられる。その後、強く結合した、Hisタグ付きCD38タンパク質を、Hisの$Co^{2+}$への結合と競合する、イミダゾールを含む緩衝剤で溶出する。十分なHis-CD38を精製したら、溶出物を脱塩カラムによる緩衝剤交換によって本タンパク質から除去する。

【０３１４】

実施例4

CD38トランスフェクトCHO(CHO-CD38)細胞、Daudi-luc細胞、および新鮮な多発性骨髄腫(MM)腫瘍細胞への-003、-005、および-024の結合

採取および計数の後、Daudi-luc細胞、CD38をトランスフェクトしたCHO細胞、および対照CHO細胞をPBSに再懸濁した($1\times10^6$細胞／ml)。その後、細胞を96ウェルV底プレート(100 μl／ウェル)中に置き、PBS-BSA(0.1% BSAおよび0.02%アジ化-Naを補充したPBS)中で2回洗浄した。その後、PBS-BSA中の50 μl抗体溶液を細胞に添加した(4℃、30分)。PBS-BSA中で3回洗浄した後、PBS-BSA中の50 μl(1:400希釈)のウサギ抗ヒトIgG-FITC抗体溶液

を添加した(4℃暗所で、30分)。細胞を3回洗浄し、CD38抗体のCHO-CD38細胞およびDaudi-luc細胞への特異的結合をフローサイトメトリーで検出した。HuMab-KLH(本明細書中の別の場所に記載された免疫化プロトコルの使用によりGenmab B. V., Utrecht, The Netherlandsによって作製されたKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)に対するヒトモノクローナル抗体)を対照として用いた。図1および2は、異なる$EC_{50}$ではあるが、-003、-005、および-024が、CHO-CD38細胞およびDaudi-luc細胞に結合することを示している(表1)。対照CHO細胞への結合は観察されなかった(データは示さない)。

【０３１５】

新鮮なMM腫瘍細胞をLokhorst博士(University Medical Center Utrecht, Utrecht, The Netherlands)から得た。腫瘍細胞を多発性骨髄腫患者の骨髄からフィコール(Bio Whittaker；リンパ球分離培地、カタログ17-829E)勾配遠心分離で単離した。採取および計数の後、MM細胞(100,000細胞／ウェル)を25 μl FITC標識CD38特異的抗体および25μl CD138で再懸濁した。インキュベーション(4℃、30分)の後、細胞をPBS-BSA中で洗浄し、PE標識ヤギ抗マウスIgG(1:200；Jackson ImmunoReseach Europe社. Soham, UK)を添加した。インキュベーション(4℃、30分)およびPBS-BSA中での細胞の洗浄後、蛍光をフローサイトメトリーで測定した。

【０３１６】

図3は、-003、-005、および-024がMM細胞に結合することを示している。

【０３１７】

（表１）CHO-CD38細胞、Daudi-luc細胞、および新鮮なMM腫瘍細胞に対する抗CD38抗体の結合の$EC_{50}$値

| CD38特異的抗体 | $EC_{50}$ CHO-CD38 (μg/ml) | $EC_{50}$ Daudi-luc (μg/ml) | $EC_{50}$ MM 細胞 (μg/ml) |
|---|---|---|---|
| -003 | 0.54 | 0.26 | 0.56 |
| -005 | 0.23 | 0.09 | 0.04 |
| -024 | 0.08 | 0.05 | 0.02 |

【０３１８】

実施例5

抗体依存性の細胞を介する細胞毒性

Daudi-luc細胞、新鮮な多発性骨髄腫腫瘍細胞、新鮮な形質細胞白血病腫瘍細胞、ならびにJK6LおよびAMO-1多発性骨髄腫細胞($5\times10^6$細胞)を、100 μCi $^{51}Cr$(クロミウム-51；Amersham Biosciences Europe GmbH, Roosendaal, The Netherlands)を添加した、$RPMI^{++}$(10% コスミック(cosmic)ウシ血清(HyClone, Logan, UT, USA)を補充したRPMI 1640培養培地)中に回収し、混合物を37℃の水槽で1時間インキュベートした。細胞の洗浄(PBS中で2回、1500 rpm、5分)後、細胞を$RPMI^{++}$に再懸濁し、トリパンブルー排出によって計数した。細胞を$1\times10^5$細胞／mlの濃度にした。

【０３１９】

エフェクター細胞の調製

新鮮な末梢血単核細胞(健常ボランティア, UMC Utrecht, Utrecht, The Netherlands)を、製造元の取扱説明書に従って、フィコール(Bio Whittaker；リンパ球分離培地、カタログ17-829E)で40 mlのヘパリン血液から単離した。$RPMI^{++}$における細胞の再懸濁の後、トリパンブルー排出によって細胞を計数し、$1\times10^7$細胞／mlの濃度にした。

【０３２０】

ADCCセットアップ

50 μlの$^{51}Cr$標識した標的細胞をピペッティングして96ウェルプレート中に入れ、50 μlの抗体を添加し、$RPMI^{++}$中で希釈した(最終濃度10、1、0.1、0.01 μg/ml)。細胞をインキュベートし(室温、15分)、50 μlエフェクター細胞を添加し、結果的に100：1のエフェクター 対 標的比にした(最大溶解の決定のために、エフェクター細胞の代わりに、100 μl 5% Triton-X100を添加し；自発的な溶解の決定のために、50 μl標的細胞および100 μl RPMI++を用いた)。細胞をスピンダウンし(500 rpm、5分)、インキュベートした(37

℃、5% $CO_2$、4時間)。細胞をスピンダウンした後(1500 rpm、5分)、100 μlの上清をマイクロニックチューブ中に採取し、ガンマカウンターで計数した。パーセンテージ特異的溶解を以下のように計算した：

(cpm試料 - cpm標的細胞のみ)／(cpm最大溶解 - cpm標的細胞のみ)

式中cpmは1分当たりのカウントである。

【０３２１】

Daudi-luc細胞において(図4および表2)、-003、-005、および-024は、ADCCによる溶解を誘導し、かつ-003および-005は、リツキシマブ(抗CD20 mAb)よりもわずかに良く機能する。興味深いことに、新鮮な多発性骨髄腫腫瘍細胞(H. Lokhorst博士, UMCU, The Netherlandsから得た)を標的細胞として用いる場合、ADCCは-003、-005、および-024によって誘導される(図5Aおよび表2)。

【０３２２】

（表２）ADCCで得られたCD38特異的抗体の$EC_{50}$値

| CD38特異的抗体 | $EC_{50}$ Daudi-luc (ng/ml) | $EC_{50}$ MM 細胞 (ng/ml) |
|---|---|---|
| -003 | 9.0 | 27 |
| -005 | 4.5 | 5.7 |
| -024 | 9.7 | 56 |

【０３２３】

ヒト末梢血単核細胞Erlangenの濃縮

ヒトボランティア由来のヒト血液(university Erlangen, Erlangen, Germany)をRPMI 1640中で2回希釈し、血液細胞をフィコール上に重層した(リンパ球分離培地1077 g/ml、710 g、RT、20分；BioWhittaker, Cambrex Bio Science Vervier, Verviers, Belgium, カタログ. 17-829E, ロット番号. 0148 32)。末梢血単核細胞(MNC)を中間層から回収し、洗浄し、10% FCS、2 mM L-グルタミン、5 U/mlペニシリン、50 μg/mlストレプトマイシン(全てBioWhittakerから得た)を補充したRPMI 1640培養培地に再懸濁し、そこに25 mM HEPES(BioWhittaker)を添加した。

【０３２４】

ADCCセットアップII

標的B細胞(新鮮な形質細胞白血病腫瘍細胞、T. Valerius博士, University of Erlangen, Erlangen, Germanyから得た、JK6LおよびAMO-1 B細胞株)を20 μCi $^{51}Cr$(Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden)で2時間標識した。RPMI-10中での徹底的な洗浄の後、細胞を$1\times10^5$細胞／mlに合わせた。MNC(50 μl)、感作抗体(50 μl)、およびRPMI-10(50 μl)を丸底マイクロタイタープレート(Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany)に添加した。新鮮な形質細胞白血病腫瘍細胞、JK6L、またはAMO-1細胞(50 μl)を添加し、200 μlの最終容量にすることによってアッセイを開始した。40：1のエフェクター対標的(E：T)比を用いた。インキュベーション(3時間、37℃)後、アッセイを遠心分離によって停止し、3通り由来の$^{51}Cr$放出をシンチレーションカウンター中でカウント毎分(cpm)として測定した。細胞の細胞毒性のパーセンテージを以下の公式を用いて計算した：

%特異的溶解 =(実験cpm - 基礎cpm)／(最大cpm - 基礎cpm)×100

最大の$^{51}Cr$放出は過塩素酸(3%最終濃度)を標的細胞に添加することにより決定し、基礎放出は感作抗体およびエフェクター細胞の非存在下で測定した。

【０３２５】

両方の多発性骨髄腫細胞株(すなわち、JK6LおよびAMO-1)において、CD38発現が低い場合でさえも(AMO-1細胞株)、溶解は-003および-005の両方で誘導される(図6および7)。

【０３２６】

-003、-005、および-024は形質細胞白血病の初代腫瘍細胞のADCCを誘導する(図5B)。

【０３２７】

実施例6

補体依存性の細胞毒性

Daudi-luc細胞の採取および計数の後、細胞の生存率は≧90％であるべきである。洗浄(PBS)後、細胞を$2.0\times10^6$細胞／mlでRPMI-B(1％ BSAを補充したRPMI)に再懸濁する。その後、細胞を96ウェル丸底プレート中に$1\times10^5$細胞／ウェル(50 μl／ウェル)で置く。その後、50 μl抗体をウェルに添加する(0～100 μg/mlの間の最終濃度範囲(RPMI-B中で3倍希釈))。インキュベーション(室温、15分)後、11 μlのプールしたヒト血清(18人の健常ドナーのプール)を各ウェルに添加した(37℃、45分)。ウェルを1回再懸濁し、120 μlをFACSチューブ(Greiner)に移した。その後、10 μlヨウ化プロピジウム(PI；Sigma-Aldrich Chemie B.V.)をこの懸濁液に添加した(10 μg/ml溶液)。溶解を(PI陽性細胞に対応する)死細胞のパーセンテージの測定によってフローサイトメトリー(FACScalibur(商標), Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)で検出した。

【０３２８】

図8および表2は、Daudi-luc細胞の溶解が-005によって誘導されること(～60％最大溶解)、および-003による溶解が非常に高い抗体濃度でのみ見られることを示している。-024はDaudi細胞におけるCDCを誘導しない(データは示さない)。CHO-CD38細胞において、溶解は、-003、-005、および-024の両方によって誘導される(図9および表3)。-003による溶解はより高い濃度で誘導される。異なるMM患者(A：3％難治性腫瘍細胞、B：9％難治性腫瘍細胞、C：30～40％腫瘍細胞、およびD：70％腫瘍細胞)から得られた、腫瘍細胞(全てLokhorst博士およびBloem博士、University Medical Center Utrecht, The Netherlandsから得た)において、CDCを介する溶解は、-005の存在下では観察されるが、-003の存在下では観察されない(図10)。-024もMM腫瘍細胞の溶解を誘導した(図10E)。

【０３２９】

（表３）CDCで得られたCD38特異的抗体の$EC_{50}$値

| CD38特異的抗体 | $EC_{50}$ Daudi-luc (μg/ml) | $EC_{50}$ CD38-CHO (μg/ml) |
|---|---|---|
| -003 | >90 | 3.14 |
| -005 | 0.33 | 0.14 |
| -024 | >90 | 0.24 |

【０３３０】

実施例7

FACSを用いた交差阻止の検討

CHO-CD38細胞を過剰の非標識CD38特異的抗体とインキュベートした(4℃、15分)。その後、細胞をFITC標識CD38特異的抗体とインキュベートした(濃度は$EC_{90}$に近い、4℃、45分)。細胞をPBS-BSAで2回洗浄した後、蛍光をフローサイトメトリーで測定した。図11は、非標識-003がFITC標識-003の結合を阻止するのに対し、FITC標識-005の結合は阻止されないことを示している。また、非標識-005はFITC標識-005の結合を阻止するのに対し、FITC標識-003の結合は阻止されない。それらが結合を競合しないので、-003および-005は異なるエピトープに結合する。

【０３３１】

実施例8

ELISAを用いた交差阻止の検討

可溶型ヒトCD38をELISAプレートの表面にコーティングする。コーティングしたCD38を過剰の非標識CD38特異的抗体と約15分間インキュベートし、その後ビオチン化CD38特異的抗体を添加する(濃度は$EC_{90}$に近い、室温、1時間)。PBS/Tweenで3回洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)をコンジュゲートしたストレプトアビジンを添加し、混合物を1時間RTでインキュベートする。複合体をABTS溶液の添加によって検出することができ、HRPを介する基質変換を、ELISAリーダーを用いてOD 405 nmで測定する。

【０３３２】

実施例9

サンドイッチELISAを用いた交差阻止の検討

CD38特異的抗体をELISAプレートの表面にコーティングする。プレートに結合した抗体

を、流体相中で過剰のCD38特異的抗体の存在下でビオチン化した可溶型CD38とインキュベートする。PBS/Tweenで洗浄した後、結合したビオチン化CD38を、HRPコンジュゲートしたストレプトアビジンによって1時間RTで検出する。この複合体を(PBS/Tweenで洗浄した後)ABTS溶液の添加によって検出することができ、HRPを介する基質変換を、ELISAリーダーを用いてOD 405 nmで測定する。

【０３３３】

実施例10

免疫組織化学によるヒト組織のパネルとの反応性およびカニクイザル組織との交差反応性

凍結ヒト組織(H. Niessen博士, Free University Medical Center, Amsterdam, The Netherlandsから得た)およびサル組織(Inveresk Research, Glasgow, Scotland)由来の切片を6 μmで切り、終夜風乾した。これらのクライオスタット切片をアセトン中で固定し(RT、10分)、風乾した(およそ5分)。その後、切片を、0.1% $H_2O_2$(pH 5.8；Sigma)を含む1×クエン酸／リン酸緩衝剤とインキュベートして内在性のペルオキシダーゼを阻止した。RTで20分後、切片をPBSおよび0.05% Tween-20(PBST、RT、5分；Riedel de-Haen, Germany)で2回洗浄した。その後、切片をアビジンとインキュベートし(RT、15分；DAKO, Glostrup, Denmark)、PBSTで2回洗浄し、ビオチンとインキュベートして内在性のビオチンを阻止した(RT、15分；DAKO)。切片をPBSTで2回洗浄した後、切片を$PBST^{++}$(10% 正常ヒト血清(NHS, CLB, Amsterdam, Netherlands)および10% 正常ヤギ血清(NGS；DAKO)を補充したPBST)とプレインキュベートした(RT、20分)。プレインキュベーション血清を吸い取った後、切片を2% $PBST^{++}$中で希釈した表示された濃度のFITC標識1次抗体とインキュベートした(RT、60分)。その後、切片を2% $PBST^{++}$中でウサギ抗FITC(1：1000；DAKO)とインキュベートした(RT、30分)。切片をPBSTで洗浄した後、切片を2% $PBST^{++}$中でヤギ抗ウサギビオチン(1：400；DAKO)とインキュベートした(RT、30分)。その後、切片を洗浄し、2% $PBST^{++}$中でSABC-HRP(1：100；DAKO)とインキュベートした(RT、30分)。切片をPBST中で2回洗浄した後、それらをアミノ-エチル-カルバゾル(AEC)現像溶液(50 mM酢酸緩衝剤、pH 4.9、0.01% $H_2O_2$；Riedel-de-Haen)とインキュベートした(RT、10分)。最後に、切片をミリポア$H_2O$中で洗浄し(5分)、ヘマトキシリン(DAKO)で対比染色した。グリセルゲルの使用(37℃)によって、切片をカバースリップで固定し、光学顕微鏡(Axiovision-2；Zeiss, Thornwood, NY, USA)で検討した。

【０３３４】

横紋筋(筋細胞、図12Cおよび13C)、マクロファージ、リンパ球、および形質B細胞(図12Aおよび13A)だけでなく、気管上皮も-003および-005で染色される(図12Bおよび13B)。-024は、同様の横紋筋および気管上皮の染色を有するが、染色はあまり強くない。内皮細胞の染色は、-003(図14D)、-005(14E)、または-024(データは示さない)のいずれを用いても観察されないのに対し、明らかな染色が内皮細胞マーカーCD31(図14A)およびvWF(14B)に対する陽性対照抗体を用いて観察された。抗KLHを陰性対照抗体として用いた(図14C)。-003(図12D)および-024(データは示さない)は、カニクイザルリンパ球様組織と交差反応するが、-005(図13D)は交差反応しない。

【０３３５】

実施例11

フローサイトメトリーによるカニクイザルまたはアカゲザル末梢血単核細胞(PBMC)との交差反応性

5 mlのカニクイザル末梢血(Inveresk Research)を、4.5 mlショック緩衝剤(1.7 mM NH4CL、1 mM EDTA)、40 ml $H_2O$、および450 μl 10% $KHCO_3$を添加することによって、溶解した。溶血後、細胞を遠心分離し(1200 rpm、10分)、PBS中で3回洗浄した。トリパンブルーで細胞を計数した後、細胞をPBS-BSAに再懸濁した($1\times10^6$細胞／ml)。

【０３３６】

17.5 mlのアカゲザル末梢血(BPRC, Rijswijk, The Netherlands)をRPMI 1640で1：1に希釈し、フィコール(1.077 g/ml；BioWhittaker, カタログ.17-829E, ロット番号0148 32)上に重層した。遠心分離後(710 g、RT、20分)、中間相を回収し、RPMI中で2回洗浄した

。最後の洗浄後、細胞を$1\times10^5$細胞／50 μｌ の濃度でRPMI 1640に再懸濁した。

【０３３７】

細胞を96ウェルプレートに移し(100,000 PBMC／ウェル)、FACS緩衝剤(PBS、0.05％ BSA、0.02％ $NaN_3$)中で洗浄し、1次抗体とインキュベートした(4℃、30分)。PBS-BSA中で洗浄後、50 μｌ FITC標識rb抗hIgG(DAKO, Glostrup, Denmark)を添加した(4℃、30分)。最終的に、細胞をFACSチューブ中に150 μｌの総容量で回収した。試料を、FACScalibur(商標)(Becton Dickinson, San Diego, CA, USA)の使用によって測定し、解析した。

【０３３８】

フローサイトメトリーによって、カニクイザルのリンパ球(図15A)および単球(図15B)に対する-003の交差反応性は示されたが、-005の交差反応性は示されなかった。アカゲザルにおいても、-003の交差反応性が単核細胞に対して観察されたが、-005の交差反応性は観察されなかった(図15C)。

【０３３９】

実施例12

内在化実験

CHO-CD38細胞を飽和濃度のFITC標識CD38特異的抗体で染色した(氷上、30分)。(10％ FCSを補充したRPMI 1640中での)細胞の洗浄後、内在化を可能にするために、一方の細胞プールを37℃まで温め、他方のプールを氷上に放置した。数分の間隔(0～120分)で、細胞アリコートを採取し、氷冷PBS-BSAに移して内在化を停止させた。試料をPBS-BSAで2回洗浄した後、EtBr(PBS-BSAに希釈、最終濃度2 mg/ml)を試料に添加し、膜に結合したFITCをクエンチングさせた。蛍光をフローサイトメトリーで測定した。

【０３４０】

図16Aおよび16Bは、-003および-005が37℃で5分以内にCHO-CD38細胞によって内在化されることを示している。

【０３４１】

実施例13

インビボSCIDルシフェラーゼ実験

このモデルでは、腫瘍細胞にホタルルシフェラーゼをトランスフェクトする。マウスへのルシフェリン(Molecular Probes, Leiden, The Netherlands)の投与により、標識細胞を、高感度CCDカメラを用いた生物発光イメージングによってインビボで検出することができる。Wetterwald et al., American Journal of Pathology 160(3), 1143-1153(2002)を参照されたい。

【０３４２】

Daudi細胞にGene Therapy Systems(San Diego, CA)からのgWIZルシフェラーゼをトランスフェクトし、10％ FCS、Pen/Strep、ピルビン酸ナトリウム、および1 μg/mlピューロマイシン(Sigma)を含むRPMI中で培養した。細胞を、ルシフェラーゼ発現(RLU／1×105細胞で表す)についてはルミノメーターで、CD38細胞についてはFACSで解析した。$2.5\times10^6$ルシフェラーゼトランスフェクトDaudi細胞／マウスをSCIDマウスにi.v.注射した。マウスを-003、-005、アイソタイプ対照抗体(HuMab-KLH)、またはリツキシマブ(抗CD20抗体)で処置した。抗体を腹腔内に注射した。4つの処置セッティングを用いた(表4参照)。予防セッティングでは、抗体(100 μg／マウス)および細胞を同時に投与した。治療セッティングIでは、抗体(300 μg／マウス)を細胞の投与7日後に投与した。治療セッティングIIでは、抗体(10 μg／マウス)を細胞の投与14日後に投与した。治療セッティングIIIでは、抗体(100 μg／マウス)を細胞の投与7日後に投与した。イメージングのために、マウスにケタミン／キシラジン／アトロピンの混合物のi.p.注射で麻酔をかけた。合成D-ルシフェリン(ナトリウム塩、Molecular Probes)を25 mg/mlの用量でi.p.で与えた。その後、マウスを軽くて堅い箱の中に置き、3分後、液体窒素冷却型CCD検出器VersArray 1300B(Roper Scientific)を用いてイメージングを開始した。ルシフェラーゼから放射される光子を、5分の露光時間の間ずっと計数した。照明の下で、参照用の白黒の画像を作製した。MetaVueソフトウェア(Universal Imaging社)を、データ収集および画像解析用に用いた。Gra

phPad PRISM 3.02版(Graphpad Software社)を用いた、ニューマン-クールズ事後検定による分散の1方向解析を用いて、グループ間の差の統計的有意性を確証した。

【０３４３】

（表４）インビボルシフェラーゼ実験用の処置セッティング

| 実験セッティング | 抗体処置（細胞接種後の日数） | 抗体用量（μg/マウス） |
|---|---|---|
| 予防セッティング | 0 | 100 |
| 治療セッティング | 7 | 300 |
| 治療セッティング II | 14 | 10 |
| 治療セッティング III | 7 | 100 |

【０３４４】

図17Aおよび17Bは、-003および-005が、抗CD20抗体について観察された阻害と同様に、予防セッティングおよび治療セッティングIにおいて腫瘍細胞の成長を阻害することを示している。両抗体ともアイソタイプ対照抗体よりも有意に良く機能する。また、治療セッティングIIにおいて、CD38抗体はDaudi-luc腫瘍細胞の成長の速度を落とす(図17C)。治療設定IIIにおいて、-003および-024は、Daudi-luc腫瘍細胞成長の明らかな阻害を示している(図17D)。

【０３４５】

実施例14

アポトーシス

製造元の取扱説明書(アネキシン-Vアポトーシスキット, BD Biosciences, Alphen a.d. Rijn, Netherlands)に従って、アポトーシスアッセイを実行した。手短に言えば、CD38 mAbを、5 μg/mlの-003もしくは-005または抗CD20抗体の濃度で、単独かまたは交差遮断rb-抗hIgG(50 μg/ml)の存在下で、$2.5\times10^5$細胞(ルシフェラーゼトランスフェクトDaudi細胞、0.5ml $RPMI^{++}$を含む24ウェルプレート中)に添加した。

【０３４６】

インキュベーション(37℃、5% $CO_2$、20時間)後、細胞を注意深く採取し、結合緩衝剤で洗浄した(1200 rpm、4℃、5分、BD Biosciences)。ペレットを100 μl結合緩衝剤に再懸濁した。その後、5 μlアネキシン-V-FITC(BD Biosciences)および10 μl PI(BD Biosciences)を懸濁液に添加し、15分間 RTでインキュベートした。400 μl結合緩衝剤を添加し、試料を測定した(FL2におけるPI読取り)。アポトーシス細胞の解析用に、全てのアネキシン-V陽性細胞を、CellQuestプロソフトウェア(BD Biosciences)付きのFACScaliburフローサイトメーターを用いたフローサイトメトリーによって計数した。少なくとも10,000事象を解析用に収集した。この集団にはPI陽性細胞とPI陰性細胞の両方が含まれる。

【０３４７】

図18は、-003および-005がアポトーシスを誘導しないことを示している。しかしながら、クロスリンキング後、標的細胞のアポトーシスが観察される。-003は、クロスリンキング後、抗CD20抗体(リツキシマブ)によって誘導されるアポトーシスとよく似たアポトーシスを誘導した。-005は、クロスリンキング後、アポトーシスを誘導することがあまりできなかった。同様の結果が、RAMOS細胞を標的細胞とした場合に得られた(データは示さない)。

【０３４８】

実施例15

RA-SCIDマウスモデルにおける組織移植片B細胞に対する-005の効果

滑膜組織の移植

Charles River Laboratories Nederland(Maastricht, the Netherlands)から購入した、SCIDマウス、系統C. B.-17/lcrCrI-SCID-bg、オス／メス、4～12週、を標準的な温度および照明の条件下でIVCケージの中で飼い、実験室食および水を好きな時に食べさせた。

移植前に、マウス(各実験群に3匹のマウス、0日目)に、比率1：1のケタミン(NIMATEK, EuroVet)およびキシラジン(Rompun, Bayer)の腹腔内注射で麻酔をかけた。手術バサミを用いて皮膚の小さい切開を作った。関節交換手術を受けている関節リウマチのある患者由来の炎症を起こした滑膜組織を、マウスの各脇腹に6つの小さい断片(合計2～3 $mm^3$)の塊として皮下に移植した。Permacolシアノアクリレート接着剤を用いて傷を閉じた。実験の1日目に、炎症を起こした滑膜移植物中のB細胞を調べるために、残りの滑膜組織を解析した。-005(12 mg/kg)または対照抗体(抗KLH、30 mg/kg)を、200 μlの容量で実験の8日目に(i.v.)注射した。実験の最後(14日目)に、マウスを$CO_2$吸入によって屠殺し、滑膜移植片を外植した。移植片のうちの1つを、さらなる免疫組織化学的解析用にOCT化合物(TissueTek, Sacura Finetek Europe)中ですぐに凍結し、別の1つをさらなるRNA解析用に浸漬によって液体窒素中で凍結した。

【０３４９】

免疫組織化学

SuperFrost(Menzel GmbH, Braunschweig)スライド上の5 μM凍結切片を、LEICA CM1900クライオスタットを用いて調製し、-80℃で保存した。融解した切片をアセトン中で10分間固定し、室温で乾燥させ、3×5分PBS中で洗浄した。全工程を室温で行なった。内在性のペルオキシダーゼ活性を、0.3%過酸化水素および0.1%アジ化ナトリウムを補充したPBSとのインキュベーションによって20分間遮断した。スライドを3×5分PBS中で洗浄し、PBS/1% BSA中の10%正常ヒト血清(NHS)/10%正常ウサギ血清(NRbS)と30分間インキュベートした。次に、1% BSA/10% NHS/10% NRbSを補充したPBSに希釈した1次抗体(マウスmAb)を60分間インキュベートした。PBS中での3×2分の洗浄後、(1% BSA/10% NHS/10% NRbSを補充した)PBSに1：50で希釈したHRPコンジュゲート(ヤギ抗マウスIg-HRP；DAKO P0447)を30分間添加した。ペルオキシダーゼシグナルを、TSA(商標)ビオチンシステム(Perkin Elmer Life Sciences, NEL700)を用いて増強した。スライドを3×2分PBS中で洗浄し、増幅緩衝剤に1：1600で希釈したビオチニルチラミドと30分間インキュベートした。PBS中での3×2分の洗浄後、(1% BSAを補充した)PBSに1：400で希釈したストレプトアビジン-HRPを30分間添加した。スライドを3×2分PBS中で洗浄し、DAB溶液(DAKO Cytomation K3465)と5分間インキュベートした。呈色反応を蒸留水で停止させた。最後に、スライドをヘマトキシリン(MERCK)で対比染色し、流水で洗浄し、カイザーのグリセリンおよびカバースリップで覆った。

【０３５０】

染色強度のスコアリング

染色した滑膜組織異種移植片のスコアリングは、2人の熟練の人によって盲式で行なわれた。最初に最も強い切片を一連の切片より選択し、この参照切片に最高スコア8を与えた。その後、その他の切片における染色強度を、参照切片と比べて、0～8の等級でスコアリングした。

【０３５１】

統計解析

染色強度のスコアリングをクラスカル-ワリスの1方向ANOVAによって解析し、その後Graph Pad Prism第4.01版(Graph Pad software社, San Diego, CA, USA)を用いてダンの多重比較検定を行なった。

【０３５２】

図19および図21は、抗CD38陽性形質細胞の数が、-005による処置後に低下するということを示している。抗CD138による形質細胞の染色によって、-005が形質細胞の数の低下を結果的にもらたすことが確認されている(図20および22)。

【０３５３】

実施例16

CD38に対するヒト抗体のコード配列のシークエンシング

RNA調製

トータルRNAを、製造元のプロトコルに従ってRNeasyキット(Qiagen, Westburg, Leusde

n, Netherlands)で、それぞれ、モノクローナル抗体-003、-005、および-024を発現する5×$10^6$細胞のハイブリドーマ細胞株から調製した。

【０３５４】

-003、-005、および-024のcDNA調製

RNAの5'RACE相補的DNA(cDNA)を、製造元のプロトコルに従って、SMART RACE cDNA増幅キット(Clontech)を用いて、100 ngトータルRNAから調製した。

【０３５５】

オリゴヌクレオチドプライマーは、Isogen Bioscience(Maarssen, The Netherlands)によって合成および定量された。プライマーを100 pmol/μlまで$H_2O$に溶解し、-20℃で保存した。全てのPCRおよびシークエンシングプライマーのまとめを一覧にした(表5)。PCR用に、製造元の取扱説明書に従って、PfuTurbo(登録商標)Hotstart DNAポリメラーゼ(Stratagene, Amsterdam, The Netherlands；製品#600322)を用いた。各反応混合液は、(ポリメラーゼを供給した)PCR反応緩衝剤を含む30 μlの全容量中に、200 μMの混合dNTP(Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands；製品#1814362)、12 pmolのリバースプライマー($V_H$3003-005用のRACEG1A1、$V_H$3003-003用の$RACEV_HApaI$、ならびに$V_L$3003-003および-005用の$RACEV_LBsiWI$)、7.2 pmol UPM-混合液(UPM-混合液：2 μMの短いUPMH3および0.4 μMの長いUPMH3)、0.6 μlの5'RACE cDNA鋳型、ならびに1.5ユニットのPfuTurbo(登録商標)Hotstart DNAポリメラーゼを含んだ。PCR反応を、TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra, Goettingen, Germany；製品# 050-801)で35サイクルプログラム：95℃で2分間の変性；35サイクルの95℃ 30秒間、55℃ 30秒間、および72℃ 1.5分間；72℃で10分間の最終伸長を用いて実行した。適当な場合、PCR混合液をさらなる解析または処理まで4℃で保存した。

【０３５６】

（表５）プライマー

| 名称 | 配列 |
|---|---|
| ShortUPMH3 | TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGC |
| $RACEV_LBsiWi$ | GAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACCGTACG |
| $RACEV_HApaI$ | GGAGGGTGCCAGGGGGAAGACCGATGGGCCCTT |
| RACEG1A1 | GGGAGTAGAGTCCTGAGGACTG |
| M13reverse | GGATAACAATTTCACACAGG |
| LongUPMH3 | TGAAAGCTTCTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT |
| HCseq5 | GGTCAGGGCGCCTGAGTTCCACG |
| VH3003-003for | GATAAGCTTGCCGCCACCATGGACTGGACCTGGAGGTTCCTC |
| VH3003-5for | GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAGTTTGGGCTGAGCTGGCTT |
| VL3003-5exfor | GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTC |
| VL3003-003for | GATAAGCTTGCCGCCACCATGAGGGTCCTCGCTCAGCTCCTG |
| VH300324exfor | GATAAGCTTGCCGCCACCATGGGGTCAACCGCCATCCTCGCC |
| VL3003-24-5exfor | GATAAGCTTGCCGCCACCATGGAAGCCCCAGCTCAGCTTCTC |

【０３５７】

pGEMT-ベクターシステムIIにおける-003-2F5 $V_H$および$V_L$ならびに-005 $V_L$ならびに-024 $V_H$および$V_L$のクローニング

反応産物を、電気泳動によって1% TAEアガロースゲルで分離し、エチジウムブロマイドで染色した。正確なサイズのバンドをゲルから切り出し、DNAをQiaexIIゲル抽出キット(Qiagen, カタログ番号20021)を用いてアガロースから単離した。

【０３５８】

200 μM dATPおよび2.5ユニットAmplitaq(Perkin Elmer)との10分72℃のインキュベーションにより、ゲルから単離したPCR断片にA尾部を付け、ミニエルート(minielute)カラム(Qiagen)を用いて精製した。A尾部のあるPCR断片を、pGEMT easyベクターシステムIIキットおよびプロトコル(LJ270, 3/4頁)を用いて、pGEMTeasyベクター(Promega)にクローニングした。2 μlのライゲーション混合物をOneShot DH5αT1Rコンピテント大腸菌(Invitrogen)に形質転換し、LB/Amp/IPTG/Xgalプレートにプレーティングした。

【０３５９】

配列解析

それぞれ20($V_H$-003)、16($V_L$-003)、15($V_L$-005)、ならびに6(VHおよびVL-024)の白コロニーを拾い、プラスミドを単離し、M13リバースプライマーで配列解析した後、AGOWA(Berlin, Germany)によって-003および-024のV領域ならびに-005 $V_L$領域を配列解析した。-005 $V_H$領域は、プライマーHCseq5を用いることによりPCR産物に対して直接配列解析した。配列は、Vector NTI改良型一式(Invitrogen)を用いて解析した。

【０３６０】

抗体-003、-005、-024、およびMorphosys抗体3079のための発現ベクターの作製

-003の$V_H$コード領域を、pConG1f0.4(Lonza Biologics, Slough, UK)へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびApaI)ならびに理想的Kozak配列(GCCGCCACC)を導入した、プライマーVH3003-003forおよびRACEVHApaIを用いて、-003の$V_H$領域を含むpGemTプラスミドクローンからPCRで増幅した。pConG1f0.4ベクターは、ヒトIgG1の重鎖定常領域を含む。$V_H$ PCR断片を、HindIIIおよびApaIを用いて、インフレームで、pConG1f0.4ベクターに挿入した。コンストラクトを配列解析によって調べた。

【０３６１】

-005の$V_H$コード領域を、pConG1f0.4へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびApaI)ならびに理想的Kozak配列を導入した、プライマーVH3003-5forおよびRACEVHApaIを用いて、-005の$V_H$領域を含むpGemTプラスミドクローンからPCRで増幅した。$V_H$ PCR断片を、HindIIIおよびApaIを用いて、インフレームで、pConG1f0.4ベクターに挿入した。コンストラクトを配列解析によって調べた。

【０３６２】

-024の$V_H$コード領域を、pConG1f0.4へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびApaI)ならびに理想的Kozak配列を導入した、プライマーVH300324exforおよびRACEVHApaIを用いて、-024の$V_H$領域を含むpGemTプラスミドクローンからPCRで増幅した。$V_H$ PCR断片を、HindIIIおよびApaIを用いて、インフレームで、pConG1f0.4ベクターに挿入した。コンストラクトを配列解析によって調べた。

【０３６３】

Morphosys抗体3079の$V_H$コード領域を、特許国際公開公報第2005/103083 A2号に公表されたデータに基づき、GeneArt(Regensburg, Germany)で合成した。コード領域は、発現レベルを向上させるためにHEK細胞での発現用にコドン最適化し、pConG1f0.4へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびApaI)ならびに理想的Kozak配列を導入した。合成VH領域を含むプラスミドをApaIおよびHindIIIで消化し、VH断片を、インフレームで、pConG1f0.4ベクターに挿入した。

【０３６４】

-005の$V_L$コード領域を、pConKappa0.4(Lonza Biologics)へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびPfl23II)ならびに理想的Kozak配列を導入した、プライマーVL3003-5exforおよびRACEVLBsiWIを用いて、-005の$V_L$領域を含むpGemTプラスミドクローンからPCRで増幅した。pConKappa0.4ベクターは、カッパ軽鎖定常領域を含む。$V_L$ PCR断片を、HindIIIおよびPfl23IIを用いて、インフレームで、pConKappa0.4ベクターに挿入した。コンストラクトを配列解析によって調べた。

【０３６５】

-003の$V_L$コード領域を、pConKappa0.4へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびPfl23II)ならびに理想的Kozak配列を導入した、プライマーVL3003-003forおよび

RACEVLBsiWIを用いて、-003の$V_L$領域を含むpGemTプラスミドクローンからPCRで増幅した。$V_L$ PCR断片を、HindIIIおよびPfl23IIを用いて、インフレームで、pConKappa0.4ベクターに挿入した。コンストラクトを配列解析によって調べた。

【０３６６】

-024の$V_L$コード領域を、pConKappa0.4へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびPfl23II)ならびに理想的Kozak配列を導入した、プライマーVL3003-24-5exforおよびRACEVLBsiWIを用いて、-024の$V_L$領域を含むpGemTプラスミドクローンからPCRで増幅した。$V_L$ PCR断片を、HindIIIおよびPfl23IIを用いて、インフレームで、pConKappa0.4ベクターに挿入した。コンストラクトを配列解析によって調べた。

【０３６７】

特許国際公開公報第2005/103083号に公表されたデータに基づき、GeneArtで、Morphosys抗体3079の$V_L$コード領域を合成した。コード領域は、発現レベルを向上させるために；HEK細胞での発現用にコドン最適化し、pConKappa0.4へのクローニングのための好適な制限部位(HindIIIおよびPfl23II)ならびに理想的Kozak配列を導入した。合成$V_L$領域を含む、プラスミドをPfl23IIおよびHindIIIで消化し、VH断片を、インフレームで、pConKappa0.4ベクターに挿入した。

【０３６８】

それらの重鎖および軽鎖のベクターをコトランスフェクトすることによって、実施例17に記載されたように、抗体をHEK-293F細胞で一過性に発現させた。

【０３６９】

CHO-K1SV細胞における安定細胞株の作製

安定細胞株の作製のために、-003または-005の重鎖および軽鎖のベクターを、標準的なクローニング技術によって、1つの2遺伝子ベクター中で組み合わせた。

【０３７０】

-003または-005の2重遺伝子ベクターを線状化し、本質的に製造元によって記載されたように、CHO-K1SV(Lonza Biologics)細胞にトランスフェクトした。安定細胞株を、Lonza Biologicsによって記載されたように、25 μM L-メチオニンスルホキシミン(MSX)による選択によって選択した。最高の産生クローンをCD-CHO(Invitrogen)培地中で選択し、繁殖させ、実施例3に記載されたように、抗体を細胞培養培地から精製した。

【０３７１】

実施例17

部位特異的突然変異生成を用いたエピトープマッピング

オリゴヌクレオチドプライマーは、Isogen Bioscience(Maarssen, The Netherlands)によって合成および定量された。プライマーを100 pmol/μlまで$H_2O$に溶かし、-20℃で保存した。全てのPCRおよびシークエンシングプライマーのまとめを表6に示す。PCRのために、製造元の取扱説明書に従って、PfuTurbo(登録商標)Hotstart DNAポリメラーゼ(Stratagene, Amsterdam, The Netherlands)を用いた。各反応混合液は、20 μlの全容量の(ポリメラーゼを補充した)PCR反応緩衝剤中に、200 μMの混合dNTP(Roche Diagnostics, Almere, The Netherlands)、10 pmolのフォワードおよびリバース両方のプライマー、100 ngのゲノムDNAまたは1 ngのプラスミドDNA、ならびに1ユニットのPfuTurbo(登録商標)Hotstart DNAポリメラーゼを含んだ。PCR反応を、TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra, Goettingen, Germany)で32サイクルプログラム、95℃で2分間の変性；30サイクルの95℃ 30秒間、60～70℃勾配(または別の特定のアニーリング温度) 30秒間、および72℃ 3分間；72℃で10分間の最終伸長を用いて実行した。適当な場合、さらなる解析または処理までPCR混合物を4℃で保存した。

【０３７２】

50 mlのゲルを用いて、1×Tris酢酸EDTA緩衝剤中で、Sambrook(Sambrook, Russell et al. 2000)に従って、アガロースゲル電気泳動を行なった。ゲルにエチジウムブロマイドを含め、UV光の下で観察することによって、DNAを可視化した。ゲルの画像をCCDカメラおよび画像解析システム(GeneGnome；Syngene, via Westburg B.V., Leusden, The Netherl

ands)で記録した。

【０３７３】

所望のPCR断片の精製を、製造元の取扱説明書に従って、MinElute PCR Purification Kit(Qiagen, via Westburg, Leusden, The Netherlands；製品# 28006)を用いて実行した。単離したDNAをUV分光法によって定量し(下記参照)、その品質をアガロースゲル電気泳動によって評価した。

【０３７４】

あるいは、(例えば複数の断片が存在する場合には)PCR産物または消化産物を、1% Tris酢酸EDTAアガロースゲルを用いてアガロース電気泳動によって分離した。所望の断片をゲルから切り出し、製造元の取扱説明書に従って、QIAEX II Gel Extraction Kit(Qiagen；製品# 20051)を用いて回収した。

【０３７５】

核酸の光学密度を、製造元の取扱説明書に従ってNanoDrop ND-1000分光光度計(Isogen Life Science, Maarssen, The Netherlands)を用いて決定した。DNA濃度を、260 nm(1 $OD_{260\ nm}$単位＝50 μg/ml)での光学密度(OD)の解析によって測定した。全ての試料について、核酸を溶かす緩衝剤を参照として用いた。

【０３７６】

制限酵素および補充物をNew England Biolabs(Beverly, MA, USA)またはFermetas(Vilnius, Lithuania)から入手し、製造元の取扱説明書に従って用いた。DNA(100 ng)を、10 μlの最終容量の適当な緩衝剤中で5ユニットの酵素で消化した(適当な場合には、反応容量をスケールアップした)。消化物を推奨される温度で最低60分間インキュベートした。適合しない緩衝剤または温度要求性を必要とする制限酵素による2重消化を要求する断片については、消化を順次行なった。必要な場合、消化産物をアガロースゲル電気泳動およびゲル抽出によって精製した。

【０３７７】

DNA断片のライゲーションを、製造元の取扱説明書に従ってQuick Ligation Kit(New England Biolabs)によって行なった。各ライゲーションについて、ベクターDNAをおよそ3倍のモル過剰のインサートDNAと混合した。

【０３７８】

プラスミドDNA(1～5 μlのDNA溶液、典型的には2 μlのDNAライゲーション混合液)を、製造元の取扱説明書に従って、熱ショック法を用いてOne Shot DH5α-$T1^R$大腸菌細胞(Invitrogen, Breda, The Netherlands；製品# 12297-016)に形質転換した。次に、細胞を、50 μg/mlアンピシリンを含むルリア-ベルターニ(LB)寒天プレートにプレーティングした。プレートを、細菌コロニーがはっきりとするまで、37℃で16～18時間インキュベートした。

【０３７９】

ThermoStart PCR Master Mix(Abgene, via Wetsburg, Leusden, The Netherlands；製品# AB-938-DC15/b)ならびにプライマーpConG1seq1およびpEE13.4seqrev2(表6)を用いたコロニーPCRにより、所望の配列を含むベクターの存在について細菌コロニーをスクリーニングした。選択したコロニーを20 μlピペット先端に軽く触れさせ、小規模培養用の2 ml LB中に短く触れさせ、その後PCR混合液に再懸濁した。PCRを、TGradient Thermocycler 96で35サイクルプログラム：95℃で15分間の変性；35サイクルの94℃ 30秒間、55℃ 30秒間、および72℃ 2分間；続いて72℃で10分の最終伸長工程を用いて行なった。適当な場合、PCR混合物を、アガロースゲル電気泳動による解析まで4℃で保存した。

【０３８０】

プラスミドDNAを、製造元の取扱説明書に従って、Qiagen(via Westburg, Leusden, The Netherlands)からの以下のキットを用いて大腸菌培養から単離した。バルクのプラスミド調製(50～150 ml培養)のために、HiSpeed Plasmid Maxi Kit(製品# 12663)またはHiSpeed Plasmid Midi Kit(製品# 12643)のいずれかを用いた。小規模のプラスミド調製(±2 ml培養)ために、Qiaprep Spin Miniprep Kit(製品# 27106)を用い、DNAを50 μl溶出緩衝

剤(キットに供給されている)中で溶出した。

【０３８１】

HA-CD38発現ベクターpEE13.4HACD38の構築

プライマーcd38forhaおよびcd38exrevを用いて、ヒトCD38の細胞外ドメインを(M. Glennie教授, Tenovus Research Laboratory, Southampton General Hospital, Southampton, UKから得た)プラスミドpCIpuroCD38から増幅した。このPCR反応によって、HA-タグが導入された。このPCR産物を、プライマーSPHMM38exおよびcd38exrevを用いた第2のPCR反応のための鋳型として用いた。このPCR反応によって、シグナルペプチドSPHMM、制限部位、および最適発現のための理想的Kozak配列(GCCGCCACC)が導入された。精製後、このPCR断片を発現ベクターpEE13.4(Lonza Biologics)にクローニングし、完全コード配列を、プライマーpConKseq1、pEE13.4seqrev、cd38seq1for、およびcd38seq2rev(表6)を用いたシークエンシングによって確認した。このコンストラクトをpEE13.4HACD38と名付けた。

【０３８２】

部位特異的突然変異生成

位置237でTがAに突然変異しているか(T237A、配列番号：32)、位置272でQがRに突然変異しているか(Q272R、配列番号：33)、または位置274でSがFに突然変異している(S274F、配列番号：34)、huCD38の3つの単一突然変異体タンパク質を構築した。製造元の取扱説明書に従ってQuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit(Stratagene, Amsterdam, The Netherlands)を用いて部位特異的突然変異生成を行なった。この方法には、成功した突然変異生成をスクリーニングするためのサイレントの余分な制限部位の導入または制限部位の損失が含まれる(T237A突然変異体については余分なXba1部位、Q272R突然変異体については余分なBcg1、およびS274F突然変異体についてはSsp1部位の損失)。簡潔には、5 μlの10×反応緩衝剤、1 μlのオリゴヌクレオチドHACD38T237Afor2、HACD38Q272Rfor、またはHACD38S274Ffor(100 pmol/μl)、1 μlのオリゴヌクレオチドHACD38T237Arev2、HACD38Q272Rrev、またはHACD38S274Frev(100 pmol/μl)、1 μlのdNTPミックス、3 μlのQuick溶液、1 μlのプラスミドpEE13.4HACD38(50 ng/μl)、および1 μlのPfuUltra HF DNAポリメラーゼを、50 μlの全容量中で混合し、TGradient Thermocycler 96(Whatman Biometra, Goettingen, Germany；製品# 050-801)で18サイクルプログラム：95℃で1分間の変性；18サイクルの95℃ 50秒間、60℃ 50秒間、および68℃ 10分間を用いて増幅した。PCR混合物を、さらなる処理まで4℃で保存した。次に、PCR混合物を37℃で60分間、1 μl DpnIとインキュベートして、pEE13.4HACD38 WTベクターを消化し、さらなる処理まで4℃で保存した。反応混合物を5 μlの3M NaAcおよび125 μlエタノールで沈殿させ、-20℃で20分間インキュベートし、14000×gで4℃で20分間スピンダウンした。DNAペレットを70%エタノールで洗浄し、乾燥させ、4 μlの水に溶かした。合計4 μlの反応容量を、製造元の取扱説明書(Invitrogen)に従って、One Shot Top 10DH5αT1$^{R}$コンピテント大腸菌細胞(Invitrogen, Breda, The Netherlands)に形質転換した。次に、細胞を、50 μg/mlアンピシリンを含むルリア-ベルターニ(LB)寒天プレートにプレーティングした。細菌コロニーがはっきりとするまで37℃で16～18時間インキュベートした。プライマーpConG1seq1およびpEE13.4seqrev2(表5)を用いたコロニーPCRによってコロニーをスクリーニングし、関連する制限酵素で消化して、突然変異原性オリゴヌクレオチドの取込みをスクリーニングした。各突然変異体について2つの陽性クローンを成長させ、プラスミドDNAを単離した。完全なHACD38コード配列を、プライマーcd38seq1for、pConG1seq1、およびpEE13.4seqrev2を用いて決定し、突然変異の存在および付加的な望まない突然変異の不在を確認した。

【０３８３】

DNAシークエンシング

配列解析のために、プラスミドDNA試料をAGOWA(Berlin, Germany)に送付した。VectorNTI改良ソフトウェア(Informax, Oxford, UK)を用いて、配列を解析した。

【０３８４】

HEK-293F細胞における一過性発現

Freestyle(商標)293-F(懸濁による成育および化学的に規定されたFreestyle培地に適応

したHEK-293サブクローン、(HEK-293F))細胞をInvitrogenから入手し、293fectin(Invitrogen)を用いて、製造元のプロトコルに従って、pEE13.4HACD38ならびに突然変異T237A、Q272R、およびS274Fを持つ3つのコンストラクトをトランスフェクトした。トランスフェクトされた細胞の培養上清をELISAで抗CD38結合検討のために用いた。

【０３８５】

抗CD38抗体結合

ELISAプレート(Greiner, #655092)を、1 μg抗HA抗体(Sigma, #H-9658)4℃でO/Nでコーティングし、その後2%ニワトリ血清でブロッキングした。トランスフェクトされたHEK293F細胞の培養上清を希釈し、ELISAプレートに適用し、RTで1時間インキュベートした。洗浄後、HuMab -003および-005の段階希釈を添加し、RTで1時間インキュベートした。結合した抗体をHRPコンジュゲートしたヤギ抗ヒトIgG抗体で検出した。アッセイをABTS(Roche, # 1112597)で発色させ、分光光度計を用いて405nmで吸収を測定した。

【０３８６】

図23A～23Cから見ることができるように、-003および-005の両方とも野生型ヒトCD38に結合する。-003の結合は、突然変異T237A(図23A)、Q272R(図23B)、およびS274F(図23C)の導入によって影響を受けなかった。-005は、突然変異T237Aを持つCD38に結合することができた(図23A)。-005の突然変異Q272RがあるCD38への結合は、$EC_{50}$および最大結合能力の両方に関して、大きく影響を受けた(図23B)。-005は位置274のセリンがフェニルアラニンによって置き換えられている突然変異体CD38に結合することができなかった(図23C)。

【０３８７】

これらのデータは、-003および-005が異なるエピトープに結合することを示している。さらに、これらの検討により、-005のCD38への結合が位置272および274における突然変異に感受性であることが明らかになった。特に、S274はCD38への-005結合に必須である。

【０３８８】

（表６）プライマー

| 名称 | 配列 |
|---|---|
| cd38forha | CTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCCTACCCTTACGACGTGCCTGACTACGCCAGGTGGCGCCAGACGTGGAGC |
| cd38exrev | AGGTCAGGTACCTCAGATCTCAGATGTGCAAG |
| SPHMM38ex | TATAGCCCGGGGCCGCCACCATGTGGTGGCGCCTGTGGTGGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGCTGTGGCCCATGGTGTGGGCC |
| pConG1seq1 | GAAGACTTAAGGCAGCGGCAGAA |
| pConKseq1 | GTAGTCTGAGCAGTACTCGTTGC |
| pEE13.4seqrev | TGCATTCATTTTATGTTTCAGGT |
| pEE13.4seqrev2 | TCGGACATCTCATGACTTTCTTT |
| cd38seq1for | AGGACACGCTGCTAGGCTACCTT |
| cd38seq2rev | GTCCTTTCTCCAGTCTGGGCAAG |
| HACD38T237Arev2 | TCCACCATGTATCACCCAGGCCTCTAGAGCCTGAACCTTCTCTGGTTG |
| HACD38T237Afor2 | CAACCAGAGAAGGTTCAGGCTCTAGAGGCCTGGGTGATACATGGTGGA |
| HACD38Q272Rrev | GATATTCTTGCAGGAAAATCGAATATTCCTTTTGCTTAT |
| HACD38Q272Rfor | ATAAGCAAAAGGAATATTCGATTTTCCTGCAAGAATATC |
| HACD38S274Frev | TCTGTAGATATTCTTGCAGAAAAATTGAATGTTCCTTTTGCTTATA |
| HACD38S274Ffor | TATAAGCAAAAGGAACATTCAATTTTTCTGCAAGAATATCTACAGA |

【０３８９】

実施例18

PBMCの増殖の誘導

-003、-005、および-024を、本質的にAusiello et al., Tissue antigens 56, 538-547(2000)に記載されたようなアッセイで検査した。簡潔には、健常ドナー由来PBMCを、200

μl RPMI$^{++}$中の抗体(最終濃度：1.1-3.3-10-30 μg/ml)の存在下で、平底96ウェルプレート中に1×10$^5$細胞／ウェルで培養した。IL-15(333 ng/ml；Amgen社, Thousand Oaks, CA, USA)による細胞の刺激を陽性対照として用いた。37℃で4日間のインキュベーション後、30 μlの$^3$H-チミジン(16.7μCi/ml)を添加し、培養をO/Nで続けた。$^3$H-チミジン取込みを、製造元の取扱説明書に従って、Packard Cobraガンマカウンター(Packard Instruments, Meriden, DT, USA)を用いて評価した。データを、10人のドナーから得られたPBMCの平均cpm(±SEM)として示す。本結果は、-003および-005が顕著なPBMCの増殖を誘導しないということを示している(図24A)。また、-024も顕著なPBMCの増殖を誘導しなかった(データは示さない)。

【０３９０】

実施例19

IL-6の誘導

-003、-005、および-024を、Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547(2000)に記載されたようなアッセイで検査した。簡潔には、PBMCを、500 μl RPMI$^{++}$中の20 μg/mlの抗体および10 ng/ml LPS(Sigma-Aldrich Chemie, Zwijndrecht, The Netherlands)の存在下で、48ウェルプレート中に1×10$^6$細胞／ウェルで培養した。37℃でのO/Nインキュベーション後、上清を採取し、-20℃で保存した。IL-6濃度を、製造元の取扱説明書に従ってELISA(IL-6 ELISAキット, U-CyTech Biosciences, Utrecht, The Netherlands)で評価した。データを7人のドナーからのpg/ml(±SEM)の平均濃度として示す。本結果は、-003および-005が顕著なIL-6レベルの放出を誘導しないということを示している(図24B)。また、-024も顕著なIL-6レベルの放出を誘導しなかった(データは示さない)。

【０３９１】

実施例20

IFN-γの放出の誘導

-003、-005、および-024を、Ausiello et al., Tissue antigens 56, 538-547(2000)に記載されたようなアッセイで検査した。簡潔には、PBMCを、500 μl RPMI$^{++}$中の20 μg/mlの抗体および1 μg/ml OKT-3(Sanquin, Amsterdam, The Netherlands)の存在下で、48ウェルプレート中に1×10$^6$細胞／ウェルで培養した。37℃でのO/Nインキュベーション後、上清を採取し、-20℃で保存した。IFN-γ濃度を、製造元の取扱説明書に従ってELISA(IFN-γ ELISAキット, U-CyTech Biosciences, Utrecht, The Netherlands)で評価した。データを、9人のドナーからのpg/ml(±SEM)の平均濃度として示す。本結果は、-003および-005が検出可能なIFN-γレベルの放出を誘導しないということを示している(図24C)。また、-024も顕著なIFN-γレベルの放出を誘導しなかった(データは示さない)。

【０３９２】

実施例21

-003および-005の組換えCD38への結合の親和性

-003および-005のCD38への結合を、表面プラズモン共鳴を用いて検査した。簡潔には、精製抗体を、アミンカップリングを介してCM-5センサーチップ(Biacore, Uppsala, Sweden)上に固相化した。HAタグ付きCD38(実施例3参照)を一面に流し、抗原のmAbへの結合を、Biacore 3000(Biacore)を用いてチップの表面における屈折率の変化によって検出した。-003(表7)および-005(表8)についての会合定数および速度定数は、3回の実験の平均±SDとして以下にまとめられており、-003および-005の両方がCD38に対する高い親和性を有するということを示している。

【０３９３】

（表７）25℃における会合定数および速度定数

| | -003 |
|---|---|
| $k_a$ (1/Ms) | $2.17x10^5 \pm 2.65x10^4$ |
| $k_d$ (1/s) | $1.9x10^{-4} \pm 4.51x10^{-6}$ |
| $K_A$ (1/M) | $1.14x10^9 \pm 1.58x10^8$ |
| $K_D$ (M) | $8.85x10^{-10} \pm 1.2x10^{-10}$ |

【０３９４】

（表８）25℃における会合定数および速度定数

| | -005 |
|---|---|
| $k_a$ (1/Ms) | $8.88x10^4 \pm 1.95x10^4$ |
| $k_d$ (1/s) | $5.22x10^{-4} \pm 1.16x10^{-5}$ |
| $K_A$ (1/M) | $1.7x10^8 \pm 3.68x10^7$ |
| $K_D$ (M) | $6.06x10^{-9} \pm 1.21x10^{-9}$ |

【０３９５】

実施例22

エピトープマッピング

PEPSCAN法を用いたエピトープマッピング

公知の手順(Geysen et al. 1984. Use of peptide synthesis to probe viral antigens for epitopes to a resolution of a single amino acid. Proc Natl Acad Sci USA 81：3998；Slootstra et al. 1996. Structural aspects of antibody-antigen interaction revealed through small random peptide libraries. Mol Divers 1：87；Puijk et al. 2001. Segment synthesis. In PCT, The Netherlands, p.1.)に従って、ヒトCD38のC末端の138アミノ酸を網羅する、重複する20-merの線状ペプチドおよび15-merのループ状ペプチドを合成した。さらに、C末端の配列に基づいて、領域

KNIYRPDKFLQCVKNPEDSSCTSEI

領域

CVHNLQPEKVQTLEAWVIHGG

および領域

CLESIISKRNIQFSAKNIYRC

を網羅する、異なるサイズの1つのループ状のペプチドを作製した。さらに、余分のセットを設計して、

SKRNIQFSCKNIYR

および

EKVQTLEAWVIHGG

から構成される2重のループ状の領域を再構築した。ネイティブのシステインをアラニンによって置き換えた。ペプチドを、クレジットカード形式の小型PEPSCANカードを用いたELISAアッセイでスクリーニングした。

【０３９６】

ペプチドの合成

ペプチドを標準的なFmoc化学を用いて合成し、捕捉剤を含むTFAを用いて脱保護した。その後、脱保護ペプチドを、アセトニトリル(1：1［容量／容量］)を補充した、重炭酸アンモニウム(20 mM、pH 7.9)中の2,6-ビス(ブロモメチル)ピリジンまたは2,4,6-トリス(ブロモメチル)メシチレンの0.5 mM溶液を用いてマイクロアレイ上で反応させた。溶液中で完全に覆いながら、マイクロアレイを溶液中で30～60分間穏やかに振盪した。最後に、マイクロアレイを過剰のMillipore $H_2O$で徹底的に洗浄し、PBS(pH 7.2)に1％ドデシル硫酸ナトリウム、0.1％ β-メルカプトエタノールを含む破壊緩衝剤中で、70℃で30分間、超音波処理し、その後millipore $H_2O$中でさらに45分間超音波処理した。

【０３９７】

PEPSCAN ELISA-アッセイ

共有結合で連結したペプチドを含む、455-ウェルのクレジットカード形式ポリエチレンカードを(例えば、5％ウマ血清［容量／容量］および5％オボアルブミン［重量／容量］を含むブロッキング溶液に1：1000で希釈した)血清とインキュベートした(4℃、終夜)。洗浄後、ペプチドをウサギ抗ヒトIgペルオキシダーゼ(1：1000希釈、25℃、1時間)とインキュベートし、洗浄後、ペルオキシダーゼ基質(2,2'-アジノ-ジ-3-エチルベンズチアゾリンスルホネートおよび2 μl/ml 3% $H_2O_2$)を添加した。1時間後、色の発色をCCDカメラおよび画像処理システムで測定した。設定は、55 mmレンズ(Sony CCD Video Camera XC-77RR、Nikon micro-nikkor 55 mm f/2.8レンズ)付きのCCDカメラ、カメラアダプター(Sony CameraアダプターDC-77RR)、およびImage Processing Softwareパッケージ Optimas、バージョン6.5からなる(Media Cybernetics, Silver Spring, MD 20910, U.S.A.；Optimasは、ペンティアムIIコンピュータシステム上で動く)。

【０３９８】

エピトープ表示のための方法

個々のアミノ酸をヒトCD38アミノ酸配列における最小の固有の単位を表すジペプチドモチーフによって同定した。検査した1164個のペプチドの各々に存在する全てのジペプチドモチーフに、それぞれのペプチド全体について得られたELISA値を与えた。ジペプチドモチーフを強い結合から弱い結合へと順位付けるために、各々の個々のモチーフについて得られたELISA値を1164個全ての検査した線状ペプチドおよびループ状ペプチドからの平均ELISA値で割ることによって相対的シグナルを計算し、これらを値の減少について選別した。このように、立体構造エピトープに対するアミノ酸寄与を考慮した。検査したmAbの各々について、2.5を上回るスコアのジペプチドモチーフ(すわなち、これらのモチーフを含むペプチドのELISA値は、1164個全てのペプチドについて得られたペプチドの平均ELISA値の少なくとも2.5倍である)を選択した。データをデコンボリュートし、スコアリングシステムによって線状CD38配列上に表示される1アミノ酸寄与を得た。線状CD38配列に沿ってウォーキングし、かつ固有のジペプチド単位を参照点として用いることによって、CD38アミノ酸がこの組の高スコアペプチドに存在する度に、1点を与えた。

【０３９９】

-003、-005、および-024は全てヒトCD38の領域SKRNIQFSCKNIYRおよびEKVQTLEAWVIHGGに結合することが分かった。-003はとりわけモチーフRNIQFおよびWVIHを認識し、-005はとりわけモチーフKRNおよびVQTLを認識した。

【０４００】

実施例23

酵素活性

ヒトCD38の酵素活性を、本質的にGraeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267(1994)に記載されたようなアッセイで測定した。簡潔には、基質$NGD^+$(80 μM)を、20 mM Tris-HCl、pH 7.0を含む緩衝剤中でCD38(0.6 μg/mlのHisタグ付きヒトCD38の細胞外ドメイン、His-CD38の精製に関しては実施例3参照)とインキュベートした。cGDPRの産生を410 nmの放射波長(300 nmでの励起)で分光光度法によってモニタリングすることができる。この実施例では、340 ± 60 nmの励起フィルターおよび430 ± 8 nmの放射フィルターを用いた。

【０４０１】

CD38の酵素活性に対する-003、-005、および-024の効果を検査するために、基質$NGD^+$を添加する前に組換えHis-CD38タンパク質を様々な濃度(30、3、0.3、および0.03 μg/ml)の異なる抗体と室温で15分間プレインキュベートした。サイクリックGDPリボース(cGDPR)の産生を抗体の添加後の異なる時点(3、6、9、12、30、45、60、75、および90分)で記録した。

【０４０２】

図25Bは、-005がcGDPRの産生に対する顕著な阻害効果を有するということを示している。90分後、30および3 μg/ml -005の添加により、32％および34％低下したcGDPRの産生が結果的にもたらされた(表9)。異なるバッチの-005を用いた独立した実験で、同様の結果

が観察された。

【０４０３】

-003(図25B、表9)、-024(図25D、表9)、または抗KLH(図25A、表9)の添加後、cGPDR産生に対する阻害効果は観察されなかった。

【０４０４】

これらの知見に基づいて、-005は、$NAD^+$からのサイクリックADP-リボース(cADPR)の合成を阻害することも期待される。cADPRの合成の阻害は、Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571(2000)に記載されたHPLC法に従って決定することができる。

【０４０５】

（表９）CD38特異的抗体または抗KLHの存在下におけるcGDPリボース産生

| | 産生（NGD対照に対する割合（%）） | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 30 μg/ml | 3 μg/ml | 0.3 μg/ml | 0.03 μg/ml |
| KLH | 110 | 99 | 108 | 111 |
| -003 | 99 | 100 | 107 | 107 |
| -005 | 68 | 66 | 98 | 102 |
| -024 | 99 | 100 | 104 | 105 |

【０４０６】

実施例24

-003および-005のMorphosys抗体3079との比較

抗体-003および-005をMorphosys抗体3079(TH-3079)と機能的に比較した。Morphosys抗体TH-3079のクローニングおよび発現のための方法は実施例16に記載されている。CDCのための方法は実施例6に記載されている。ADCCのための方法は実施例5に記載されている。図26Aは、-005および-003およびTH-3079が、よく似た最大溶解を示して、CDCを介するCD38トランスフェクトCHO細胞の溶解を誘導するということを示している。$EC_{50}$値を比較した場合、-005抗体は、CHO-CD38細胞の溶解を誘導する点でTH3079よりも良く、2倍低い$EC_{50}$を有する(表10参照)。

【０４０７】

図26Bは、-005が、CDCを介するDaudi-ルシフェラーゼ細胞の溶解を誘導する点でTH-3079よりも優れており、-005による最大溶解がTH3079によるよりも2～3倍高いということを示している。$EC_{50}$値を比較した場合、-005抗体は、Daudi-ルシフェラーゼ細胞の溶解を誘導する点でTH-3079とよく似ている(表10参照)。-003は、顕著なCDCを介するDaudi-ルシフェラーゼ細胞の溶解を誘導しない。

【０４０８】

図26Cは、この実験で、-005、-003、およびTH-3079が、ADCCを介してDaudi標的細胞の溶解を仲介することを示している。$EC_{50}$(対数)および最大溶解に差は見出されなかった(表11、n＝5)。

【０４０９】

（表１０）CDCにおけるCD38特異的抗体の最大溶解およびEC50値

| | CHO-CD38 細胞 (n=2) | | Daudi-luc 細胞 (n=2) | |
|---|---|---|---|---|
| | EC50 μg/ml | 最大溶解率（%） | EC50 μg/ml | 最大溶解率（%） |
| -005 | 0.15 ± 0.007 | 76.5 ± 3.54 | 0.39 ± 0.00 | 70.5 ± 7.78 |
| TH-3079 | 0.31 ± 0.021 | 81.5 ± 7.78 | 0.34 ± 0.26 | 25.5 ± 12.02 |
| -003 | 4.5± 0.933 | 62.0 ± 16.79 | nc | 12 ± 8.49 |

【０４１０】

（表１１）ADCCにおけるCD38特異的抗体の最大溶解および$EC_{50}$値

| | Log EC50 | STD log EC50 | 最大溶解(%) | 標準最大溶解 |
|---|---|---|---|---|
| -005 | 0.76 | 0.18 | 49.2 | 12.8 |
| -003 | 1.17 | 0.23 | 64 | 14.2 |
| TH3079 | 0.96 | 0.10 | 43.8 | 12.0 |

【０４１１】

実施例25

細胞に発現したCD38酵素活性の阻害

細胞に発現したヒトCD38の酵素活性を、本質的にGraeff et al., J. Biol. Chem. 269, 30260-30267(1994)に記載されたようなアッセイで測定した。簡潔には、基質NGD(80 μM)を、30 μg/mlのIgG1を補充した20 mM Tris-HCl, pH 7.0を含む緩衝剤中でヒトCD38をトランスフェクトした$10^5$ CHO細胞(CHO-CD38細胞)とインキュベートした。cGDPRの産生は、410 nmの放射波長(300 nm での励起)で分光光度法によってモニタリングすることができる。この実施例では、340 ± 60 nmの励起フィルターおよび430 ± 8 nmの放射フィルターを用いた。

【０４１２】

細胞で発現したCD38の酵素活性に対する-005および-003の効果を検討するために、基質NGDを添加する前にCHO-CD38細胞を様々な濃度(30、3、0.3、および0.03 μg/ml)の異なる抗体と15分間室温でプレインキュベートした。cGDPRの産生を、基質NGDの添加後の異なる時点(3、6、9、12、30、45、60、112、および156分)で記録した。

【０４１３】

156分後、30および3 μg/mlの-005の添加により、21%および18%低下したcGDPRの産生が結果的にもたらされた。-003またはIgG1対照抗体の添加後に、cGPDR産生に対する阻害効果は観察されなかった(表12)。

【０４１４】

（表１２）CD38特異的抗体またはIgG1対照の存在下におけるcGDPリボース産生

| | 産生（NGD対照に対する割合（%）） | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 30 μg/ml | 3 μg/ml | 0.3 μg/ml | 0.03 μg/ml |
| IgG1 control | 104 | 105 | 103 | 104 |
| -003 | 107 | 106 | 107 | 105 |
| -005 | 79 | 82 | 100 | 104 |

【０４１５】

実施例26

EBV形質転換チンパンジーB細胞への抗体-005の結合

採取および計数の後、(Biomedical Primate Research Centre, Department Immunobiology, Rijswijk, The Netherlandsから受け取った)EBV形質転換チンパンジーB細胞を、PBS-BSA(0.1% BSAおよび0.02% アジ化-Naを補充したPBS)に再懸濁した($1\times10^6$ 細胞/ml)。その後、細胞を96ウェルのV底プレート中に置き(100 μl/ウェル)、PBS-BSA中で2回洗浄した。その後、PBS-BSA中の50 μlのFITC標識した-005抗体溶液を細胞に添加した(4℃、30分)。細胞を3回洗浄し、EBV形質転換チンパンジーB細胞への-005の特異的結合をフローサイトメトリーで検出した。FITC標識したHuMab-KLH(本明細書の別の箇所で記載した免疫化プロトコルの使用によりGenmab B.V., Utrecht, The Netherlandsによって作製されたKLH(キーホールリンペットヘモシアニン)に対するヒトモノクローナル抗体)を対照として用いた。図27は、EBV形質転換チンパンジーB細胞への-005の用量依存的な結合を示す。EBV形質転換チンパンジーB細胞への用量依存的な結合は、対照抗体HuMab-KLHでは観察されなかった。

【０４１６】

実施例27

抗体-005のデキサメタゾンおよびボルテゾミブとのインビトロ併用療法

デキサメタゾン(Dex)およびボルテゾミブ(Bor；Velcade(登録商標))を用いる三重の組み合わせセッティングにおいてインビトロで多発性骨髄腫細胞株UM6の細胞死を誘導するその能力について抗体-005を検討した。三重処置の結果を、単一の薬物処置および二重の併用処置と比較した。

【０４１７】

$3\times10^5$ UM6細胞を、培地のみでか、Dex(20 μM)と共にか、Bor(15 pM)と共にか、またはBorおよびDexの組み合わせと共に、終夜37℃でインキュベートした。23時間後、-005(10 μg/ml)を添加し；かつその15分後、正常ヒト血清を添加し、試料をさらに45分間37℃でインキュベートした。最後に、10 μlのヨウ化プロピジウム(PI; Sigma-Aldrich Chemie B.V.; 10 μg/ml)を添加し、細胞溶解を、PI陽性細胞のパーセンテージの測定によってFACS Calibur(商標)(Becton Dickinson)を用いたフローサイトメトリーにより検出した。

【０４１８】

図28に見られるように、三重処置は、単一または二重の併用処置のいずれかで観察される溶解を上回った。この効果は、2回の独立の実験で観察された。

【０４１９】

実施例28

多発性骨髄腫の臨床的診断のある患者を、抗CD38抗体-005、メルファラン、およびプレドニゾンの組み合わせで処置する。

【０４２０】

化合物を以下の投薬スケジュールに従って患者に投与する：

- 抗体-005: 8 mg/kgを週に1回4週間投与する(IV)
- メルファラン: 1日に0.2 mg/kgをIVで4日間4～6週毎に
- プレドニゾン: 2 mg/kgをPOで4日間4～6週毎に。

【０４２１】

血清中のM-タンパク質の減少、骨髄中の形質細胞の数の減少、および尿中のBenze-Jonesタンパク質の減少、ならびに新たな骨溶解性の骨病変の低下／不在で応答を決定する。

【０４２２】

実施例29

多発性骨髄腫の臨床的診断のある患者を、抗CD38抗体-005、サリドマイド、およびデキサメタゾンの組み合わせで処置する。

【０４２３】

化合物を以下の投薬スケジュールに従って患者に投与する：

- 抗体-005: 8 mg/kgを週に1回4週間投与する(IV)
- サリドマイド: 200 mg/日(PO)
- デキサメタゾン:各28日サイクルの1～4、9～12、および17～20日目に40 mg/日(PO)。

【０４２４】

血清中のM-タンパク質の減少、骨髄中の形質細胞の数の減少、および尿中のBenze-Jonesタンパク質の減少、ならびに新たな骨溶解性の骨病変の低下／不在で応答を決定する。

【０４２５】

実施例30

多発性骨髄腫の臨床的診断のある患者を、抗CD38抗体-005、レナリドマイド、およびデキサメタゾンの組み合わせで処置する。

【０４２６】

化合物を以下の投薬スケジュールに従って患者に投与する：

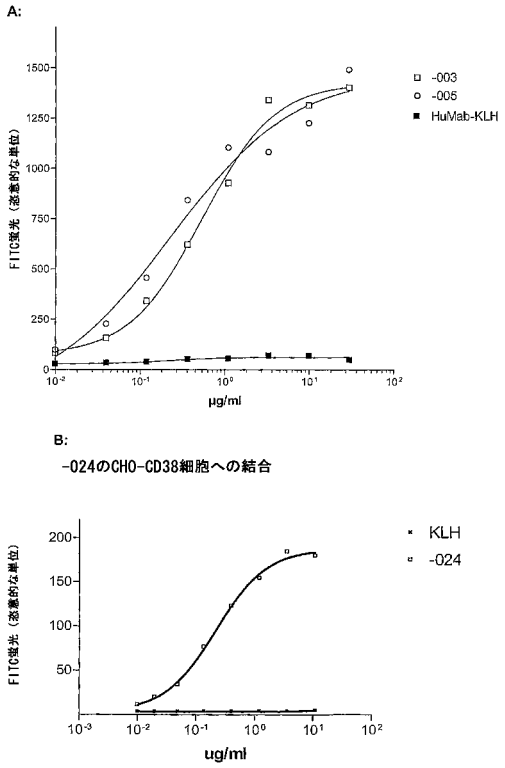
- 抗体-005: 8 mg/kgを週に1回4週間投与する(IV)
- レナリドマイド: 25 mg/日(PO)
- デキサメタゾン: 各28日サイクルの1～4、9～12、および17～20日目に40 mg/日(PO)。

【０４２７】

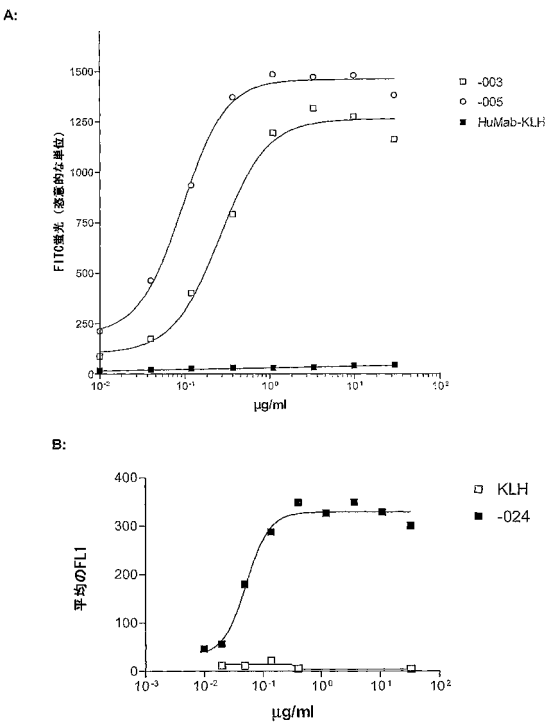
血清中のM-タンパク質の減少、骨髄中の形質細胞の数の減少、および尿中のBenze-Jonesタンパク質の減少、ならびに新たな骨溶解性の骨病変の低下／不在で応答を決定する。

【０４２８】
実施例31
多発性骨髄腫の臨床的診断のある患者を、抗CD38抗体-005、ボルテゾミブ、およびデキサメタゾンの組み合わせで処置する。
【０４２９】
化合物を以下の投薬スケジュールに従って患者に投与する：
- 抗体-005: 8 mg/kgを週に1回4週間投与する(IV)
- ボルテゾミブ: 各21日サイクルの1、4、6、および11日目に1.3 mg/m2(IV)
- デキサメタゾン: 各28日サイクルの1～4、9～12、および17～20日目に40 mg/日(PO)。
【０４３０】
血清中のM-タンパク質の減少、骨髄中の形質細胞の数の減少、および尿中のBenze-Jonesタンパク質の減少、ならびに新たな骨溶解性の骨病変の低下／不在で応答を決定する。

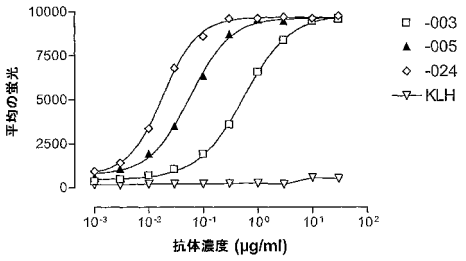
【図１】



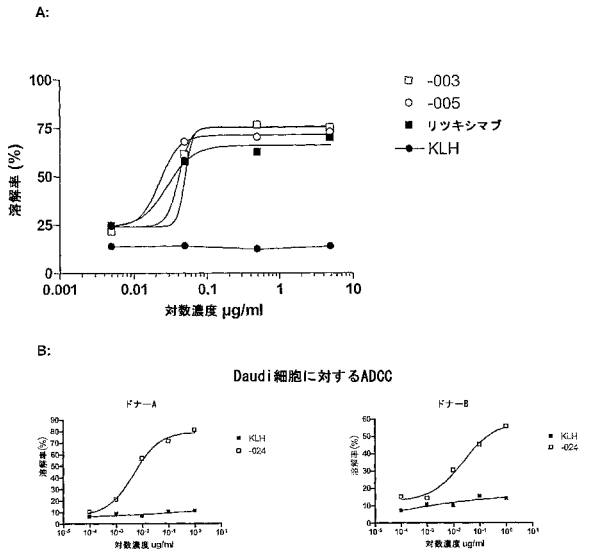

【図２】



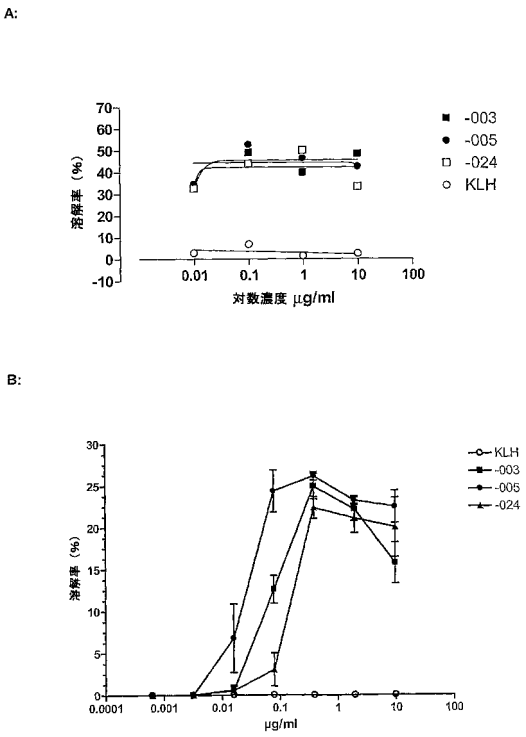
【図３】



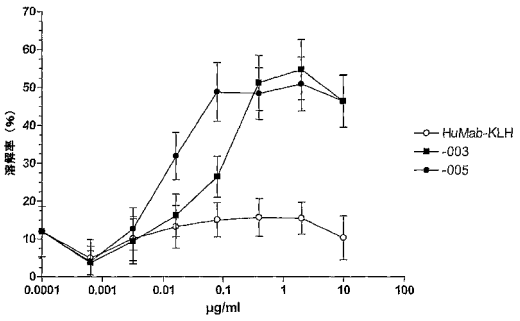

【図４】



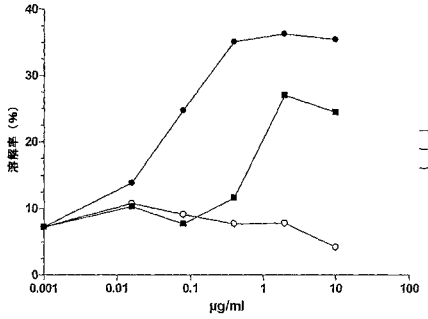

【図５】



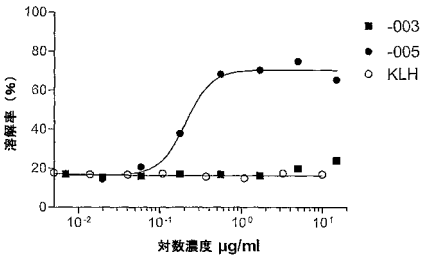

【図６】



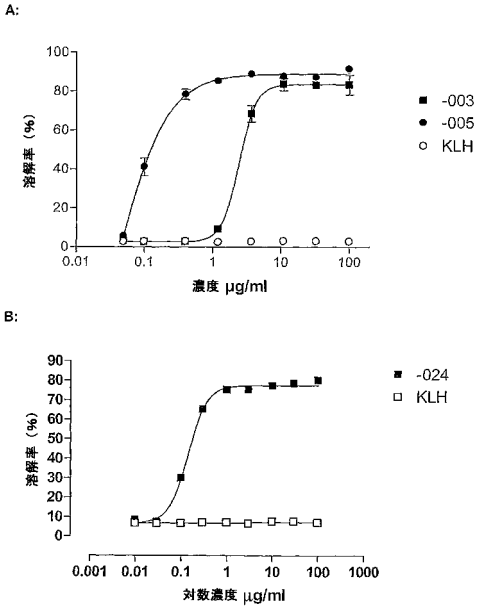

【図７】



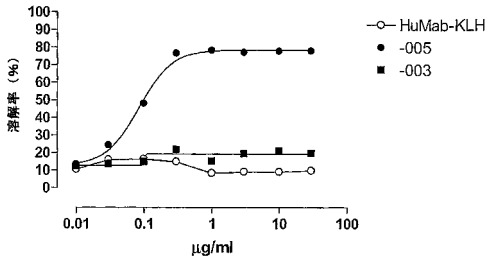

【図８】



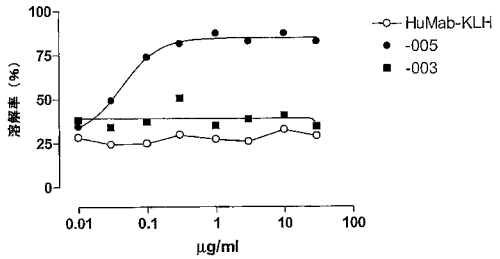

【図９】



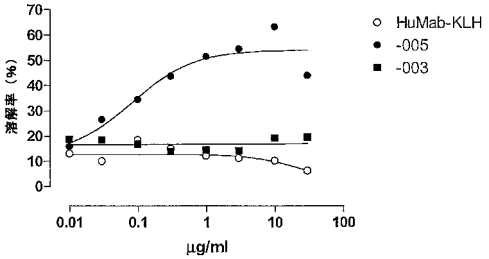
【図１０Ａ】



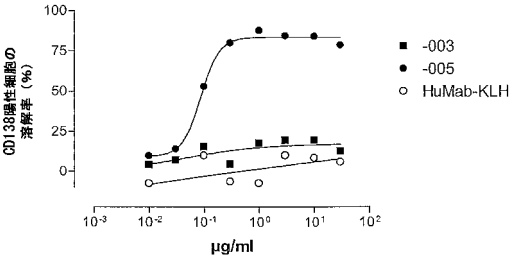

【図１０Ｂ】



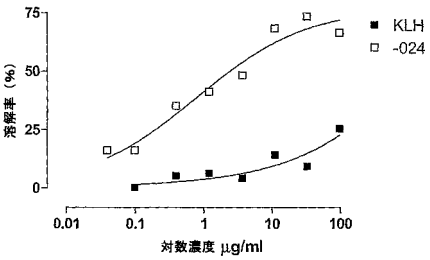

【図１０Ｃ】



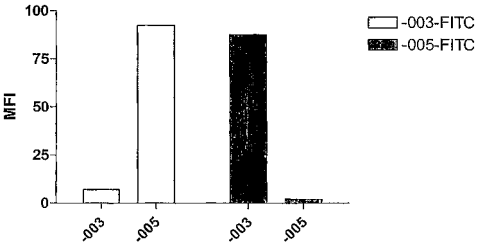

【図１０Ｄ】



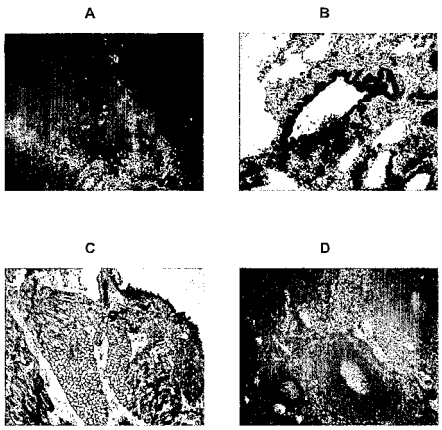

【図１０Ｅ】



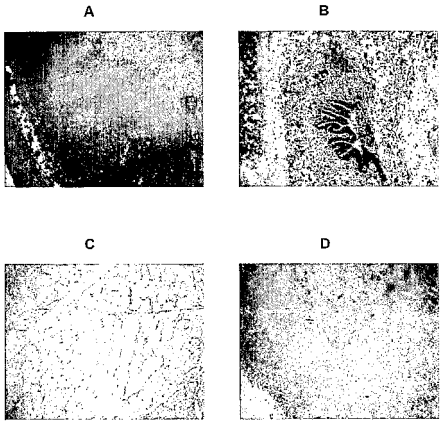

【図１１】



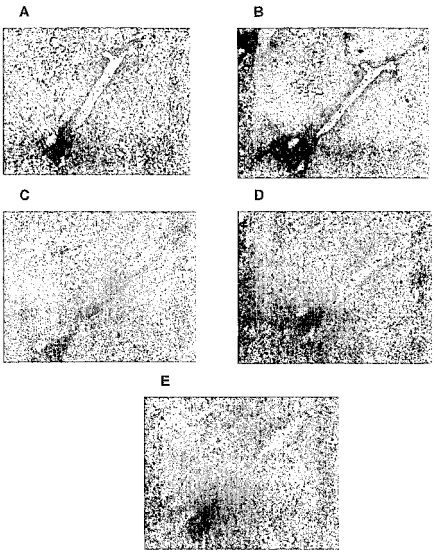

【図１２】



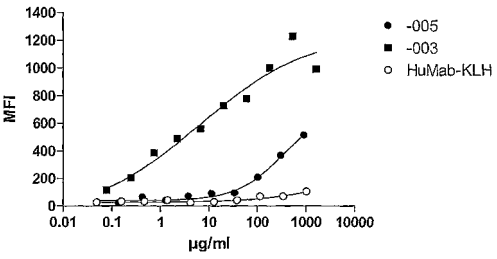

【図１３】



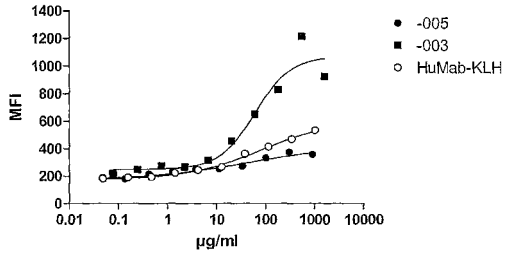

【図１４】



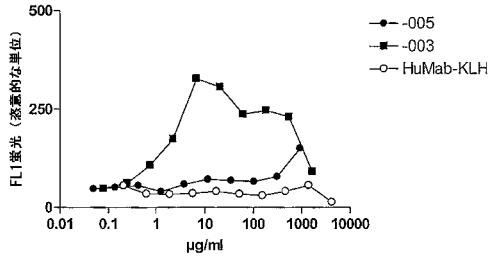

【図１５Ａ】



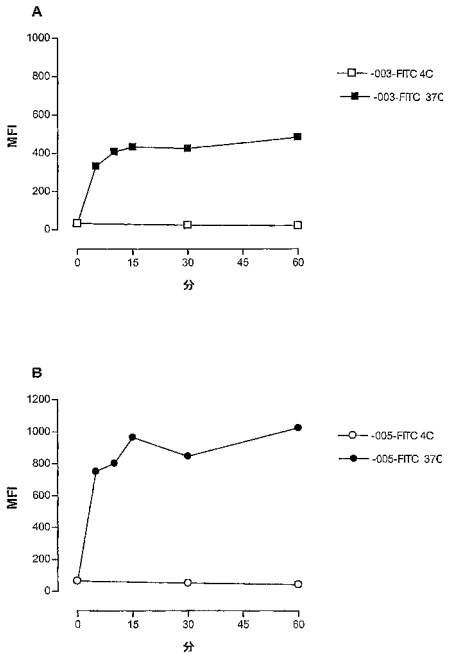
【図１５Ｂ】



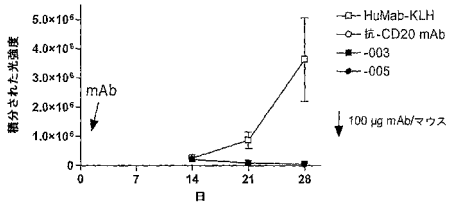

【図１５Ｃ】



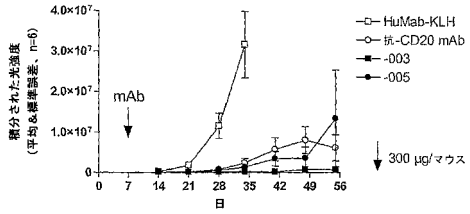

【図１６】



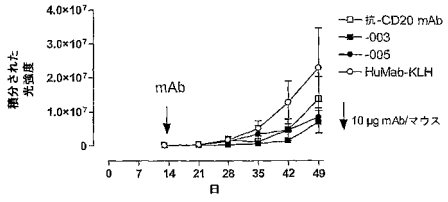

【図１７Ａ】



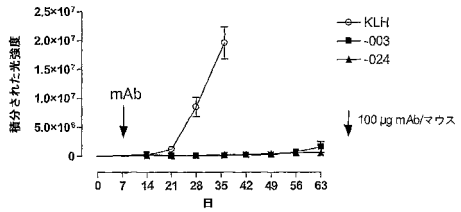

【図１７Ｂ】



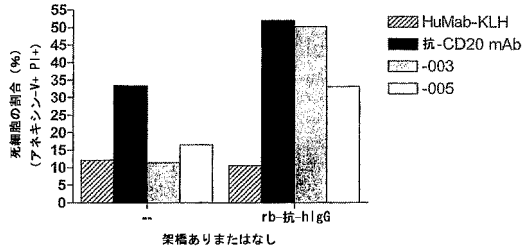

【図１７Ｃ】



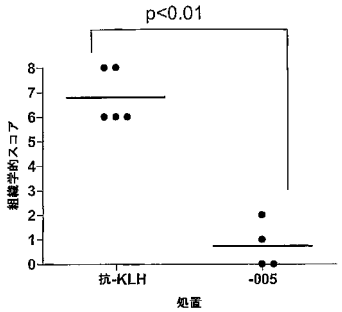

【図１７Ｄ】



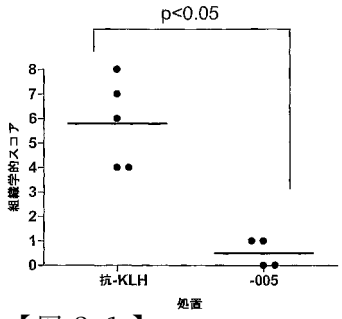

【図１８】




【図１９】



【図２０】




【図２１】

A B

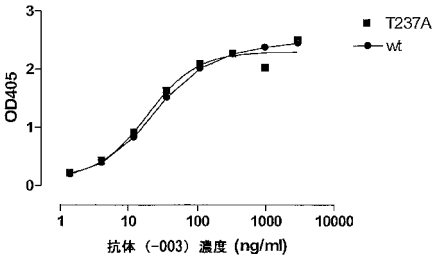
C

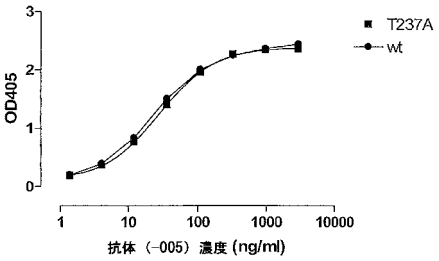
【図２２】

A B

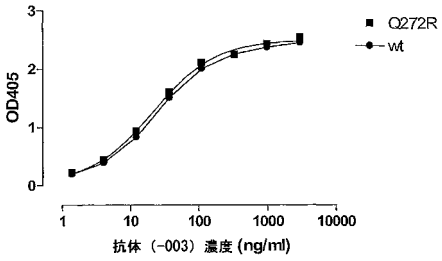
C

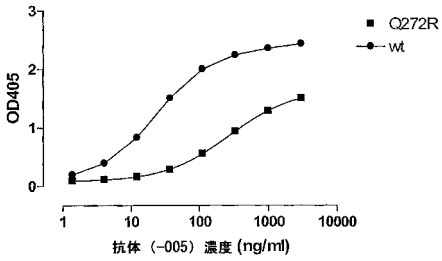
【図２３Ａ】



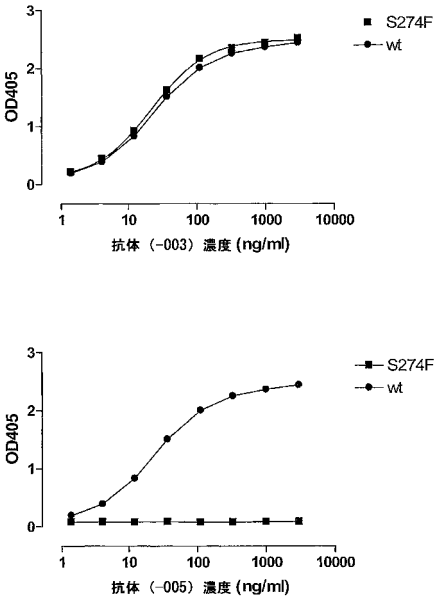




【図２３Ｂ】

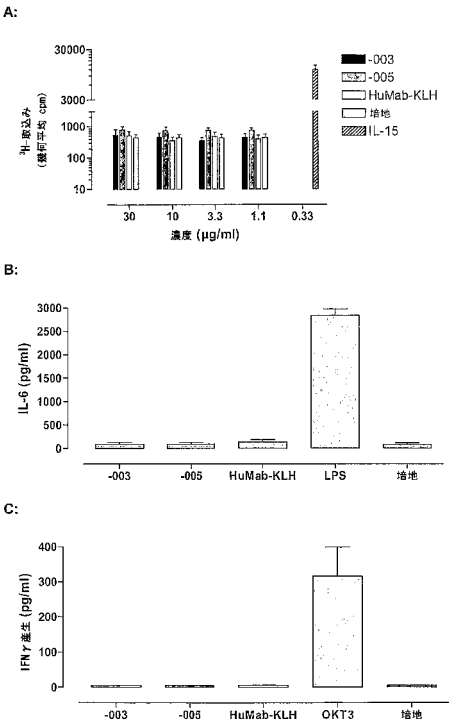


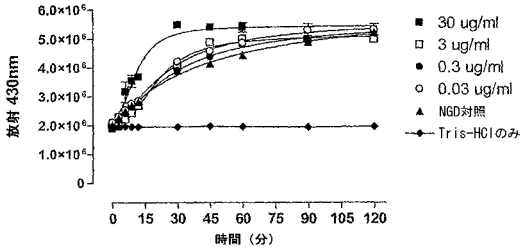
【図２３Ｃ】



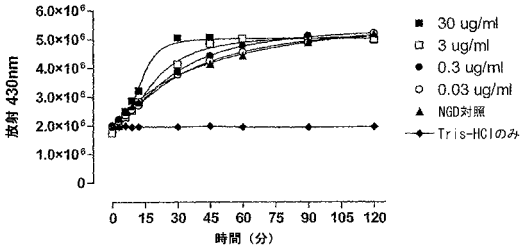

【図２４】



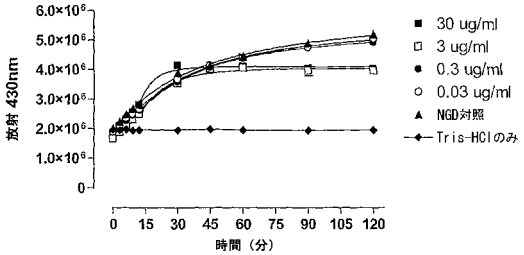

【図２５Ａ】



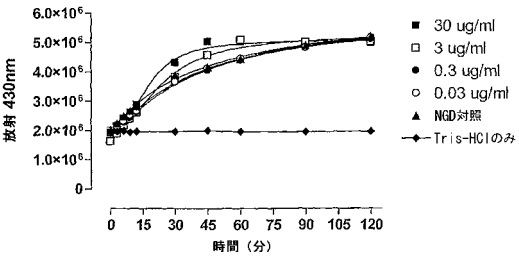

【図２５Ｂ】



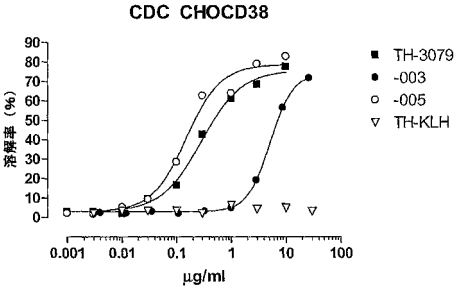

【図２５Ｃ】



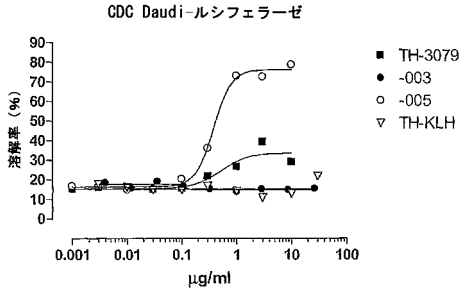

【図２５Ｄ】



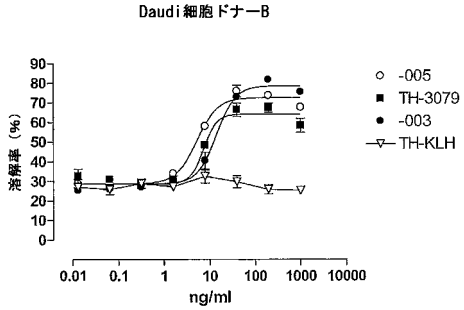

【図２６Ａ】



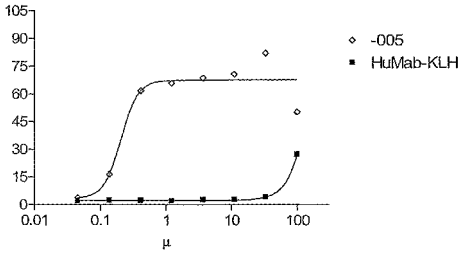
【図２６Ｂ】



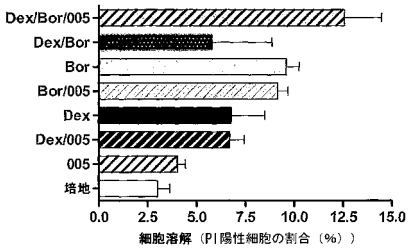

【図２６Ｃ】




【図２７】




【図２８】




【図２９－１】

SEQUENCE LISTING

<110> Genmab A/S

<120> Combination treatment of CD38-expressing tumors

<130> P/23.WO

<160> 34

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 321
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 1
gacatccaga tgacccagtc tccatcctca ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc 60

atcacttgtc gggcgagtca gggtattagc agctggttag cctggtatca gcagaaacca 120

gagaaagccc ctaagtccct gatctatgct gcttccagtt tgcaaagtgg ggtcccatca 180

aggttcagcg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct 240

gaagattttg caacttatta ctgccaacag tataatagtt accctcggac gttcggccaa 300

gggaccaagg tggaaatcaa a 321

<210> 2
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

【図２９－２】

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 3

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala
1 5 10

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 4

【図２９－３】

```
Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser
1               5


<210>  5
<211>  9
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  5

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Arg Thr
1               5


<210>  6
<211>  366
<212>  DNA
<213>  homo sapiens

<400>  6
caggtccagc tggtgcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggtc      60

tcctgcaagg cttctggagg caccttcagc agctatgctt tcagctgggt gcgacaggcc     120

cctggacaag gacttgagtg gatgggaagg gtcatccctt tccttggtat agcaaactcc     180

gcacagaaat tccagggcag agtcacaatt accgcggaca aatccacgag cacagcctac     240

atggacctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtat attactgtgc gagagatgat     300

atagcagcac ttggtccttt tgactactgg ggccagggaa ccctggtcac cgtctcctca     360

gcctcc                                                                366


<210>  7
<211>  122
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  7
```

【図２９－４】

```
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1               5                   10                  15


Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30


Ala Phe Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
        35                  40                  45


Gly Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe
    50                  55                  60


Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80


Met Asp Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95


Ala Arg Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110


Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
        115                 120


<210>  8
<211>  5
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  8

Ser Tyr Ala Phe Ser
1               5
```

【図２９－５】

```
<210>  9
<211>  17
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  9

Arg Val Ile Pro Phe Leu Gly Ile Ala Asn Ser Ala Gln Lys Phe Gln
1               5                   10                  15

Gly


<210>  10
<211>  11
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  10

Asp Asp Ile Ala Ala Leu Gly Pro Phe Asp Tyr
1               5                   10


<210>  11
<211>  321
<212>  DNA
<213>  homo sapiens

<400>  11
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc      60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct     120

ggccaggctc ccaggctcct catctatgat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc     180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct     240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctccgac gttcggccaa     300

gggaccaagg tggaaatcaa a                                               321
```

【図２９－６】

```
<210>  12
<211>  107
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1               5                   10                  15


Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
            20                  25                  30


Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45


Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65                  70                  75                  80


Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
                85                  90                  95


Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105


<210>  13
<211>  11
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  13
```

【図２９－７】

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 14
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 14

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 15

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro Thr Phe
1 5 10

<210> 16
<211> 372
<212> DNA
<213> homo sapiens

<400> 16
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctgggggtc cctgagactc 60

tcatgtgcag tctctggatt cacctttaac agctttgcca tgagctgggt ccgccaggct 120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagct attagtggta gtggtggtgg cacatactac 180

gcagactccg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240

ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat atttctgtgc gaaagataag 300

【図２９－８】

attctctggt tcggggagcc cgtctttgac tactggggcc agggaaccct ggtcaccgtc 360

tcctcagcct cc 372

<210> 17
<211> 124
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 17

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Asn Ser Phe
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120

【図２９－９】

<210> 18
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 18

Ser Phe Ala Met Ser
1 5

<210> 19
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 19

Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 20
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 20

Asp Lys Ile Leu Trp Phe Gly Glu Pro Val Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 21
<211> 321
<212> DNA
<213> homo sapiens

【図２９－１０】

<400> 21
gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60

ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctggtacca acagaaacct 120

ggccaggctc ccgggctcct catctatgat gcttccaaca gggccctctgg catcccagcc 180

aggttcagtg gcagtgggtc tgggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240

gaagattttg cagtttatta ctgtcagcag cgtagcaact ggcctctcac tttcggcgga 300

gggaccaagg tggagatcaa a 321

<210> 22
<211> 107
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Gly Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

【図２９－１１】

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 23
<211> 11
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 23

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 24

Asp Ala Ser Asn Arg Ala Ser
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 25

Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu Thr
1 5

<210> 26
<211> 366
<212> DNA
<213> homo sapiens

【図２９－１２】

<400> 26
gaggtgcagc tggtgcagtc tggagcagag gtgaaaaagc ccggggagtc tctgaagatc 60

tcctgtaagg gttctggata cagcttttcc aactactgga tcggctgggt gcgccagatg 120

cccgggaaag gcctggagtg gatggggatc atctatcctc atgactctga tgccagatac 180

agcccgtcct tccaaggcca ggtcaccttc tcagccgaca agtccatcag caccgcctac 240

ctgcagtgga gcagcctgaa ggcctcggac accgccatgt attactgtgc gagacatgta 300

gggtggggat cgcggtactg gtacttcgat ctctggggcc gtggcaccct ggtcactgtc 360

tcctca 366

<210> 27
<211> 122
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asn Tyr
20 25 30

Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe
50 55 60

Gln Gly Gln Val Thr Phe Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

【図２９－１３】

Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp
100 105 110

Gly Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 28

Asn Tyr Trp Ile Gly
1 5

<210> 29
<211> 17
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 29

Ile Ile Tyr Pro His Asp Ser Asp Ala Arg Tyr Ser Pro Ser Phe Gln
1 5 10 15

Gly

<210> 30
<211> 13
<212> PRT
<213> homo sapiens

【図２９－１４】

<400> 30

His Val Gly Trp Gly Ser Arg Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 31
<211> 300
<212> PRT
<213> homo sapiens

<400> 31

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
1 5 10 15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
20 25 30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
35 40 45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
50 55 60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
65 70 75 80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
85 90 95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
100 105 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile

【図２９－１５】

```
        115                 120                 125

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
    130                 135                 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
145                 150                 155                 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
                165                 170                 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
            180                 185                 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
        195                 200                 205

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
    210                 215                 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
225                 230                 235                 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
                245                 250                 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
            260                 265                 270

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
        275                 280                 285
```

【図２９－１６】

```
Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
    290                 295                 300


<210>  32
<211>  300
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  32

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
1               5                  10                  15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
            20                  25                  30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
        35                  40                  45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
    50                  55                  60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
65                  70                  75                  80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
                85                  90                  95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
            100                 105                 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
        115                 120                 125
```

【図２９－１７】

```
Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
    130                 135                 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
145                 150                 155                 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
                165                 170                 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
            180                 185                 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
        195                 200                 205

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
    210                 215                 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Ala Leu Glu Ala
225                 230                 235                 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
                245                 250                 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
            260                 265                 270

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
        275                 280                 285

Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
    290                 295                 300
```

【図２９－１８】

```
<210>  33
<211>  300
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  33

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
1               5                  10                  15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
            20                  25                  30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
        35                  40                  45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
    50                  55                  60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
65                  70                  75                  80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
                85                  90                  95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
            100                 105                 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
        115                 120                 125

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
    130                 135                 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
145                 150                 155                 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
                165                 170                 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
            180                 185                 190
```

【図２９－１９】

```
Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
        195                 200                 205

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
    210                 215                 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
225                 230                 235                 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
                245                 250                 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Arg
            260                 265                 270

Phe Ser Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
        275                 280                 285

Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
    290                 295                 300


<210>  34
<211>  300
<212>  PRT
<213>  homo sapiens

<400>  34

Met Ala Asn Cys Glu Phe Ser Pro Val Ser Gly Asp Lys Pro Cys Cys
1               5                   10                  15

Arg Leu Ser Arg Arg Ala Gln Leu Cys Leu Gly Val Ser Ile Leu Val
            20                  25                  30

Leu Ile Leu Val Val Val Leu Ala Val Val Val Pro Arg Trp Arg Gln
        35                  40                  45

Gln Trp Ser Gly Pro Gly Thr Thr Lys Arg Phe Pro Glu Thr Val Leu
    50                  55                  60

Ala Arg Cys Val Lys Tyr Thr Glu Ile His Pro Glu Met Arg His Val
```

【図２９－２０】

```
65                  70                  75                  80

Asp Cys Gln Ser Val Trp Asp Ala Phe Lys Gly Ala Phe Ile Ser Lys
                85                  90                  95

His Pro Cys Asn Ile Thr Glu Glu Asp Tyr Gln Pro Leu Met Lys Leu
            100                 105                 110

Gly Thr Gln Thr Val Pro Cys Asn Lys Ile Leu Leu Trp Ser Arg Ile
        115                 120                 125

Lys Asp Leu Ala His Gln Phe Thr Gln Val Gln Arg Asp Met Phe Thr
    130                 135                 140

Leu Glu Asp Thr Leu Leu Gly Tyr Leu Ala Asp Asp Leu Thr Trp Cys
145                 150                 155                 160

Gly Glu Phe Asn Thr Ser Lys Ile Asn Tyr Gln Ser Cys Pro Asp Trp
                165                 170                 175

Arg Lys Asp Cys Ser Asn Asn Pro Val Ser Val Phe Trp Lys Thr Val
            180                 185                 190

Ser Arg Arg Phe Ala Glu Ala Ala Cys Asp Val Val His Val Met Leu
        195                 200                 205

Asn Gly Ser Arg Ser Lys Ile Phe Asp Lys Asn Ser Thr Phe Gly Ser
    210                 215                 220

Val Glu Val His Asn Leu Gln Pro Glu Lys Val Gln Thr Leu Glu Ala
225                 230                 235                 240

Trp Val Ile His Gly Gly Arg Glu Asp Ser Arg Asp Leu Cys Gln Asp
                245                 250                 255

Pro Thr Ile Lys Glu Leu Glu Ser Ile Ile Ser Lys Arg Asn Ile Gln
            260                 265                 270

Phe Phe Cys Lys Asn Ile Tyr Arg Pro Asp Lys Phe Leu Gln Cys Val
        275                 280                 285

Lys Asn Pro Glu Asp Ser Ser Cys Thr Ser Glu Ile
    290                 295                 300
```

【配列表】

2016188228000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成28年6月23日(2016.6.23)

【手続補正１】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項１】

i)CD38に結合する非アゴニスト抗体であって、ヒトCD38 (SEQ ID NO: 31)の領域SKRNIQFSCKNIYRおよび領域EKVQTLEAWVIHGGに特異的に結合する、抗体、

ii)少なくとも1つのグルココルチコイド、および

iii)サリドマイドもしくはサリドマイド類似体またはプロテアソーム阻害剤を含む、少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤

を組み合わせてなる、

それを必要とする個体に該抗体、該少なくとも1つのグルココルチコイドおよび少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤とを同時にまたは個別に投与して、該個体におけるCD38を発現する腫瘍細胞の成長および／または増殖を阻害するための医薬。

【請求項２】

i)CD38に結合する非アゴニスト抗体であって、ヒトCD38 (SEQ ID NO: 31)の領域SKRNIQFSCKNIYRおよび領域EKVQTLEAWVIHGGに特異的に結合する、抗体、

ii)少なくとも1つのグルココルチコイド、および

iii)サリドマイドもしくはサリドマイド類似体またはプロテアソーム阻害剤を含む、少

なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤
を組み合わせてなる、
それを必要とする個体に該抗体、該少なくとも1つのグルココルチコイドおよび少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤とを同時にまたは個別に投与して、CD38を発現する腫瘍細胞が関与する癌を処置するための医薬。
【請求項３】
自己末梢幹細胞移植または骨髄移植の前に個体に投与される、請求項1または2記載の医薬。
【請求項４】
細胞毒性薬剤および／または血管形成阻害剤を含む少なくとも1つのさらなる非コルチコステロイド化学療法剤を組み合わせてなる、請求項1～3のいずれか一項記載の医薬。
【請求項５】
アルキル化薬剤を含む少なくとも1つのさらなる非コルチコステロイド化学療法剤を組み合わせてなる、請求項1～4のいずれか一項記載の医薬。
【請求項６】
メルファラン、メクロレタミン、チオエパ、クロラムブシル、カルムスチン(BSNU)、ロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、ダカルバジン(DTIC)、プロカルバジン、マイトマイシンC、シスプラチン、およびカルボプラチンなどの、その他のプラチナ誘導体からなる群より選択される1つまたは複数の薬剤を含む少なくとも1つのさらなる非コルチコステロイド化学療法剤を組み合わせてなる、請求項1～5のいずれか一項記載の医薬。
【請求項７】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、サリドマイドである、請求項1～6のいずれか一項記載の医薬。
【請求項８】
サリドマイド類似体がCC-5013またはCC4047である、請求項1～5のいずれか一項記載の医薬。
【請求項９】
少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、ボルテゾミブなどの、プロテアソーム阻害剤である、請求項1～8のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１０】
ビンクリスチンなどの、ビンカアルカロイドを含む少なくとも1つのさらなる非コルチコステロイド化学療法剤を組み合わせてなる、請求項1～9のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１１】
ドキソルビシンなどの、アントラサイクリンを含む少なくとも1つのさらなる非コルチコステロイド化学療法剤を組み合わせてなる、請求項1～10のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１２】
少なくとも1つのグルココルチコイドがプレドニゾンである、請求項1～11のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１３】
少なくとも1つのグルココルチコイドがプレドニゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がサリドマイドである、請求項1～12のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１４】
少なくとも1つのグルココルチコイドがプレドニゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がメルファランおよびサリドマイドである、請求項1～13のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１５】
少なくとも1つのグルココルチコイドがプレドニゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がボルテゾミブおよびメルファランである、請求項1～12の

いずれか一項記載の医薬。
【請求項１６】
少なくとも1つのグルココルチコイドがデキサメタゾンである、請求項1～14のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１７】
少なくとも1つのグルココルチコイドがデキサメタゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がサリドマイドまたはレナリドマイドである、請求項1～16のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１８】
少なくとも1つのグルココルチコイドがデキサメタゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がサリドマイドおよびレナリドマイドである、請求項1～16のいずれか一項記載の医薬。
【請求項１９】
少なくとも1つのグルココルチコイドがデキサメタゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がCC4047である、請求項1～16のいずれか一項記載の医薬。
【請求項２０】
少なくとも1つのグルココルチコイドがデキサメタゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がサリドマイドおよびボルテゾミブである、請求項1～16のいずれか一項記載の医薬。
【請求項２１】
少なくとも1つのグルココルチコイドがデキサメタゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がレナリドマイドおよびボルテゾミブである、請求項1～16のいずれか一項記載の医薬。
【請求項２２】
少なくとも1つのグルココルチコイドがデキサメタゾンであり、かつ少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤がボルテゾミブである、請求項1～16のいずれか一項記載の医薬。
【請求項２３】
インターフェロン-アルファと組み合わせて使用することを特徴とする、請求項1～22のいずれか一項記載の医薬。
【請求項２４】
抗体がモノクローナル抗体である、請求項1～23のいずれか一項記載の医薬。
【請求項２５】
抗体がヒトモノクローナル抗体である、請求項1～24のいずれか一項記載の医薬。
【請求項２６】
抗体がCD38のアンタゴニストである、請求項1～25のいずれか一項記載の医薬。
【請求項２７】
抗体が、以下の特徴の1つまたは複数を含む抗体である、請求項1～26のいずれか一項記載の医薬：
a)本明細書の実施例19で記載した方法によって決定される場合、ヒト単球または末梢血単核細胞による顕著なIL-6の放出を誘導しない、
b)本明細書の実施例20で記載した方法によって決定される場合、ヒトT細胞または末梢血単核細胞による検出可能なIFN-γの放出を誘導しない、
c)CD38発現細胞によって内在化される、
d)ADCCを誘導する、
e)補体の存在下でCDCを誘導する、
f)cADPRの合成を阻害する、
g)本明細書の実施例20で記載した表面プラズモン共鳴によって決定される場合、$10^{-8}$ M未満の親和性($K_D$)でヒトCD38に結合する、または

h) Munshi et al., J. Biol. Chem. 275, 21566-21571(2000)に記載されるHPLC法によって決定される場合、3 μg/mlの濃度で90分後に少なくとも25％cADPRの合成を阻害する。

【請求項２８】
抗体がcGDPRの合成を阻害する抗体である、請求項1～27のいずれか一項記載の医薬。

【請求項２９】
抗体が、本明細書の実施例24で記載した分光光度法によって決定される場合、3 μg/mlの濃度で90分後に少なくとも25％cGDPRの合成を阻害する抗体である、請求項1～28のいずれか一項記載の医薬。

【請求項３０】
抗体が以下の結合特徴を有する、請求項1～29のいずれか一項記載の医薬：
i)位置274でセリン残基がフェニルアラニン残基に置換されている突然変異体ヒトCD38(配列番号：34)に、ヒトCD38(配列番号：31)への結合と同じ程度で結合しない、
ii)位置272でグルタミン残基がアルギニン残基に置換されている突然変異体ヒトCD38(配列番号：33)に、ヒトCD38(配列番号：31)への結合と同じ程度で結合しない、
iii)位置237でスレオニン残基がアラニン残基と置換されている突然変異体ヒトCD38(配列番号：32)に、ヒトCD38(配列番号：31)への結合と同じ程度で結合しない。

【請求項３１】
抗体が、モチーフKRNおよびVQTLを認識する、請求項1～30のいずれか一項に記載の医薬。

【請求項３２】
抗体が、全長のIgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM抗体である、請求項1～31のいずれか一項記載の医薬。

【請求項３３】
抗体が、全長のIgG1,κ抗体である、請求項32記載の医薬。

【請求項３４】
腫瘍細胞が多発性骨髄腫細胞または慢性リンパ球性白血病細胞である、請求項1～33のいずれか一項記載の医薬。

【請求項３５】
腫瘍細胞が再発性または難治性の腫瘍細胞である、請求項1～34のいずれか一項記載の医薬。

【請求項３６】
個体が
a)65歳または65歳より上である、または
b)個体が65歳未満である、
請求項1～35のいずれか一項記載の医薬。

【請求項３７】
個体が、
a)同じ癌に対する前抗癌処置を受けていない、または
b)個体が、同じ癌に対する前抗癌処置に応答していない、
請求項1～36のいずれか一項記載の医薬。

【請求項３８】
個体が、自己末梢幹細胞移植または骨髄移植を事前に受けている、請求項1～37のいずれか一項記載の医薬。

【請求項３９】
抗体、少なくとも1つのグルココルチコイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が
a)同時に投与される、または
b)順次投与される、
請求項1～38のいずれか一項記載の医薬。

【請求項４０】
抗体、少なくとも1つのグルココルチコイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が全て個別に投与される、請求項1～39のいずれか一項記載の医薬。
【請求項４１】
抗体、少なくとも1つのグルココルチコイド、および少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤が、1つまたは2つの薬学的組成物として同時投与される、請求項1～38のいずれか一項記載の医薬。
【請求項４２】
抗体が、少なくとも1つのグルココルチコイドおよび少なくとも1つの非コルチコステロイド化学療法剤の投与の少なくとも1日前に投与される、請求項39記載の医薬。
【請求項４３】
抗体が、1～20 mg/kgの用量で投与される、請求項1～42のいずれか一項記載の医薬。
【請求項４４】
抗体が、2～12週間、週に1回投与される、請求項1～43のいずれか一項記載の医薬。

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | | | F I | | | テーマコード（参考） |
|---|---|---|---|---|---|---|
| *Ａ６１Ｋ* | *31/454* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/454 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/475* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/475 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/573* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/573 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/69* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/69 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/704* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/704 | | |
| *Ａ６１Ｋ* | *31/198* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｋ | 31/198 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *35/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/00 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *35/02* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 35/02 | | |
| *Ａ６１Ｐ* | *43/00* | *(2006.01)* | Ａ６１Ｐ | 43/00 | １２１ | |
| *Ｃ１２Ｎ* | *15/09* | *(2006.01)* | Ｃ１２Ｎ | 15/00 | | Ａ |
| *Ｃ０７Ｋ* | *16/18* | *(2006.01)* | Ｃ０７Ｋ | 16/18 | | |
| *Ｃ０７Ｋ* | *14/56* | *(2006.01)* | Ｃ０７Ｋ | 14/56 | | |

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人
(72)発明者 ウィンケル ジャン ヴァン デ
オランダ ゼイスト フェルレンジ スロットラーン ８０
(72)発明者 パレン ポール
オランダ オダイク ワードーパーワード １７
(72)発明者 グラウス イヴォ
オランダ オダイク ワードーパーワード ３
(72)発明者 オプリンス ジュディス
オランダ ビュニック コペルスラヘルシュク ２２
(72)発明者 ウィーアス ミシェル デ
オランダ ハウテン ペニンスラグ ２０
(72)発明者 フュクト マーティン ヴァン
オランダ ハウテン シルドモス ７
(72)発明者 バッズガルド オレ
デンマーク ヘレラップ トゥボルグ スンドパルク １０
(72)発明者 リスビー ステーン
デンマーク フレデリクスベルグ ３．テーブイ． ニエランドスベユ ８３

Ｆターム(参考) 4C084 AA02 AA23 BA44 CA53 DA22 NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC75
4C085 AA14 BB01 CC23 DD63 EE03 GG01 GG02 GG03 GG04 GG05
GG06 GG08 GG10
4C086 AA01 AA02 BC22 CB14 DA11 EA10 MA03 MA04 NA05 NA14
ZB26 ZB27 ZC75
4C206 AA01 AA02 FA53 MA03 MA04 NA05 NA14 ZB26 ZB27 ZC75
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA16 DA76 EA20 FA74