

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-535471

(P2007-535471A)

(43) 公表日 平成19年12月6日(2007.12.6)

(51) Int.CI.	F 1	テーマコード (参考)
C 07 K 16/30 (2006.01)	C 07 K 16/30	Z N A 4 B 02 4
A 61 K 38/00 (2006.01)	A 61 K 37/02	4 B 06 4
A 61 K 39/395 (2006.01)	A 61 K 39/395	E 4 C 08 4
A 61 P 43/00 (2006.01)	A 61 K 39/395	T 4 C 08 5
A 61 P 35/00 (2006.01)	A 61 P 43/00	4 H 04 5
	1 1 1	(全 53 頁) 最終頁に続く
	審査請求 有 予備審査請求 未請求	

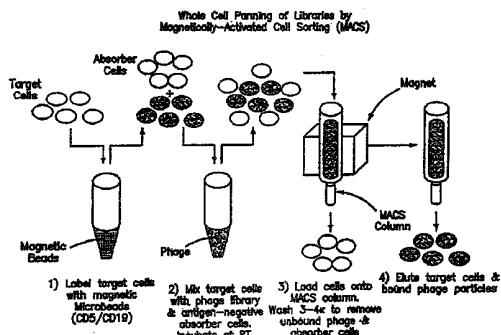
(21) 出願番号	特願2006-509122 (P2006-509122)	(71) 出願人	503102674 アレクシオン ファーマシューティカルズ , インコーポレイテッド アメリカ合衆国 コネチカット 0641 0, チェシア, ノッター ドライブ 352
(86) (22) 出願日	平成16年3月4日 (2004.3.4)	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(85) 翻訳文提出日	平成17年10月27日 (2005.10.27)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(86) 國際出願番号	PCT/US2004/006577	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(87) 國際公開番号	W02004/078938		
(87) 國際公開日	平成16年9月16日 (2004.9.16)		
(31) 優先権主張番号	10/379,151		
(32) 優先日	平成15年3月4日 (2003.3.4)		
(33) 優先権主張國	米国(US)		
(31) 優先権主張番号	10/736,188		
(32) 優先日	平成15年12月15日 (2003.12.15)		
(33) 優先権主張國	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】慢性リンパ性白血病細胞由来のポリペプチド及び抗体並びにそれらの関連する適用

## (57) 【要約】

OX-2/CD200のレベルがアップレギュレートされる特徴を有する病状、例えば癌及びCLLの治療に関する。OX-2/CD200及び/又はOX-2/CD200レセプターへ結合できる抗体等のポリペプチドを投与する方法。



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

OX-2/CD200が被験者中でアップレギュレートされるかを決定するステップ、及びその被験者へOX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを投与するステップを含有する方法。

**【請求項 2】**

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200へ結合する抗体を投与することを含有する請求項1の方法。

**【請求項 3】**

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200へ結合するモノクローナル抗体を投与することを含有する請求項1の方法。 10

**【請求項 4】**

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合する抗体を投与することを含有する請求項1の方法。

**【請求項 5】**

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合するモノクローナル抗体を投与することを含有する請求項1の方法。

**【請求項 6】**

上記ポリペプチド投与ステップは、SEQ.ID.No:1、SEQ.ID.No:2、SEQ.ID.No:3、SEQ.ID.No:4、SEQ.ID.No:5、SEQ.ID.No:6、SEQ.ID.No:7、SEQ.ID.No:8、SEQ.ID.No:9、SEQ.ID.No:10、SEQ.ID.No:11、SEQ.ID.No:12、SEQ.ID.No:13、SEQ.ID.No:14、SEQ.ID.No:15、SEQ.ID.No:16、SEQ.ID.No:17、SEQ.ID.No:18、SEQ.ID.No:19、SEQ.ID.No:20、SEQ.ID.No:21、SEQ.ID.No:22、SEQ.ID.No:23、SEQ.ID.No:24、及びSEQ.ID.No:25の群から選ばれる1以上のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを、被験者へ投与することを含有する請求項1の方法。 20

**【請求項 7】**

OX-2/CD200がアップレギュレートされる症状に悩む被験者へ、OX-2/CD200へ又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを投与することを含むOX-2/CD200がアップレギュレートされる症状の治療方法。

**【請求項 8】**

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200へ結合する抗体を投与することを含有する請求項7の方法。 30

**【請求項 9】**

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200へ結合するモノクローナル抗体を投与することを含有する請求項7の方法。

**【請求項 10】**

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合する抗体を投与することを含有する請求項7の方法。

**【請求項 11】**

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合するモノクローナル抗体を投与することを含有する請求項7の方法。 40

**【請求項 12】**

上記ポリペプチド投与ステップは、SEQ.ID.No:1、SEQ.ID.No:2、SEQ.ID.No:3、SEQ.ID.No:4、SEQ.ID.No:5、SEQ.ID.No:6、SEQ.ID.No:7、SEQ.ID.No:8、SEQ.ID.No:9、SEQ.ID.No:10、SEQ.ID.No:11、SEQ.ID.No:12、SEQ.ID.No:13、SEQ.ID.No:14、SEQ.ID.No:15、SEQ.ID.No:16、SEQ.ID.No:17、SEQ.ID.No:18、SEQ.ID.No:19、SEQ.ID.No:20、SEQ.ID.No:21、SEQ.ID.No:22、SEQ.ID.No:23、SEQ.ID.No:24、及びSEQ.ID.No:25の群から選ばれる1以上のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを、被験者へ投与することを含有する請求項7の方法。

**【請求項 13】**

50

OX-2/CD200が癌に悩む被験者中でアップレギュレートされるかを決定するステップ、及びその被験者へOX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを投与するステップを含有する癌治療方法。

【請求項 1 4】

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200へ結合する抗体を投与することを含有する請求項 1 3 の方法。

【請求項 1 5】

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200へ結合するモノクローナル抗体を投与することを含有する請求項 1 3 の方法。

【請求項 1 6】

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合する抗体を投与することを含有する請求項 1 3 の方法。 10

【請求項 1 7】

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合するモノクローナル抗体を投与することを含有する請求項 1 3 の方法。

【請求項 1 8】

上記ポリペプチド投与ステップは、SEQ.ID.No: 1、SEQ.ID.No: 2、SEQ.ID.No: 3、SEQ.ID.No: 4、SEQ.ID.No: 5、SEQ.ID.No: 6、SEQ.ID.No: 7、SEQ.ID.No: 8、SEQ.ID.No: 9、SEQ.ID.No: 10、SEQ.ID.No: 11、SEQ.ID.No: 12、SEQ.ID.No: 13、SEQ.ID.No: 14、SEQ.ID.No: 15、SEQ.ID.No: 16、SEQ.ID.No: 17、SEQ.ID.No: 18、SEQ.ID.No: 19、SEQ.ID.No: 20、SEQ.ID.No: 21、SEQ.ID.No: 22、SEQ.ID.No: 23、SEQ.ID.No: 24、及びSEQ.ID.No: 25 の群から選ばれる 1 以上のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを、被験者へ投与することを含有する請求項 1 3 の方法。 20

【請求項 1 9】

OX-2/CD200がCLL(慢性リンパ性白血病)に悩む被験者中でアップレギュレートされるかを決定するステップ、及びその被験者へOX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを投与するステップを含有するCLL治療方法。

【請求項 2 0】

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200へ結合する抗体を投与することを含有する請求項 1 9 の方法。 30

【請求項 2 1】

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200へ結合するモノクローナル抗体を投与するステップを含有する請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 2】

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合する抗体を投与することを含有する請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 3】

上記ポリペプチド投与ステップは、被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合するモノクローナル抗体を投与することを含有する請求項 1 9 の方法。

【請求項 2 4】

上記ポリペプチド投与ステップは、SEQ.ID.No: 1、SEQ.ID.No: 2、SEQ.ID.No: 3、SEQ.ID.No: 4、SEQ.ID.No: 5、SEQ.ID.No: 6、SEQ.ID.No: 7、SEQ.ID.No: 8、SEQ.ID.No: 9、SEQ.ID.No: 10、SEQ.ID.No: 11、SEQ.ID.No: 12、SEQ.ID.No: 13、SEQ.ID.No: 14、SEQ.ID.No: 15、SEQ.ID.No: 16、SEQ.ID.No: 17、SEQ.ID.No: 18、SEQ.ID.No: 19、SEQ.ID.No: 20、SEQ.ID.No: 21、SEQ.ID.No: 22、SEQ.ID.No: 23、SEQ.ID.No: 24、及びSEQ.ID.No: 25 の群から選ばれる 1 以上のアミノ酸配列を含有するポリペプチドを、被験者へ投与することを含有する請求項 1 9 の方法。 40

【請求項 2 5】

抗体が結合する抗原を決定する方法であり、  
CLL患者から採取した組織を使用して得られる抗体ライブラリーを作成するステップ； 50

上記ライブラリーの1以上の構成員を、ATCC寄託番号PTA-3920として寄託された細胞系CLL-AATの溶解産物と接触させるステップ；及び  
上記ライブラリーの少なくとも1の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップを有する方法。

【請求項26】

上記ライブラリー作成ステップは、CLL細胞を有する有機体又はその一部を免疫化することを含む請求項25の方法。

【請求項27】

上記ライブラリー作成ステップは、合成抗体ライブラリーをCLL細胞又は細胞系とパンニングすることを含む請求項25の方法。 10

【請求項28】

ライブラリーはライブラリー構成員を単離する能力を発揮するファージによりスクリーニングされる請求項27の方法。

【請求項29】

ライブラリーは、1以上のCLL患者から単離された原発性(primary)CLL細胞とパンニングされる請求項27の方法。

【請求項30】

更にCLL細胞上でアップレギュレートされる抗原へ結合する抗体ライブラリーの構成員を特定するステップを含む請求項25の方法。

【請求項31】

上記抗体ライブラリーの構成員はOX-2/CD200へ結合する請求項30の方法。 20

【請求項32】

CLL細胞によりアップレギュレートされる抗原へ結合する抗体。

【請求項33】

抗原はOX-2/CD200である請求項32の抗体。

【請求項34】

SEQ.ID.No:1、SEQ.ID.No:2、SEQ.ID.No:3、SEQ.ID.No:4、SEQ.ID.No:5、SEQ.ID.N  
o:6、SEQ.ID.No:7、SEQ.ID.No:8、SEQ.ID.No:9、SEQ.ID.No:10、SEQ.ID.No:11、  
SEQ.ID.No:12、SEQ.ID.No:13、SEQ.ID.No:14、SEQ.ID.No:15、SEQ.ID.No:16、  
SEQ.ID.No:17、SEQ.ID.No:18、SEQ.ID.No:19、SEQ.ID.No:20、SEQ.ID.No:21、  
SEQ.ID.No:22、SEQ.ID.No:23、SEQ.ID.No:24、及びSEQ.ID.No:25の群から選ばれる配列と少なくとも70%ホモロジーを有するアミノ酸配列を含有する請求項32の抗体。 30

【請求項35】

抗体が結合する抗原を決定する方法であり、  
ATCC寄託番号PTA-3920として寄託された細胞系CLL-AAT中の細胞を使用して得られる抗体ライブラリーを作成するステップ；  
ライブラリーの1以上の構成員をCLL患者から採取した組織からの細胞の溶解産物を接触させるステップ；及び

上記ライブラリーの少なくとも1の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップを有する方法。 40

【請求項36】

抗体が結合する抗原を決定する方法であり、  
有機体をCLL患者から採取した組織からのCLL細胞の少なくとも一部で免疫化するステップ；  
有機体の免疫化に対する免疫反応を基礎として抗体ライブラリーを構築するステップ；  
上記ライブラリーの1以上の構成員とCLL細胞とを接触させるステップ；及び  
上記ライブラリーの少なくとも1の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップを含む方法。

【請求項37】

10

20

30

40

50

上記ライブラリーの1以上の構成員とCLL細胞とを接触させるステップは、上記ライブラリーの1以上の構成員とCLL患者から採取した組織からの細胞の溶解産物とを接触させることを含有する請求項36の方法。

【請求項38】

抗体が結合する抗原を決定する方法であり、  
有機体をCLL細胞の少なくとも一部で免疫化させるステップ；  
有機体の免疫化に対する免疫反応を基礎として抗体ライブラリーを構築するステップ；  
上記ライブラリーの1以上の構成員を、ATCC寄託番号PTA-3920として寄託された細胞系CLL-AATの溶解産物と接触させるステップ；及び  
上記ライブラリーの少なくとも1の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップ  
を含有する方法。 10

【請求項39】

悪性癌細胞によりアップレギュレートされるポリペプチドの代謝経路を抑制(interfere)する抗体を投与するステップを含む癌治療方法。

【請求項40】

上記抗体はアップレギュレートされるポリペプチドへ結合する請求項39の方法。

【請求項41】

上記抗体は、アップレギュレートされるポリペプチドが相互作用するレセプターへ結合する請求項39の方法。 20

【請求項42】

抗体はポリペプチドの発現を調節する抗原へ結合する請求項39の方法。

【請求項43】

ポリペプチドはOX-2/CD200である請求項39の方法。

【請求項44】

抗体は、SEQ.ID.No:1、SEQ.ID.No:2、SEQ.ID.No:3、SEQ.ID.No:4、SEQ.ID.No:5、  
SEQ.ID.No:6、SEQ.ID.No:7、SEQ.ID.No:8、SEQ.ID.No:9、SEQ.ID.No:10、SEQ.ID.N  
o:11、SEQ.ID.No:12、SEQ.ID.No:13、SEQ.ID.No:14、SEQ.ID.No:15、SEQ.ID.N  
o:16、SEQ.ID.No:17、SEQ.ID.No:18、SEQ.ID.No:19、SEQ.ID.No:20、SEQ.ID.N  
o:21、SEQ.ID.No:22、SEQ.ID.No:23、SEQ.ID.No:24、及びSEQ.ID.No:25の群か  
ら選ばれる配列と少なくとも70%ホモジニーを有するアミノ酸配列を含有する請求項3  
9の方法。 30

【請求項45】

ポリペプチドの発現が悪性癌細胞によりアップレギュレートされることを特定するために癌患者をスクリーニングするステップ；及び  
アップレギュレートされるポリペプチドの代謝経路を抑制する抗体を、アップレギュレー  
ションが観察される患者へ投与するステップ  
を含有する方法。 40

【請求項46】

患者のスクリーニングステップは、CLL患者のスクリーニングを含む請求項45の方法  
。

【請求項47】

患者のスクリーニングステップは、OX-2/CD200のアップレギュレーションの検出を含む  
請求項45の方法。

【請求項48】

抗体投与ステップは、OX-2/CD200へ結合する抗体の投与を含む請求項45の方法。

【請求項49】

抗体投与ステップは、OX-2/CD200が相互作用するレセプターへ結合する抗体の投与を含  
む請求項45の方法。

【請求項50】

抗体投与ステップは、OX-2/CD200の発現を調節する抗原へ結合する抗体の投与を含む請 50

求項45の方法。

【請求項51】

抗体投与ステップは、SEQ.ID.No:1、SEQ.ID.No:2、SEQ.ID.No:3、SEQ.ID.No:4、SEQ.ID.No:5、SEQ.ID.No:6、SEQ.ID.No:7、SEQ.ID.No:8、SEQ.ID.No:9、SEQ.ID.No:10、SEQ.ID.No:11、SEQ.ID.No:12、SEQ.ID.No:13、SEQ.ID.No:14、SEQ.ID.No:15、SEQ.ID.No:16、SEQ.ID.No:17、SEQ.ID.No:18、SEQ.ID.No:19、SEQ.ID.No:20、SEQ.ID.No:21、SEQ.ID.No:22、SEQ.ID.No:23、SEQ.ID.No:24、及びSEQ.ID.No:25の群から選ばれる配列と少なくとも70%ホモロジーを有するアミノ酸配列を含有する抗体の投与を含む請求項45の方法。

【発明の詳細な説明】

10

【技術分野】

【0001】

本出願は、米国予備出願第60/254113号(2000年12月8日出願)を基礎に優先権主張した国際出願であるPCT/US01/47931号(2001年12月10日出願)の一部継続出願である、米国出願番号第10/379151号(2003年3月4日出願)の一部継続出願である、米国出願番号第10/736188号(2003年12月15日出願)の一部継続出願である。上記米国出願、国際出願及び米国予備出願の開示の全てをここで資料として使用する。

【0002】

技術分野

20

本発明は、慢性リンパ性白血病(CLL)細胞由来の細胞系及びCLL及び他の疾患の研究及び治療におけるそれらの使用に関する。特に、本発明は、2001年11月28日にアメリカ培養コレクション(ATCC、マナサス、バージニア、USA)へ、ブダペスト条約に基づきATCC寄託番号PTA-3920として寄託されたCLL細胞系指定記号「CLL-AT」に関する。

【背景技術】

【0003】

背景分野

30

慢性リンパ性白血病(CLL)は白血球の病気であり、西半球でもっとも一般的な白血病種である。CLLは、徐々に成長するが寿命の長い悪性リンパ球の成長に関連する多様な群の疾患を表す。CLLは、種々のカテゴリーに分類され、例えば、典型的及び混合種のB細胞慢性リンパ性白血病(B-CLL)、B細胞及びT細胞前駆細胞性白血病、毛様細胞性白血病、並びに巨大顆粒リンパ性白血病が挙げられる。

【0004】

40

CLLの全ての異なる種類中、B-CLLは全ての白血病の約30パーセントを占める。それは50歳以上の患者で最もしばしば発生するが、若者でも増加している。B-CLLは、形態的に正常であるが生物学的に未熟であり、機能を喪失しているB-リンパ球の蓄積に特徴付けられる。リンパ球は通常感染に対して戦う機能がある。しかしB-CLLに罹患すると、リンパ球は血液及び骨髄中に蓄積し、リンパ節の肥大を引き起こす。正常骨髄及び血液細胞の製造が減少し、患者はしばしば重度の貧血症及び低血小板値を示す。これは致命的な出血の危険性及び、白血球数の減少による重度の感染の進行の危険性を提起する。

【0005】

白血病等の病気を更に理解するために、それらの病因、発病及び生物学の研究のためのツールとして使用できる適切な細胞系を持つことが重要である。悪性ヒトB-リンパ球の細胞系の例として、例えば、前B急性リンパ芽球性白血病(Reh)、びまん性巨大細胞リンパ腫(WSU-DLC12)、及びヴァルデンストレームマクログロブリン血症(WSU-WM)が挙げられる。残念ながら、多くの公知の細胞系は、臨床的に最もありふれている種類の白血病及びリンパ腫を代表するものではない。

【0006】

*in vitro*感染のエプスタインバーウィルス(EBV)の使用は、細胞系、特に悪性細胞の代表であるB-CLL細胞系由来のいくつかのCLLを生じる。これら細胞系の表現型は*in viv*

50

o腫瘍のそれとは異なり、むしろB-CLLラインの特徴はリンパ芽球状の細胞系のそれと類似する傾向にある。B-CLL細胞をEBV感染の助けにより不死化する試みは、ほとんど成功していない。その理由は不明であるが、EBVレセプターの発現、結合又は取り込みの欠如によるためではないことは知られている。ウェルズらはB-CLL細胞は細胞サイクルのG1/S相中でくい止められ、EBV-DNAを伴う形質転換は発見しなかったことを発見した。これは、EBVのB-CLL細胞との相互作用は、正常B細胞とのそれとは異なることを示す。EBV-形質転換したCLL細胞系は更に、EBVにより不死化されたリンパ芽球状の細胞系(LCL)とより類似する形態を有するように分化することが判明した。

## 【0007】

EBV-陰性CLL細胞系であるWSU-CLLが以前に構築されている(Mohammadら、(1996)Leukemia 10(1): 130-7)。しかし、これ以外の細胞系は知られていない。

癌及びCLLを含む病状への体の応答中で役割を果たす種々の機構がある。例えば、CD4<sup>+</sup>Tヘルパー細胞は、促進因子を効果(器)細胞へ提供することにより、種々の悪性疾患に対する効果的免疫反応における重要な役割を果たす。細胞毒性T細胞は、癌細胞の排除に最も効果的な細胞であると信じられており、Tヘルパー細胞はIL-2及びIFN-等のTh1サイトカインを分泌することにより細胞毒性T細胞を特発(prime)する。種々の悪性疾患中、Tヘルパー細胞は、健康な個人中に発見される細胞に比べ変容した表現型を有することが示された。顕著な変容した特徴の一つは減少したTh1サイトカイン製造及びTh2サイトカイン製造へのシフトである(参照、例えば、Kianiら、Haematologica 88, 754-761(2003); Maggioら、Ann Oncol 13 Suppl, 1, 52-56(2002); Itoら、Cancer 85, 2359-2367(1999); Podhoreckaら、Leuk Res 26, 657-660(2002); Tatsumiら、J Exp Med 196, 619-628(2002); Agarwalら、Immunol Invest 32, 17-30(2003); Smythら、Ann Surg Oncol 10, 455-462(2003); Contastaら、Cancer Biother Radiopharm 18, 549-557(2003); Lauerovaら、Neoplasma 49: 159-166(2002))。サイトカインがTh1プロファイルへシフトする逆転(Reversing)は、T細胞の抗腫瘍効果を増強することを示した(参照Winterら、Immunology 108: 409-419(2003); Inagawaら、Anticancer Res 18, 3957-3964(1998))。

## 【0008】

Th1からTh2へのTヘルパー細胞のサイトカイン発現を引き起こす腫瘍細胞の能力の基礎となる機構は、IL-10又はTGF-等のサイトカインの分泌及び、免疫系細胞と相互作用する表面分子の発現を含む。OX-2/CD200は、免疫グロブリン遺伝子ファミリーの分子と高度のホモロジーを有する樹状細胞の表面上に発現した分子であり、免疫抑制に関係し(Gorczynskiら、Transplantation 65, 1106-1114(1998))、OX-2/CD200-発現細胞はTh1サイトカイン製造の刺激を阻害できる証拠が示された。Gorczynskiらはマウスモデルにおいて、OX-2/CD200Fcの注入投与は、白血病腫瘍細胞を使用した動物モデル中で腫瘍細胞の拒絶(反応)を抑制することを示した(Clin Exp Immunol 126, 220-229(2001))。

【非特許文献1】Mohammadら、(1996)Leukemia 10(1): 130-7

【非特許文献2】Kianiら、Haematologica 88, 754-761(2003)

【非特許文献3】Maggioら、Ann Oncol 13 Suppl, 1, 52-56(2002)

【非特許文献4】Itoら、Cancer 85, 2359-2367(1999)

【非特許文献5】Podhoreckaら、Leuk Res 26, 657-660(2002)

【非特許文献6】Tatsumiら、J Exp Med 196, 619-628(2002)

【非特許文献7】Agarwalら、Immunol Invest 32, 17-30(2003)

【非特許文献8】Smythら、Ann Surg Oncol 10, 455-462(2003)

【非特許文献9】Contastaら、Cancer Biother Radiopharm 18, 549-557(2003)

【非特許文献10】Lauerovaら、Neoplasma 49, 159-166(2002)

【非特許文献11】Winterら、Immunology 108, 409-419(2003)

【非特許文献12】Inagawaら、Anticancer Res 18, 3957-3964(1998)

【非特許文献13】Gorczynskiら、Transplantation 65, 1106-1114(1998)

【非特許文献14】Clin Exp Immunol 126, 220-229(2001)

## 【発明の開示】

10

20

30

40

50

**【発明が解決しようとする課題】****【0009】**

癌又はCLLの罹患者の、特にT細胞の活性を強化することの出来る範囲まで改良された治療方法が求められている。

**【課題を解決するための手段】****【0010】**まとめ

本発明は例えば、EBVによる不死化によっては確立されていない、悪性起源のCLL細胞系を提供する。上記細胞系は原発性CLL細胞に由来し、ATCC寄託番号PTA-3920として寄託された。好ましくは、この細胞系はCLL-AATである。CLL-AATは、B-CLL原発性細胞由来のB-CLL細胞系である。10

更に、このCLL-AAT細胞系は、CLLの診断及び/又は治療に有用なモノクローナル抗体の作成に使用される。抗体はここで免疫原として開示された細胞を使用して作成され、その結果それからモノクローナル抗体が単離される動物中の免疫反応を引き起こす。これら抗体の配列が決定でき、抗体又はそれらの変異体は組み換え型技術により作成できる。ここで「変異体」とは、モノクローナル抗体の配列を基礎とする、キメラ抗体、CDR(相補性決定領域)-グラフト化抗体、ヒト化抗体及び完全ヒト抗体を含む。

更に、組み換え型ライブラリー(ファージ抗体)由来の抗体は、標的特異性を利用して抗体を単離するための対象物として、ここで記載された細胞又はそれら由来のポリペプチドを使用して選択される。20

**【0011】**

本発明では又、抗体は、原発性CLL細胞又はそれら由来の抗原を使用して抗体ライブラリーをパンニングして生産でき、更に、例えばここで記載されたCLL細胞系等のCLL細胞系を使用して、スクリーニングされ及び/又は特徴付けられる。従って、本発明は、抗体のCLL細胞系への結合の評価を含む、CLLに特異的な抗体を特徴付ける方法を提供する。

本発明では又、免疫沈降及びその後の質量分光分析等の当業者に公知の方法により、CLL-AAT細胞系を使用してCLL細胞中で特異的に発現した蛋白質の特定方法を提供する。これらの蛋白質は、CLL-AAT細胞系中又はCLL患者由来の原発性細胞中で特異的に発現される。30

**【0012】**

小分子ライブラリー(多くのものが市場で入手可能である)は、細胞の成長特性を調整可能な試薬を特定するために、細胞ベースのアッセイ中でCLL-AAT細胞系を使用してスクリーニングされる。例えば、CLL-AAT細胞系中のアポトーシスを調節し、又はそれらの成長及び/又は増殖を阻害する試薬が特定される。これら試薬は、治療用化合物の開発用候補である。30

CLL-AAT細胞系から単離された核酸は、CLL特異的遺伝子を特定する減法(subtractive)ハイブリダイゼーション実験中で、又はマイクロアレイ分析(例えば、遺伝子チップ実験)中で使用できる。その転写がCLL細胞中で調節される遺伝子が特定できる。この方法で特定されたポリペプチド又は核酸遺伝子生成物は、抗体の発達又はCLL用の小分子治療法への指標として使用できる。

好ましくは、CLL-AAT細胞系は、細胞により内在化された細胞表面成分へ結合する内在性抗体を特定するために使用される。これら抗体は治療用用途の候補である。特に、細胞質中に安定して留まって、細胞内結合活性を保持する单鎖抗体がこの方法でスクリーニングされる。40

**【0013】**

本発明は又、患者は悪性癌細胞によりアップレギュレートされるポリペプチドの存在をスクリーニングされ、アップレギュレートされるポリペプチドの代謝経路を抑制する抗体を患者へ投与される治療用処置に関する。

本発明は更に、OX-2/CD200が被験者中でアップレギュレートされるかが決定され、そうであれば、被験者へOX-2/CD200へ結合するポリペプチドを投与する方法に関する。例えば、上記ポリペプチドはOX-2/CD200レセプターへ結合してもよい。50

本発明の方法は又、OX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドをその病状を示す被験者へ投与することにより、被験者中のOX-2/CD200がアップレギュレートされる症状を治療するために使用される。例えば、これら方法により治療される病状として、癌、特にCLLが挙げられる。

#### 【0014】

##### 図面の簡単な説明

図1は、磁気活性化細胞分離（M A C S）による抗体ライブラリーの細胞表面パンニング中に含まれる代表的ステップを概略的に図示する。

図2は、選択されたscFvクローニングの、原発性B-CLL細胞への結合の存在及び正常ヒトP B M Cへの結合の不在を示す、全細胞ELISAの結果を示すグラフである。この図及び他の図中の表示「2° + 3°」は、マウス抗-HAで染色され、抗マウス抗体単独を検知する陰性コントロールウェルを示す。この図及び他の図中の表示「R S C - S ライブラリー」は、オリジナルウサギscFvパンニングされないライブラリーから作成された可溶性抗体を言う。この図及び他の図中の表示「R 3 / R S C - S プール」は、パンニングの第3回目から得られるscFv抗体の完全なプールから作成された可溶性抗体を言う。抗-CD5抗体を確認のための陽性コントロールとして使用し、同数のB-CLL及びP B M C細胞をそれぞれのウェル中にプレートした。

#### 【0015】

図3a及び3bは、選択されたscFv抗体の、原発性B-CLL細胞、及び正常原発性ヒトB細胞への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。抗-CD19抗体を、同数のB-CLL及び正常B細胞がそれぞれのウェル中にプレートされたかの確認のための陽性コントロールとして使用した。他のコントロールは、図2での説明で記載されたとおりである。

図4a及び4bは、scFvクローニングが患者特異的（即ちイディオタイプ）又は血液タイプ特異的（即ちHLA）に抗原へ結合するか否かを決定するために使用される全細胞ELISAの結果を示す。それぞれのクローニングを、3人の異なるB-CLL患者から単離されたP B M Cへ結合するか試験した。1の患者サンプルへ結合するクローニングは、患者特異的又は血液タイプ特異的であると見なされる。

#### 【0016】

図5a及び5bは、scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及び3種のヒト白血病細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。「Ramos」は、バーキットリンパ腫由来の成熟B細胞系である。「RL」は、非ホジキンリンパ腫由来の成熟B細胞系である。「TF-1」は、赤白血病由来の赤芽球症細胞系である。

図6a、6b及び6cは、scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及びCLL-AAT、B-CLL患者由来の細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。TF-1細胞は、陰性コントロールとして含まれた。

#### 【0017】

図7は、3色フローサイトメトリーにより分析した、本発明のscFv抗体の結合特異性を示す。正常末梢血单核球中で、scFv-9により認識される抗原は、Bリンパ球上で中程度に発現し、Tリンパ球の部分母集団上で弱く発現する。正常ドナーからのP B M Cを3色フローサイトメトリーにより、抗-CD5-FITC、抗-CD19-PerCP、及びscFv-9/抗-HA-ビオチン/ストレプトアビジン(SA)-PEを使用して分析した。FL2はscFv-9/H A - ビオチン/ストレプトアビジン(SA) - PE、FL1はCD5-FITC、FL3はCD19-PerCPを表す。

図8a、8b及び8cは、本発明のscFv抗体により認識される抗原の発現レベルを示す。scFv-3及びscFv-9により認識される抗原は、そこからCLL-AAT細胞系が由来する原発性CLL腫瘍上で過発現する。CLL-AAT細胞系を構築するために使用されたCLL患者からの原発性P B M C、又は正常ドナーからのP B M CをscFv抗体で染色し、フローサイトメトリーで分析した。ScFv-3及びscFv-9は、CLL細胞を平均蛍光輝度により測定すると正常P B M Cよりも明るく染色する。

#### 【0018】

10

20

30

40

50

図9a及び9bは、CDR配列の概要（表1）及び選択されたscFv抗体の結合特異性を示す。

#### 【0019】

図10は、正常PBMCと比較した、図8a～8cに記載されている原発性CLL細胞でのscFv抗原の発現レベルのフローサイトメトリー結果の概要を示す表2である。抗原及びCLL/PBMC比を示す。

図11は、10人のCLL患者から単離された末梢血单核球上での、scFv-9抗原とCD38<sup>+</sup>細胞の発現レベル割合を比較した、フローサイトメトリー結果の概要を示す表である。

#### 【0020】

図12は、免疫沈降及び質量分析法によるscFv抗原の特定を示す。CLL-AAT細胞を0.5 mg / mlスルホ-NHS-LC-ビオチン（Pierce社製）のPBS溶液（pH 8.0）で30分標識した。未反応のビオチンを除去するためにPBSで充分洗浄後、細胞を窒素キャビテーションにより分解し、ミクロソームフラクションを分画遠心分離により単離した。ミクロソームフラクションをNP40 Lysis バッファ中で再懸濁し、正常ウサギ血清及びプロテインAsepharoseを使用して予め充分に精製した（precleared）。抗原をラット抗-HAアガロースビーズ（Roche社製）と結合したHA-標識化scFv抗体で免疫沈降した。免疫沈降の次に、抗原をSDS-PAGEにより分離し、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ（AP）を使用したウェスタンプロット法により、又はクマシーグ-250染色により検出した。CLL-AAT細胞へ結合しない抗体であるScFv-7を陰性コントロールとして使用した。抗原帯をクマシーカラーリングされたゲルから切除し、質量分析法（MS）により特定した。MALDI-MSはthe Proteomics Core Facility of The Scripps研究所（ラホーヤ、CA）で実施した。 $\mu$ LC/MS/MSをハーバード微量化学機関（ケンブリッジ、MA）で実施した。

#### 【0021】

図13は、3種のscFv抗体がヒトOX-2/CD200 cDNAクローンで一時的にトランスフェクトされた293-E B N A細胞へ特異的に結合することを示す。OX-2/CD200 cDNAをRT-PCR法によりCLL細胞からクローンし、哺乳動物の発現ベクターpCEP4（インビトロジェン社製）中へ挿入した。pCEP4-CD200プラスミド又は対応するエンプティベクターpCEP4を「Polyfect」試薬（QIAGEN社製）を使用して293-E B N A細胞中へトランスフェクトした。トランスフェクション2日後、細胞をフローサイトメトリーによりscFv抗体への結合を分析した。

図14は、OX-2/CD200トランスフェクト細胞の存在は、IL-2及びIFN-等のTh1サイトカインのダウンレギュレーションを生じることを示した。抗-OX-2/CD200抗体の30 $\mu$ g / mlでの添加はTh1応答を完全に修復した。

#### 【0022】

図15は、混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在は、IL-2へのTh1応答のダウンレギュレーションを生じたことを示す。

図16は、混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在は、IFN-へのTh1応答のダウンレギュレーションを生じたことを示す。

図17A及びBは、ヒト（細胞）の存在又は不存在のいずれかで、 $4 \times 10^6$ RAJI細胞を皮下注射した全ての群のNOD/SCIDマウスの腫瘍体積の平均+/-SDを示す。

図18は、2種のパラメトリック検定（スチューデントt-法及びWelch法）並びに1種のノンパラメトリック検定、Wilcoxon法を使用して実施した統計的分析の結果を示す。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0023】

##### 詳細な説明

本発明では、被験者中でOX-2/CD200がアップレギュレートされるかを決定し、その場合には被験者へOX-2/CD200へ結合するポリペプチドを投与する方法を開示する。一般的に、本発明で使用されるポリペプチドは、当業者に公知の複数の異なる技術を使用して構成できる。例えば、ポリペプチドは、化学的合成により得られる。又例えば、ポリペプチドは

10

20

30

30

40

50

抗体でもよく、1以上の抗体の1又は数個のフラグメントから構成されてもよい。

【0024】

好ましくは、本発明の方法で使用されるポリペプチドは、CLL細胞系から得られる。ここで使用される「CLL」は、本発明を限定するものではないが、B細胞CLL(B-CLL)等のB細胞及びT細胞の種々の発生段階を含むいずれかのリンパ球等の慢性リンパ性白血病をいう。ここで使用されるB-CLLは、CD5<sup>+</sup>、CD23<sup>+</sup>、CD20<sup>dim+</sup>、sIg<sup>dim+</sup>であり、細胞サイクルのG0/G1中で捕捉された成熟B細胞表現型を有する白血病を言う。本発明では又、CLL細胞系は、癌及びCLL等の、OX-2/CD200がアップレギュレートされる症状の診断及び/又は治療に有用な抗体を含むポリペプチドの作成に使用される。

【0025】

ここで使用される用語「抗体」は、選択された標的へ結合可能な完全抗体又は抗体フラグメントを言う。例示として挙げられるのは、Fv、scFv、Fab'及びF(ab')2、モノクローナル及びポリクローナル抗体、設計された抗体(キメラの、CDR-グラフトされた、ヒト化、完全なヒト抗体、及び人工的に選択された抗体を含む)、並びにファージディスプレイ又は代わりの技術を使用して作成された合成的又は半合成的抗体である。Fv及びscFv等の小フラグメントは、それらの小サイズ及びその結果の優れた組織分布性のために診断用及び治療用応用に有利な性質を有する。

【0026】

ここで使用されるポリペプチド及び/又は抗体は、特に診断用及び治療用応用のために示された。従って、それらは毒素又は標識等のエフェクター蛋白質で変容される。好ましくは、in vivoでのポリペプチド又は抗体の分布の画像化を可能とする標識である。これらの標識は、金属粒子等の放射性標識又は放射線不透過性標識でもよく、それらは容易に患者の体内中で画像化できる。更に、標識は、蛍光性標識又は、患者から取り出された組織サンプルにおいて画像化できる他の標識でもよい。

【0027】

抗体は、ここで免疫原として開示された細胞を使用して作成され、モノクローナル抗体が単離できる動物中の免疫反応を引き起こす。これら抗体の配列は決定され、抗体又はその変異体が組み換え型技術により作成できる。ここで「変異体」とは、モノクローナル抗体の配列を基礎とする、キメラ化、CDR-グラフト化、ヒト化及び完全なヒト抗体、並びにOX-2/CD200へ結合できるポリペプチドをいう。

更に、組み換え型ライブラリー(ファージ抗体)由来の抗体は、標的特異性を利用して抗体またはポリペプチドを単離するための対象として、ここで記載された細胞又はそれら由来のポリペプチドを使用して、選択できる。

【0028】

本発明では又、抗体又はポリペプチドは、原発性CLL細胞又はそれら由来の抗原を使用して抗体ライブラリーをパンニングして生産でき、更に、例えば上記CLL細胞系等のCLL細胞系を使用して、スクリーニングされ、及び/又は特徴付けられてもよい。従って、本発明はCLLに特異的な抗体又はポリペプチドを特徴付ける方法を提供し、その方法は抗体又はポリペプチドのCLL細胞系への結合の評価を含む。

【0029】

細胞系の構築

細胞系は、当業者に公知の確立した方法に従い作成できる。一般的に、細胞系は、患者由来の原発性細胞を不死化細胞が自然に培養物中に生じるまで培養して作成する。これら細胞を次に単離し、更に培養してクローニング細胞母集団又はアポトーシス耐性を示す細胞を作成する。

【0030】

例えば、CLL細胞は、CLL患者から採取された末梢血から単離されてもよい。細胞は洗浄され、存在する細胞の型を決定するために、任意で免疫型が決定される。次に、細胞はIL-4含有媒体等の媒体中で培養されてもよい。好ましくは媒体の全部又は一部は、培養プロセス中で1以上の回数で交換される。そして細胞系が単離され、培養物中の成長増加に

10

20

30

40

50

より特定される。

【0031】

本発明では又、E B Vによる不死化では確立されていない悪性起源のCLL細胞系も提供される。「悪性起源」は、例えばE B Vで形質転換した非増殖性細胞とは異なる、悪性CLL原発性細胞からの細胞系の派生物を言う。本発明で使用できる細胞系は、それ自身の表現型は悪性でもそうでなくてもよい。「悪性」表現型を有するCLL細胞は、基質媒体に接觸していない細胞成長を包含し、細胞成長サイクルの繰り返しを特徴とし、アポトーシス耐性を示す。原発性CLL細胞由来の細胞系は、ATCC寄託番号PTA-3920として寄託された。好ましくは、細胞系はCLL-AATである。CLL-AATは、B-CLL原発性細胞由来のB-CLL細胞系である。

10

【0032】

例えば、CLL細胞中で特異的に発現する蛋白質は、免疫沈降及びその後の質量分光分析等の当業者に公知の方法により、CLL-AAT細胞系を使用して特定される。これら蛋白質は、CLL-AAT細胞系中、又はCLL患者由来の原発性細胞中で特異的に発現する。

【0033】

小分子ライブラリー（市場で多くのものが入手可能である）が、細胞の成長特性を調整可能な試薬を特定するために細胞ベースのアッセイ中でCLL-AAT細胞系を使用してスクリーニングされる。例えば、CLL-AAT細胞系中のアポトーシスを調節するか、又はそれらの成長及び／又は増殖を阻害する試薬が特定できる。これら試薬は、治療用化合物の開発対象の候補である。

20

【0034】

CLL-AAT細胞系から単離された核酸は、CLL特異的遺伝子を特定する減法(subtractive)ハイブリダイゼーション実験中で、又はマイクロアレイ分析（例えば、遺伝子チップ実験）中で使用できる。転写がCLL細胞中で調節される遺伝子が、特定できる。この方法で特定されたポリペプチド又は核酸遺伝子製品は、抗体の開発又はCLL用の小分子治療法用に指標として使用できる。

【0035】

例えば、CLL-AAT細胞系は、細胞表面成分へ結合し、次に細胞により内在化される内在性抗体を特定するために使用できる。これら抗体は治療用製品の候補である。特に、細胞質中に安定して留まり、細胞内結合活性を保持する单鎖抗体が、この方法でスクリーニングできる。

30

【0036】

モノクローナル抗体の作成

本発明で作成される抗体を改良するために、組み換え型DNA技術が使用できる。その場合、診断用又は治療用応用においてその免疫原性を減少させるために、キメラ抗体を構成できる。更に、免疫原性は、CDRグラフト法及び、任意の構造修飾により抗体をヒト化して最小化される。米国特許第5225539号を参照し、その内容をここで資料として使用する。

40

抗体は、動物血清から得られるか、モノクローナル抗体又はそのフラグメントの場合は細胞培養物中で生産される。組み換え型DNA技術が、細菌性又は好ましくは哺乳動物の細胞培養物中で確立された手順に従い、抗体を生産するために使用できる。選択された細胞培養系は、好ましく抗体生成物を分泌する。

【0037】

又例えば、本発明の抗体の作成方法は、ホスト、例えばE.coli、又はハイブリッドベクターで形質転換された哺乳動物細胞、を培養するステップを含むこともある。ベクターは、適切なリーディングフレーム中で抗体蛋白質をエンコードする第二DNA配列ヘリンクしたシグナルペプチドをエンコードする第一DNA配列へ、作動可能なようにリンクしたプロモーターを含有する、1以上の発現カセットを含む。次に抗体蛋白質を採取し、単離する。任意で、発現カセットは、それぞれ個々に適切なリーディングフレーム中で作動可能なようにシグナルペプチドヘリンクされた、抗体蛋白質をエンコードする、ポリシスト

50

ロニック、例えばバイシストロニックなDNA配列へ作動可能なようにリンクしたプロモーターを含む。

#### 【0038】

ハイブリドーマ細胞又は哺乳動物のホスト細胞のin vitro増殖は、通常の標準的培養媒体（例えば商標「Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)又はRPMI 1640 Medium」）等の適切な培養媒体中で行われ、任意で、哺乳動物の血清（例えばウシ胎仔血清）、又は微量元素及び成長維持用補充剤（例えば正常マウス腹膜性滲出細胞、脾臓細胞、骨髄マクロファージ等の支持細胞、2-アミノエタノール、インシュリン、トランスフェリン、低比重リポ蛋白、オレイン酸等）を補充してもよい。細菌細胞又は酵母菌であるホスト細胞の増殖は、公知の適切な培養媒体中で同様に実施できる。例えば、細菌用の適切な培養媒体として、Medium LE、NZCYM、NZYM、NZM、terrific broth、SOB、SOC、2xyt、又はM9 Minimal Mediumが挙げられる。酵母用の適切な培養媒体として、Medium YPD、YEPD、Minimal Medium、又はcomplete minimal dropout Mediumが挙げられる。

#### 【0039】

In vitro生産は、比較的純粋な抗体製剤を提供し、規模拡大して大量の目的とする抗体を得ることが出来る。細菌細胞、酵母、植物、又は哺乳動物細胞の培養技術は公知であり、均質の懸濁液培養物（例えば、気泡式反応器中又は連続的攪拌反応器中）、及び固定化した又は捕捉化した細胞培養物（例えば、中空纖維中、マイクロカプ細胞中、アガロースマイクロビーズ上又は磁器カートリッジ上）が挙げられる。

#### 【0040】

大量の目的とする抗体も又、哺乳動物細胞のin vivo増殖により得ることができる。この目的のため、目的とする抗体を生産するハイブリドーマ細胞を、組織適合性哺乳動物中に注射し、抗体生産腫瘍の成長を引き起こす。任意で、動物は注射前に炭化水素、特にブリストン（テトラメチル-ペンタデカン）等の鉱物油を予め投与した(primed)。1~3週間後、抗体はこれら哺乳動物の体液から単離される。例えば、ハイブリドーマ細胞は、適切な骨髄腫細胞を、Balb/cマウスからの抗体生産脾臓細胞との融合、又は目的とする抗体を生産するハイブリドーマ細胞系Sp2/0由来のトランスフェクトされた細胞、により得られ、任意でpristineで予備処理したBalb/cマウスへ腹膜内注射した。1~2週間後、腹水流体が上記動物から得られる。

#### 【0041】

上記及び他の技術は、下記試料に記載されている：例えば、Kohler及びMilstein、(1975)Nature 256, 495-497;米国特許第4376110号;Harlow及びLane、Antibodies:Laboratory Manual、(1988)Cold Spring Harborであり、それらの全ての開示をここで資料として使用する。組み換え型抗体分子の製造技術は、上記資料及び例えば下記に記載されている：国際公開W097/08320号;米国特許第5427908号;米国特許第5508717号;Smith、1985、Science、Vol.225、pp1315-1317;Parmley及びSmith1988、Gene 73、pp305-318;De La Cruzら、1988、Journal of Biological Chemistry、263pp4318-4322;米国特許第5403484号;米国特許第5223409号;国際公開W088/06630号;国際公開W092/15679号;米国特許第5780279号;米国特許第5571698号;米国特許第6040136号;Davisら、Cancer Metastasis Rev.、1999, 18(4):421-5;Taylorら、Nucleic Acids Research 20(1992), 6287-6295;Tomizukaら、Proc.Nat.Academy of Sciences USA 97(2)(2000);722-727。これら開示の全てをここで資料として使用する。

#### 【0042】

細胞培養物上澄みは、好ましくは、CLL細胞の免疫蛍光性染色法により、免疫プロット法により、サンドイッチアッセイ又はドットアッセイ等の酵素免疫アッセイ、又は放射性免疫アッセイにより目的とする抗体をスクリーニングされる。

抗体の単離用に、培養物上澄み中又は腹水流体中の免疫グロブリンが、例えばアンモニウム硫酸塩での沈殿、ポリエチレンギリコール等の吸湿性材料に対する透析、選択膜を通して過等により濃縮されてもよい。必要な場合及び/又は目的とする場合、抗体は、通常のクロマトグラフィー方法、例えばゲルろ過、イオン交換クロマトグラフィー、DEAE

10

20

30

40

50

- セルロースでのクロマトグラフィー及び / 又は (免疫) アフィニティクロマトグラフィー、例えば本発明の CLL 細胞系由来の 1 以上の表面ポリペプチドを有する又はプロテイン - A 又は G を備えたアフィニティクロマトグラフィーにより精製できる。

#### 【 0 0 4 3 】

本発明は又、細胞系に対する抗体を分泌する細菌細胞系の調製プロセスを提供し、それはウサギ等の適切な哺乳動物が、プールされた CLL 患者サンプルで免疫化されることに特徴付けられる。免疫化されたウサギから生産されるファージディスプレイライブリーは、当分野で公知の方法 (例えば、ここで資料として使用する種々の資料中に開示された方法) に従い構築され、目的とする抗体をパンニングされる。

#### 【 0 0 4 4 】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞も又、本発明の範囲内である。好ましいハイブリドーマ細胞は、遺伝子的に安定で、上記目的とする特異性のモノクローナル抗体を分泌し、急速冷凍培養物から解凍及び再クローン化により活性化出来る。本発明は又、CLL 細胞系に対するモノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマ細胞系を作成する方法を提供する。このプロセス中、適切な哺乳動物、例えば B a 1 b / c マウスは、本発明の細胞、それ自身の細胞系、又は上記精製されたポリペプチドを含有する抗原性キャリアから由来する、1 以上のポリペプチド又はそれらの抗原性フラグメントで免疫化される。免疫化された哺乳動物の抗体生産細胞は、一時的に培養物中で増殖され、又は適切な骨髄腫細胞系の細胞と融合される。融合で得られたハイブリッド細胞はクローン化され、目的とする抗体を分泌する細胞クローンが選択される。例えば、本発明の細胞系で免疫化した B a 1 b / c マウスの脾臓細胞が、骨髄腫細胞系 P A I 又は骨髄腫細胞系 S p 2 / 0 - A g 1 4 の細胞と融合され、得られたハイブリッド細胞は目的とする抗体を分泌するかスクリーニングされ、陽性ハイブリドーマ細胞がクローン化される。

#### 【 0 0 4 5 】

好ましくは、B a 1 b / c マウスが、本発明の細胞系の  $10^6 \sim 10^7$  細胞を、数回、例えば 4 ~ 6 回、数月間、例えば 2 ~ 4 月間の皮下注射及び / 又は腹膜内注射により免疫化されることを特徴とするハイブリドーマ細胞系の作成プロセスである。免疫化されたマウスからの脾臓細胞は、最後の注射 2 ~ 4 日後に取り出され、融合プロモーター、好ましくはポリエチレンギリコールの存在下で骨髄腫細胞系 P A I の細胞と融合される。好ましくは、骨髄腫細胞は、分子量約 4 0 0 0 のポリエチレンギリコール約 3 0 % ~ 約 5 0 % を含有する溶液中で、3 ~ 1 2 倍過剰の、免疫化されたマウスからの脾臓細胞と融合される。融合後、細胞は適切な上記の培養媒体中で膨張され、正常骨髄腫細胞を目的とするハイブリドーマ細胞への過度の成長から防止するために、選択培地、例えば H A T 培地を一定の間隔で補充される。

#### 【 0 0 4 6 】

本発明では更に、本発明の細胞系に対する抗体の重鎖可変領域及び / 又は軽鎖可変領域をコードする挿入部分を含有する組み換え型 DNA が生産される。用語 DNA は、コーディング単鎖 DNA 、上記コーディング DNA 及びその相補的 DNA から構成される二重鎖 DNA 、又はこれら相補的 ( 単鎖 ) DNA 自身を含有する。

#### 【 0 0 4 7 】

更に、本発明の細胞系に対する抗体の重鎖可変領域及び / 又は軽鎖可変領域をエンコードする DNA は、酵素的に又は化学合成された、重鎖可変領域及び / 又は軽鎖可変領域をコードするオーセンティック DNA 配列、又はそれらの突然変異体を有する DNA でもよい。オーセンティック DNA の突然変異体は、その中の 1 以上のアミノ酸が欠落するか 1 以上の他のアミノ酸と置換されている、上記抗体の重鎖可変領域及び / 又は軽鎖可変領域をエンコードする DNA である。好ましくは上記改質部は、ヒト化及び発現最適化適用における抗体の重鎖可変領域及び / 又は軽鎖可変領域の C D R の外側にある。用語「突然変異 DNA 」は又、1 以上のヌクレオチドが同じアミノ酸をコードする新しいコドンを有する他のヌクレオチドで置換されているサイレント突然変異体を含む。用語「突然変異配列」は又、縮重 (degenerated) 配列を含む。縮重配列は、無制限の数のヌクレオチドが最初

10

20

30

40

50

にエンコードされたアミノ酸配列の変化を生じずに他のヌクレオチドにより置換されている遺伝暗号の意味の範囲内で変性している。これら縮重配列は、重鎖ネズミ可変領域及び／又は軽鎖ネズミ可変領域の最適の発現を得るために、特異的ホスト、好ましくはE.coliに適している、それらの異なる制限酵素認識部位及び／又は特定のコドンの頻度のために有用である。

#### 【0048】

用語「突然変異体」は、当分野で公知の方法に従いオーセンティックDNAのin vitro突然変異誘発により得られるDNA突然変異体を含むことを意図する。

完全四分割型免疫グロブリン分子の組み立て及びキメラ抗体の発現のために、重鎖及び軽鎖可変領域をコードする組み換え型DNA挿入部分は、重鎖及び軽鎖定常領域をコードする対応するDNAと融合され、次に例えばハイブリッドベクターへの組み込み後、適切なホスト細胞中へ転移される。

#### 【0049】

本発明は又、ヒト定常領域g、例えば1、2、3又は4、好ましくは1又は4へ融合される、本発明の細胞系に対する抗体の重鎖ネズミ可変領域をコードする挿入物を含む組み換え型DNAも提供する。又本発明は、ヒト定常領域K又は、好ましくはKへ融合される、本発明の細胞系に対する抗体の軽鎖ネズミ可変領域をコードする挿入物を含む組み換え型DNAも提供する。

#### 【0050】

本発明は又、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域はスペーサーグループによりリンクされており、任意でホスト細胞中の抗体のプロセシングを促進するシグナル配列、及び／又は抗体の精製を促進するペプチドをコードするDNA、及び／又は切断部位、及び／又はペプチドスペーサー及び／又はエフェクター分子を含有する、組み換え型ポリペプチドをコードする組み換え型DNAに関する。

エフェクター分子をコードするDNAは、診断用又は治療用応用に使用できるエフェクター分子をコードするDNAであることを意図する。従って、毒素又は酵素、特にプロドラッグの活性化を触媒できる酵素であるエフェクター分子が好ましいものとして挙げられる。エフェクター分子等をエンコードするDNAは、DNAをエンコードする天然酵素又は毒素の配列、又はそれらの突然変異体を有し、当分野で公知の方法により調製できる。

#### 【0051】

本発明の抗体及び抗体フラグメントは診断及び治療法に有用である。従って、本発明の抗体を含有する治療法又は診断用組成物も提供される。

診断用組成物の場合、抗体は好ましくは酵素、蛍光性、放射性同位体又は他の手段でもよい抗体検出手段と共に提供される。抗体及び検出手段は、診断に用いられる診断用キット中の同時、分離的又は逐次的使用のために提供される。

上記開示は抗体に対するが、ある場合にはこれら抗体由来のポリペプチドも本発明の開示に従い使用できる。

#### 【0052】

##### CLL細胞系の使用

CLL細胞系の開発には、CLL、癌、及び、OX-2/CD200のレベルがアップレギュレートされる特徴を有する、例えば黒色腫等の他の病状の診断及び治療開発のための重要なツールを提供するような多くの利点がある。

本発明の細胞系は、CLL、及びOX-2/CD200のレベルがアップレギュレートされる特徴を有する他の病状の病因、発病及び生物学に関するin vitro研究用に使用できる。これはこれら疾患の治療法に有用な適切な試薬の特定を補助する。

#### 【0053】

本発明の細胞系は又、CLL、癌、及び上記OX-2/CD200のレベルがアップレギュレートされる特徴を有する他の病状（例えば、黒色腫）のin vitro及びin vivo診断用、並びに、抗体ライブラリーを原発性細胞及び／又はCLL患者由来の抗原を使用してパンニングする等の他の方法により生産された抗体のスクリーニング及び／又は分析用ポリペプチド及び

10

20

30

40

50

/又はモノクローナル抗体を生産するのに使用できる。

本発明の細胞系はこの様に使用でき、抗原はそれから由来できる。都合の良いことに、これら抗原は、CLLに特異的な細胞-表面抗原である。それらは本発明の細胞系から直接に単離できる。一方、本発明の細胞系から作成されたcDNA発現ライブラリーはCLL特異的抗原の発現に使用でき、抗-CLL抗体の選択及び分析並びに新規なCLL特異的抗原の特定に使用できる。

#### 【0054】

モノクローナル抗体治療法を使用したCLLの治療が当分野で提案された。近年、Hainsworth (Oncologist 5(5)(2000)376-384)は、モノクローナル抗体由來の最新の治療法を示した。特にリンパ性白血病は、リンパ球腫瘍上の複数のリンパ球特異的抗原の存在を理由として、この治療用アプローチの良い候補となると考えられる。10

現在の抗体治療法 (B-リンパ球の表面に発現するCD20 - 抗原に対するRituximabTM等)が、ある種のリンパ球性疾患に対し成功して使用されている。しかし、低密度CD20抗原が、CLL中のB-リンパ球表面上に発現する(Almasriら、Am.J.Hematol.、40(4)(1992)259-263)。

従って、本発明のCLL細胞系は、本発明のCLL細胞系の1以上の抗原性決定基に対する特異性を有する新規な抗-CLL抗体及びポリペプチドの開発、並びに、CLL、癌、及びOX-2/CD200のレベルがアップレギュレートされる特徴を有する他の病状の治療法及び診断におけるそれらの使用を可能とする。

#### 【0055】

抗体又はポリペプチドは、OX-2/CD200が通常相互作用するレセプターへ結合し、その結果、OX-2/CD200のレセプターへの結合を防止又は阻害する。一方、抗体はOX-2/CD200の発現を調節する抗原へも結合でき、その結果OX-2/CD200の正常な又は増加した発現を防止又は阻害できる。OX-2/CD200の存在は免疫反応の減少と関連するために、OX-2/CD200の代謝経路を抑制して、患者の免疫系が癌又はCLL等の病状をより効果的に防御できるようになることが望まれる。20

#### 【0056】

好ましい実施態様では、本発明のポリペプチドはOX-2/CD200へ結合する。例えば、本発明のポリペプチドは、OX-2/CD200へ結合する抗体でもよく、OX-2/CD200が他の分子又はレセプターと相互作用することを防止又は阻害する。CLL細胞及び、OX-2/CD200を過発現する別の細胞はTh1サイトカインの製造を非常に減少させるために、OX-2/CD200へ結合する抗-CD200抗体又はポリペプチドの、アップレギュレートされたOX-2/CD200レベルを有する被験者への投与は、Th1サイトカインプロファイルを回復する。従って、これらポリペプチド及び/又は抗体は、CLL及び、OX-2/CD200を過発現する他の癌又は疾患の治療における治療用試薬に使用できる。30

#### 【0057】

従って又、本発明の方法は、OX-2/CD200が存在するか被験者をスクリーニングするステップ及びOX-2/CD200へ結合するポリペプチドの投与ステップを含有してもよい。好ましい実施態様では、CLL患者は過OX-2/CD200の発現をスクリーニングされ、OX-2/CD200へ結合する抗体が患者へ投与される。下記に詳細に記載されるように、これら抗体の1種は、OX-2/CD200へ結合するscFv-9(参照図9B)である。40

#### 【実施例】

#### 【0058】

当業者が本発明の組成物及び方法をよりよく実施できるように、下記実施例を例示のために示す。

##### 実施例1:

###### 細胞系CLL-AATの単離(細胞系の構築)

CLLと診断された患者から末梢血を得た。WBC値は $1.6 \times 10^8 / \text{ml}$ だった。単核球をHistopaque-1077密度勾配遠心機(Sigma Diagnostics、セントルイス、MO)により単離した。細胞を、10%熱不活性化胎児ウシ血清(FBS)を補充したIscove's Modifi

10

20

30

40

50

ed Dulbecco's Medium (IMDM)で2回洗浄し、5mlの氷冷IMDM/10%FBS中で再懸濁した。生存細胞をトリパンブルーで染色して計測した。細胞を同体積の85%FBS/15%DMSOと混合し、液体窒素中で貯蔵用1mlアリコートで冷凍した。

#### 【0059】

免疫表現型は、>90%のCD45+リンパ球母集団は、IgD、カッパ軽鎖、CD5、CD19、及びCD23を発現したことを示した。この母集団も又低レベルのIgM及びCD20を発現した。約50%の細胞は、高レベルのCD38を発現した。細胞は、ラムダ軽鎖、CD10及びCD138陰性だった。細胞のアリコートを、解凍し、洗浄し、20%熱不活性化FBS、2mMのL-グルタミン、100単位/mlのペニシリン、100μg/mlのストレプトマイシン、50μMの2-メルカプトエタノール、及び5ng/ml組み換え型ヒトIL-4 (R&Dシステムズ社製、ミネアポリス、MN)を補充した密度 $10^7$ /mlでIMDMで再懸濁された。細胞を37℃、湿性5%CO<sub>2</sub>雰囲気中で培養した。媒体を安定した成長が観察されるまで部分的に4日ごとに交換した。5週間後、培養物中の細胞数は、約4日毎に二倍になり始めた。この細胞系をCLL-AATとした。

#### 【0060】

##### 細胞系の特徴付け(分析)

フローサイトメトリーによる細胞系の免疫表現型は、IgM、カッパ軽鎖、CD23、CD38、及びCD138の高い発現、CD19及びCD20の中程度の発現、並びにIgD及びCD5の弱い発現を示した。細胞系は、ラムダ軽鎖、CD4、CD8、及びCD10に陰性だった。

細胞系の免疫表現型決定も又、原発性B-CLL細胞へ特異的に結合するように選択されたウサギscFv抗体のパネルを使用して全細胞ELISAにより行われた。これらCLL特異的scFv抗体の全ても又、CLL-AAT細胞系を認識した。反対に、scFvの大部分は、B細胞リンパ腫由来の2個の細胞系 (Ramos、バーキットリンパ腫細胞系) 及びRL (非ホジキン病リンパ腫細胞系) へは結合しなかった。

#### 【0061】

##### 実施例2：抗体ファージディスプレイ及び細胞表面パンニングを使用したB-CLL特異的細胞表面抗原用scFv抗体の選択(免疫化及びscFv抗体ライプラリー構築)

末梢血单核球 (PBMC) を、Scripps病院 (ラホーヤ、CA) でCLL患者から採取された血液から単離した。2頭のウサギを、10人の異なるCLL患者ドナーからプールされた $2 \times 10^7$  PBMCで免疫化した。3回の免疫化 (2回の皮下注射の後に1回の静脈内注射) を、3週間間隔で行った。血清タイターをフローサイトメトリーを使用して原発性CLL細胞への血清IgGの結合を測定することにより調査した。最終免疫化5日後、脾臓、骨髄、及びPBMCを動物から採取した。合計RNAは、これら組織から商品名Tri-Reusable (Molecular Research Center社製) を使用して単離した。単鎖Fv(scFv)抗体ファージディスプレイライプラリーを、先の文献(Barbasら、(2001)ファージディスプレイ:「実験マニュアル」、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、New York)記載のとおりに構築した。細胞表面パンニング用に、再増幅したライプラリーからのファージミド粒子をポリエチレングリコール (PEG) で沈降させ、1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含有するリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に再懸濁し、一晩PBSに対し透析した。

#### 【0062】

##### 細胞表面パンニングによる抗体選択

Siegelら (1997、J.Immunol.Methods 206:73-85)が記載したように、磁気細胞分離装置 (MACS) で陽性 - 陰性の選択により、ライプラリーをCLL細胞表面 - 特異的抗体で集積 (培養) した。簡潔に言うと、scFv抗体ライプラリーからのファージミド粒子をMPBS (2%非脂肪乾燥乳、0.02%アジ化ナトリウムPBS溶液、pH 7.4) 中で1時間、25℃でブレインキュベートし、非特異的結合部位をブロックした。約 $10^7$ の原発性CLL細胞を、常磁性マイクロビーズ (Miltenyi Biotec社製、サンベール、CA) と複合したマウス抗CD5 IgG及びマウス抗-CD19 IgGで標識化した。結合して

10

20

30

40

50

いないマイクロビーズを洗浄により除去した。標識化したCLL細胞（標的細胞）を過剰の「抗原 - 陰性吸収細胞」と混合し、ペレット化し、 $50\text{ }\mu\text{l}$  ( $10^{10} \sim 10^{11}\text{ c f u}$ ) のファージ粒子中に再懸濁した。吸収細胞は、非特異的に細胞表面へ結合するファージ並びに、標的細胞及び吸収細胞の両方に存在する「通常の」抗原に特異的なファージを吸収する作用を有する。使用された吸収細胞は、TF-1細胞（ヒト赤白血病細胞系）又は免疫磁性陰性選択法（商標「Stem Sepsystem」、Stem Cell Technologies社製、バンクーバー、カナダ）により末端血から単離された正常ヒトB細胞のいずれかである。吸収細胞の標的細胞に対する割合は、体積で約10倍である。 $25^{\circ}$ でインキュベーション30分後、細胞 / ファージ混合物を、商標「MiniMACSMS<sup>+</sup>」分離カラムへ移動した。カラムを $0.5\text{ ml}$ のM PBSで2回、 $0.5\text{ ml}$ のPBSで1回洗浄し、結合していないファージ及び吸収細胞を除去した。標的細胞を $1\text{ ml}$ のPBSでカラムから溶離し、最大速度で15秒間、マイクロ遠心機中でペレット化した。捕捉されたファージ粒子を、 $200\text{ }\mu\text{l}$ の酸溶離バッファ（ $0.1\text{ N HCl}$ 、pHはグリシンで $2.2$ に調整した、及び $1\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ のBSA）中で標的細胞を再懸濁することにより溶離した。 $25^{\circ}$ で10分間のインキュベーション後、バッファを $12\text{ }\mu\text{L}$ の2Mの商品名「Trisbase」（pH 10.5）で中和し、溶離したファージをE.coli中で次回のパンニングのために増幅した。それぞれの回のパンニングでは、インプット及びアウトプットファージタイターを決定した。インプットタイターは標的細胞 / 吸収細胞混合物へ添加された再増幅したファージ粒子の数であり、アウトプットタイターは標的細胞から溶離した捕捉されたファージの数である。集積係数(enrichment factor) (E) は、式  $E = (R_n\text{ アウトプット} / R_1\text{ インプット}) / (R_1\text{ アウトプット} / R_1\text{ インプット})$  を使用して計算する。多くの場合、集積係数の $10^2 \sim 10^3$ 倍が第3又は第4回により達成される。

#### 【0063】

##### パンニング後の集積化（培養）した抗体プールの分析

3 ~ 5回のパンニング後、捕捉されたファージのプールをフローサイトメトリー及び / 又は全細胞ELISAによりCLL細胞への結合をアッセイした：

1. HA - 標識化可溶性抗体の形の完全なプールを生産するために、E.coli（例えば商品名TOP10F'）の非サブレッサ系統(strain)  $2\text{ ml}$  を  $1\text{ }\mu\text{l}$  ( $10^9 \sim 10^{10}\text{ c f u}$ ) のファージミド粒子で感染させた。オリジナルの、パンニングされていないライブラリーを陰性コントロールとして使用した。カルベニシリンを最終濃度 $10\text{ }\mu\text{M}$ まで添加し、培養物を $37^{\circ}$ で $250\text{ rpm}$ 、1時間振とうしてインキュベートした。 $50\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ カルベニシリンを含有するSB媒体 $8\text{ ml}$ を添加し、培養物を~ $0.8$ のOD600まで増殖させた。LacプロモーターからのscFv発現を誘起するためにIPTGを添加して最終濃度 $1\text{ mM}$ とし、 $37^{\circ}$ での振とうを4時間連続した。培養物を $3000\times g$ で15分間遠心分離した。可溶性抗体を含有する上澄みをろ過し、 $1\text{ ml}$ アリコート中 -  $20^{\circ}$ で貯蔵した。

2. scFv抗体プールの、吸収細胞への結合に対する標的細胞への結合を、フローサイトメトリーにより高親和性ラット抗-HA（商品名「クローン3F10」Roche Molecular Biochemicals社製）を第2抗体として使用して、PE - 複合ロバ抗 - ラットを第3抗体として使用して決定した。

3. 抗体プールの、吸収細胞への結合に対する標的細胞への結合を、同様に下記全細胞ELISA法により決定した。

#### 【0064】

##### パンニング後の個々のscFvクローンのスクリーニング

パンニング後の個々のscFvクローンをスクリーニングするために、商品名TOP10F'細胞を上記ファージプールで感染させ、カルベニシリン及びテトラサイクリンを含有するLBプレート上に広げ、一晩 $37^{\circ}$ でインキュベートした。個々のコロニーを、ウェル当たり $0.6 \sim 1.0\text{ ml}$ のSB-カルベニシリン媒体を含む深型96 - ウェルプレート中でインキュベートした。培養物を、6 ~ 8時間商品名「HiGro振とう培養器」（Gene Machines社製、サンカルロス、CA）中で $520\text{ rpm}$ で $37^{\circ}$ で成長させた。この時点で、それぞ

れのウェルから  $90 \mu l$  アリコートを、 $10 \mu l$  の DMSO を含有する深型 96 - ウェルプレートへ移した。このレプリカプレートを  $-80^{\circ}\text{C}$  で貯蔵した。IPTG を元のプレートへ添加し、最終濃度  $1 \text{mM}$  とし、振とうを 3 時間続けた。このプレートを  $3000 \times g$  で 15 分間遠心分離した。可溶性 scFv 抗体を含有する上澄みを別の深型 96 - ウェルプレートへ移動して  $-20^{\circ}\text{C}$  で貯蔵した。

#### 【0065】

HA - 標識化 scFv 抗体をスクリーニングするための高感度全細胞 ELISA 法が開発された。

1. ELISA プレートをコンカナバリン A で被覆した ( $10 \text{mg}/\text{ml}$  溶液、 $0.1 \text{M}$  の  $\text{NaHCO}_3$ 、 $\text{pH } 8.6$ 、 $0.1 \text{mM}$  の  $\text{CaCl}_2$ )。

10

2. プレートを PBS で洗浄後、 $50 \mu l$  の PBS 中の  $0.5 \sim 1 \times 10^5$  標的細胞又は吸収細胞をそれぞれのウェルへ添加し、そのプレートを  $250 \times g$  で 10 分間遠心分離する。

3.  $50 \mu l$  の  $0.02\%$  グルタルアルデヒドの PBS 溶液を添加し、細胞を一晩 4 で固定化する。

4. PBS で洗浄後、非特異的結合部位を  $4\%$  非脂肪乾燥乳含有 PBS で 3 時間室温でプロックする。

5. 細胞は  $50 \mu l$  の可溶性、 HA - 標識化 scFv 又は Fab 抗体（商品名 TOP10F' 上澄み）と共に 2 時間室温でインキュベートされ、次に 6 回 PBS で洗浄される。

20

6. 結合した抗体は、マウス抗 - HA 第二抗体（クローン 12CA5）及びアルカリホスファターゼ (AP) - 複合 - 抗マウス IgG 第三抗体を使用して検出される。シグナルの約 10 - 倍増幅は、第三抗体として AMDEXAP - 複合ヒツジ抗 - マウス IgG (Amersham Pharmacia Biotech 社製) により得られる。AMDEX 抗体は、デキストララン鎖を介して複数の AP 分子へ接合される。染色はアルカリホスファターゼ基質 PNPP で実行され、 $405 \text{nm}$  でマイクロプレートリーダーを使用して測定される。

20

#### 【0066】

scFv クローナンの主なスクリーニングは、原発性 CLL 細胞を正常ヒト PBMC と比較する ELISA により行った。CLL 細胞で陽性であり正常 PBMC では陰性であったクローナンを、正常ヒト B 細胞、ヒト B 細胞系、TF-1 細胞、及び CLL-AAT 細胞系に関する ELISA で再スクリーニングした。クローナンも又 3 人の異なる患者から単離された CLL 細胞を ELISA により再スクリーニンして、患者特異的又は血液タイプ特異的抗原と認められるクローナンを排除した。代表的 ELISA 結果を図 2 ~ 6 に示し、図 9 にまとめた。

30

得られた特定の scFv 抗体クローナンの数を DNA フィンガープリント法及び塩基配列決定法により決定した。scFv DNA 插入部分を PCR 法によりプラスミドから増幅し、制限酵素 BstNI で消化した。得られたフラグメントを  $4\%$  アガロースゲル上で分離し、臭化エチジウムで染色した。異なる制限フラグメントパターンを有するクローナンは、当然異なるアミノ酸配列を有する。同一のパターンを有するクローナンは、類似又は同一の配列を有すると予想される。特定の BstNI フィンガープリントを有するクローナンを、更に DNA 塩基配列決定法により分析した。密接に関係する相補性決定領域を有する抗体の 16 グループへクラスター化できる、25 の異なる配列が発見された（図 9）。

40

#### 【0067】

##### フローサイトメトリーによる scFv 抗体の分析

数個の scFv 抗体の結合特異性を 3 色フローサイトメトリーにより分析した（図 7）。正常ドナーから単離された PBMC を FITC 複合 - 抗 CD5 及び PERCP - 複合 - 抗 CD19 で染色した。scFv 抗体の染色を、第二抗体としてビオチン - 複合 - 抗 HA 並びに PE - 複合ストレプトアビシンを使用して行った。3 種の抗体、scFv-2、scFv-3 及び scFv-6 が、特に  $CD19^+ B$  リンパ球母集団（データは記載しない）を確認することが認められた。第 4 の抗体、scFv-9 は、2 種の明らかな細胞集団 ( $CD19^+ B$  リンパ球及び  $CD5^+ T$  リンパ球のサブセット) を認識した（図 7）。T 細胞サブセットの更なる分析は、それが  $CD4^+ CD8^- T_H$  細胞の部分母集団であることを示した（データは記載しない）。

50

## 【0068】

scFv抗体により認識された抗原が原発性CLL細胞で過発現するかどうかを決定するために、5人のCLL患者及び5人の正常ドナーからのPBM CをscFvで染色し、フローサイトメトリーで比較した（図8及び表2）。陽性細胞集団の平均蛍光強度（輝度）を比較することにより、CLL細胞に対する抗原の対応する発現レベルと正常細胞のそれを決定できた。1の抗体、scFv-2は、常にCLL細胞を正常PBM Cよりも低い強度に染色する一方、scFv-3及びscFv-6の両方は常にCLL細胞を正常PBM Cよりも高い輝度に染色した。第4抗体、scFv-9、は、5個中2個のCLLサンプルを正常PBM Cよりも低い強度で染色したが、残りの3個のCLLサンプルでは中程度の輝度に染色したに過ぎなかった（図8及び表2）。これはscFv-3及びscFv-6の抗原は、全てのでなくとも多くのCLL腫瘍で約2倍過発現される一方、scFv-9がCLL腫瘍のサブセットで3～6倍過発現したことを示す。

10

## 【0069】

CLL患者は、予後不良（生存期間中央値8年）の群及び予後良好（生存期間中央値26年）の群の2個のほぼ同じ（同数の）グループへ分割できる。数種の予後不良のインジケーターが、CLL用、とりわけVH遺伝子欠損細胞突然変異の存在及び高パーセンテージのCD38<sup>+</sup> B細胞の存在用に特定された。scFv-9がCLL患者のたった1種のサブセットで過発現した抗原を認識するかのために、scFv-9抗原の過発現は、10人のCLL患者からの血液サンプル中のCD38<sup>+</sup>細胞のパーセンテージと相関関係があるか否かの決定を試みた（図11）。その結果、scFv-9抗原の過発現及びCD38<sup>+</sup>細胞の割合は、互いに完全に独立することを示した。

20

## 【0070】

免疫沈降（IP）及び質量分析法（MS）によるscFv抗体により認識される抗原の特定

これら抗体に対する抗原を特定するために、scFvを、細胞表面ビオチン化CLL-AAT細胞のミクロソームフラクションから調製された溶解産物からの、抗原の免疫沈降に使用した（図12）。免疫沈降された抗原は、SDS-PAGEにより精製し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法（MALDI-MS）又はマイクロキャピラリー逆相HPLCナノエレクトロスプレーテンデム質量分析法（μLC/MS/MS）により特定した（データは記載しない）。この抗原はMALDI-MSにより、CLL及び活性化B細胞用マーカーとして公知のCD23として特定された。scFv-9は、CLL-AAT細胞から50kd抗体を免疫沈降した（図12）。この抗原はμLC/MS/MSにより、B細胞用マーカーとして公知でありCD4<sup>+</sup>T細胞及び胸腺細胞を活性化させるOX-2/CD200として特定された。OX-2/CD200は又、ニューロン及び内皮細胞などのいくつかの非リンパ球細胞上でも発現される。

30

## 【0071】

## 実施例3

OX-2/CD200を過発現して、サイトカイン応答をTh1応答（IL-2、IFN-）からTh2応答（IL-4、IL-10）へシフトさせる細胞の能力を、1人のドナーからの単球由来マクロファージ／樹状細胞及び異なるドナーからの血液由来のT細胞を使用して、混合されたリンパ球反応で評価した。OX-2/CD200発現細胞の源として、下記OX-2/CD200トランスフェクトされたEBNA細胞又はCLL患者サンプルのいずれかを使用した。

40

## 【0072】

293-EBNA細胞のトランスフェクション

293-EBNA細胞（インビトロジエン社製）を100mm皿当たり $2.5 \times 10^6$ で接種した。24時間後に細胞を、製造者の取り扱い説明書に従い商標「Polyfect reagent」（QIAGEN社製）を使用して一時的にトランスフェクトした。細胞を7.2μgのベクターpCEP4（インビトロジエン社製）中のOX-2/CD200 cDNA及び0.8μgのpAdV Antageベクター（Promega社製）で共トランスフェクトした。陰性コントロールとして、細胞を空pCEP4ベクター及びpAdVAntageで共トランスフェクトした。トランスフェクションの48時間後、約90%の細胞がそれらの表面にOX-2/CD200を発現したことがscFv-9抗体を使用してフローサイトメトリーにより決定された。

## 【0073】

50

### 血液単球からの樹状細胞 / マクロファージの成熟

バフィコートをサンディエゴ血液銀行から得て、原発性血液リンパ球（PBL）をFicoll（フィコール・ハイパーク法）を使用して単離した。細胞を1時間、2%ヒト血清を含有する商標「Eagles Minimal Essential Medium」(EMEM)中で接着し、次にPBSで激しく洗浄した。細胞を5日間、GM-CSF、IL-4及びIFN-γ又はM-CSFいずれかの存在下で、3日後にリポ多糖類（LPS）を添加するか又は無添加で培養した。成熟した細胞を採取し、線照射装置（Shepherd社製、型番MarkIモデル30照射器（Cs<sup>137</sup>））を使用して2000RADで照射した。

#### 【0074】

##### 混合リンパ球反応

混合リンパ球反応を、500000樹状細胞 / マクロファージ及び $1 \times 10^6$ レスポンダー細胞（responder cell）を使用して24ウェルプレート中にセットした。レスポンダー細胞は、Ficollを使用して末梢血から精製したT細胞集積化（培養）リンパ球である。T細胞は、細胞を1時間組織培養フラスコ中でインキュベートし、非接着T細胞フラクションを採取して集積（培養）した。500000のOX-2/CD200トランスフェクトされたEBNA細胞又はCLL細胞を、マクロファージ / 樹状細胞中へ30μg / mlの抗-CD200抗体（完全IgGへ転換されたscFv-9）の存在下又は不存在下で、リンパ球添加の2~4時間前に添加した。上澄みを48及び68時間後に採取し、サイトカインの存在を分析した。

#### 【0075】

##### scFv-9から完全IgGへの転換

scFv-9の軽鎖及び重鎖V型遺伝子を、それぞれの遺伝子の可変領域を、ヒトラムダ軽鎖不变領域遺伝子、及びヒトIgG1重鎖不变領域CH1遺伝子と、それぞれ結合するプライマーを使用したオーバーラップPCR法により増幅した。scFv-9の軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子の可変領域を、特定のプライマーで増幅し、ヒトラムダ軽鎖不变領域遺伝子及びIgG1重鎖不变領域CH1遺伝子を、下記特定のプライマーで分離的に増幅した：

R9VL-F1 QP: 5' GGC CTC TAG ACA GCC TGT GCT GAC TCA GTC GCC CTG 3' (SEQ ID No:26)  
R9VL/hCL2-Rev: 5' CGA GGG GGC AGC CTT GGG CTG ACC TGT GAC GGT CAG CTG GGT C 3' (SEQ ID No:27)

R9VL/hCL2-F: 5' GAC CCA GCT GAC CGT CAC AGG TCA GCC CAA GGC TGC CCC CTC G 3' (SEQ ID No:28)

R9VH-F1: 5' TCT AAT CTC GAG CAG CAG CTG ATG GAG TCC G 3' (SEQ ID No:29)

R9VH/hCG-Rev: 5' GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GC 3' (SEQ ID No:30)

R9VH/hCG-F: 5' GCA CCC TGG TCA CCG TCT CCT CAG CCT CCA CCA AGG GCC CAT CGG TG 3' (SEQ ID No:31)

hCL2-Rev: 5' CCA CTG TCA GAG CTC CCG GGT AGA AGT C 3' (SEQ ID No:32)

hCG-Rev: 5' GTC ACC GGT TCG GGG AAG TAG TC 3' (SEQ ID No:33)

増幅した生成物を精製し、オーバーラップPCR法を実施した。

#### 【0076】

最終生成物をXba I / Sac I（軽鎖）及びXho I / Pin I（重鎖）で消化し、ヒトFab発現ベクター、PAX243hGL中へクローンした。DNAクローンをDNA塩基配列決定によりPCRエラーについて分析した。hCMV IEプロモーター遺伝子をNot I / Xho I部位（重鎖の前方）に挿入した。ベクターをXba I / Pin I / EcoRI / Nhe Iで消化し、軽鎖プラスhCMVIEプロモーター及び重鎖遺伝子を含有する3472bpフラグメントをXba I / Pin I部位で、IgG1発現ベクターへ転移させた。

#### 【0077】

##### サイトカイン分析

混合リンパ球反応中のサイトカインプロファイルにおけるscFv-9の完全IgGへの変化の効果を決定した。

10

20

40

50

組織培養上澄み中に発見されるIL-2、IFN- $\gamma$ 、IL-4、IL-10及びIL-6等のサイトカインを、ELISAを使用して定量化した。それぞれのサイトカインに対するマッチした捕捉及び検出抗体ペアを、R+Dシステム社(ミネアポリス、MN)から得て、それぞれのサイトカイン用の標準曲線を組み換え型ヒトサイトカインを使用して生産した。抗-サイトカイン捕捉抗体を、最適の濃度でPBS中のプレート上に被覆した。インキュベーション一晩後、プレートを洗浄し、1%BSA及び5%スクロースを含有するPBSで1時間ブロックした。0.05%Tweenを含有するPBSで3回の洗浄後に上澄みへ、1%BSAを含有する2倍又は10倍のPBS希釀液を添加した。捕捉されたサイトカインを適切なビオチン化抗-サイトカイン抗体で検出し、次にアルカリホスファターゼ複合ストレプトアビジン及び「Sigma S substrate」を添加した。着色をELISAプレートリーダー(Molecular Devices社製)で評価した。

10

#### 【0078】

図14に示されるように、OX-2/CD200でトランスフェクトされ、アントラ nsフェクトではない細胞の存在は、IL-2及びIFN- $\gamma$ 等のTh1サイトカインのダウンレギュレーションを生じた。30 $\mu$ g/mlでの抗-CD200抗体の添加は、完全にTh1応答を回復し、この抗体がOX-2/CD200とそのレセプターとの相互作用をブロックしたことを見た。

図15及び16に示されるように、混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在はTh1応答のダウンレギュレーションを生じた。(図15はIL-2の結果を示し;図16はIFN- $\gamma$ の結果を示す。)これはOX-2/CD200を過発現する細胞(IB、EM、HS、BH)の場合だけでなく、OX-2/CD200を過発現しなかったCLL細胞(JR、JG及びGB)(これら細胞の発現レベルは、図11中に示される。)の場合でも同様である。しかし、抗-CD200抗体は、OX-2/CD200を過発現する細胞中のTh1応答を回復しただけであり、OX-2/CD200を過発現する患者では、マクロファージ上のそのレセプターと相互作用するOX-2/CD200を阻止すれば、Th1応答の回復に充分であることを示した。OX-2/CD200を過発現しない患者では、他の機構がTh1応答のダウンレギュレーションに含まれることが明らかになった。

20

#### 【0079】

##### 腫瘍拒絶に対する抗-CD200の効果を試験するための動物モデル

PBLの同時注射によりRAJIリンパ腫の成長が防止されるモデルを確立した。NOD/SCIDマウスへ $4 \times 10^6$ RAJI細胞を、異なるドナーからのヒトPBLの $1 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 又は $10 \times 10^6$ 細胞での存在下又は不存在下のいずれかで、皮下注射した。腫瘍長さ及び幅並びに体重を1週間3回測定した。全てのグループの腫瘍体積の平均+/-SDを、図17A及びBに示す。統計的分析を、2種のパラメトリック検定(スチューデントt-法及びWelch法)並びに1種のノンパラメトリック検定(Wilcoxon試験)を使用して行った。統計的分析の結果を図18に示す。RAJI細胞は、許容変動内で皮下腫瘍を形成した。(腫瘍)拒絶は、特定のドナー及びPBL細胞数に依存する。 $1 \times 10^6$ PBLは腫瘍成長の防止に不充分であった。 $22 \sim 43$ 日からの $5 \times 10^6$ PBLドナー2、36日で開始した $5 \times 10^6$ 又は $1 \times 10^7$ PBLのドナー3では、腫瘍成長は非常に減少した。ドナー4は、48日後でほとんど顕著(有意)であった。

30

#### 【0080】

抗-CD200の効果を試験するために、RAJI細胞をCD200でしっかりとトランスフェクトした。動物を上記段落記載のように注射する。CD200-トランスフェクトされた細胞の存在下では、腫瘍はヒトPBLの存在下でさえ成長する。抗-CD200抗体はこのモデルでの腫瘍拒絶を評価するために投与される。

40

同様に、液体腫瘍モデルも確立された。RAJI細胞はNOD/SCIDマウス腹膜内へ注射される。細胞は骨髄、脾臓、リンパ節及び他の器官へ分散し、麻痺を生じる。ヒトPBLの同時注射は、腫瘍成長を防止又は遅延する。腫瘍成長は、マウスの運動障害及び麻痺の徴候を評価することによりモニターされる。これら徴候が観察された場合、そのマウスを犠牲にして骨髄、脾臓、リンパ節及び血液等の種々の器官中の腫瘍細胞の数をFACS分析及びPCR法により評価する。

皮下モデルと同様に、CD200トランスフェクトされた細胞を腹膜内へ注射する。それらはヒトPBLの存在下でさえ成長する。抗-CD200による治療は、腫瘍の拒絶又はより遅い腫

50

傷成長を生じた。

【 0 0 8 1 】

資料

本発明に関する当分野の水準をより完全に記載するために、下記資料をここで資料として使用する。これら下記刊行物又は資料として使用するものと本発明の開示に不一致がある場合、上記及び本明細書の開示は本発明の開示に従う。

- 1) Agarwal, et al., (2003). Disregulated expression of the Th2 cytokine gene in patients with intraoral squamous cell carcinoma. *Immunol Invest* 32:17-30.
- 2) Almasri, NM et al. (1992). Am J Hemato 140 259-263.
- 3) Contasta, et al., (2003). Passage from normal mucosa to adenoma and colon cancer: alteration of normal sCD30 mechanisms regulating TH1/TH2 cell functions. *Cancer Biother Radiopharm* 18:549-557.
- 4) Gorczynski, et al., (1998). Increased expression of the novel molecule OX-2 is involved in prolongation of murine renal allograft survival. *Transplantation* 65:1106-1114. 10
- 5) Gorczynski, et al., (2001). Evidence of a role for CD200 in regulation of immune rejection of leukaemic tumour cells in C57BL/6 mice. *Clin Exp Immunol* 126:220-229.
- 6) Hainsworth, JD (2000). *Oncologist* 2000;5(5):376-84.
- 7) Inagawa, et al., (1998). Mechanisms by which chemotherapeutic agents augment the antitumor effects of tumor necrosis factor: involvement of the pattern shift of cytokines from Th2 to Th1 in tumor lesions. *Anticancer Res* 18:3957-3964.
- 8) Ito, et al., (1999). Lung carcinoma: analysis of T helper type 1 and 2 cells and T cytotoxic type 1 and 2 cells by intracellular cytokine detection with flow cytometry. *Cancer* 85:2359-2367. 20
- 9) Kiani, et al., (2003). Normal intrinsic Th1/Th2 balance in patients with chronic phase chronic myeloid leukemia not treated with interferon-alpha or imatinib. *Haematologica* 88:754-761.
- 10) Lauerova, et al., (2002). Malignant melanoma associates with Th1/Th2 imbalance that coincides with disease progression and immunotherapy response. *Neoplasma* 49:159-166.
- 11) Maggio, et al., (2002). Chemokines, cytokines and their receptors in Hodgkin's lymphoma cell lines and tissues. *Ann Oncol* 13 Suppl 1:52-56. 30
- 12) Nilsson, K (1992). *Burn Cell*. 5(1):25-41.
- 13) Podhorecka, et al., (2002). T type 1/type 2 subsets balance in B-cell chronic lymphocytic leukemia—the three-color flow cytometry analysis. *Leuk Res* 26:657-660.
- 14) Pu, QQ and Bezwoda, W (2000). *Anticancer Res*. 20(4):2569- 78.
- 15) Smyth, et al., (2003). Renal cell carcinoma induces prostaglandin E2 and T-helper type 2 cytokine production in peripheral blood mononuclear cells. *Ann Surg Oncol* 10:455-462.
- 16) Tatsumi, et al., (2002). Disease-associated bias in T helper type 1 (Th1)/Th2 CD4(+) T cell responses against MAGE-6 in HLA-DRB10401(+) patients with renal cell carcinoma or melanoma. *J Exp Med* 196:619-628. 40
- 17) Walls A Vet al. (1989). *Int. J Cancer* 44:846-853.
- 18) Winter, et al., (2003). Tumour-induced polarization of tumour vaccine-draining lymph node T cells to a type 1 cytokine profile predicts inherent strong immunogenicity of the tumour and correlates with therapeutic efficacy in adoptive transfer studies. *Immunology* 108:409-419.

ここで開示された態様に種々の改変が行われてもよいことは当然である。例えば、当業者が認識するように、本発明の特定の配列は、OX-2/CD200結合で使用されるポリペプチド、抗体又は抗体フラグメントの機能に悪影響を及ぼすことなしに、変容してもよい。例えば、抗体配列中の1以上のアミノ酸の置換は、抗体又はフラグメントの機能を破壊すること無しにしばしば発生することができる。従って、本発明の特定の抗体と70%を超えるホモロジー割合を有するポリペプチド又は抗体は、本発明の範囲内であることは理解される。好ましくは、本発明の特定の抗体と80%を超えるホモロジー割合を有する抗体が意図される。更に好ましくは、本発明の特定の抗体と90%を超えるホモロジー割合を有する抗体が意図される。このように、上記明細書の記載は本発明を限定するものではなく、好ましい例示に過ぎない。当業者は、本発明の範囲及びその技術的思想の範囲内で他の改変まで含むことを認識できる。

10

## 【図面の簡単な説明】

## 【0083】

【図1】磁気活性化細胞分離(MACS)による抗体ライブラリーの細胞表面パンニング中に含まれる代表的ステップを概略的に図示する。

【図2】選択された(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞への結合の存在及び正常ヒトPBMCへの結合の不在を示す、全細胞ELISAの結果を示すグラフである。

【図3】図3a及び3bは、選択された(ウサギ)scFv抗体の、原発性B-CLL細胞、及び正常原発性ヒトB細胞への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図4】図4a及び4bは、scFvクローニングが患者特異的(即ちイディオタイプ)又は血液タイプ特異的(即ちHLA)抗原へ結合するか否かを決定するために使用される全細胞ELISAの結果を示す。

20

【図5】図5a及び5bは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及び3種のヒト白血病細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図6】図6a、6b及び6cは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及びCLL-AAT、B-CLL患者由来の細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図7】3色フローサイトメトリーにより分析した本発明のscFv抗体結合特異性を示す。

【図8】図8a、8b及び8cは、本発明のscFv抗体により認識される抗原の発現レベルを示す。

【図9a】図9a(表1: CLL scFvクローニングのまとめ)は、CDR配列の概要及び選択されたscFv抗体の結合特異性を提供する。

30

【図9b】図9b(CLL特異的ウサギscFv抗体のCDR配列)は、CDR配列の概要及び選択されたscFv抗体の結合特異性を提供する。

【図10】正常PBMCと比較した、図8a~8cに記載されている原発性CLL細胞でのscFv抗原の発現レベルのフローサイトメトリー結果の概要を示す表2(scFv抗原で標識された、B-CLL細胞及び正常PBMCの平均蛍光強度)である。

【図11】10人のCLL患者から単離された末梢血単核球上での、scFv-9抗原とCD38<sup>+</sup>細胞の発現レベル割合を比較した、フローサイトメトリー結果の概要を示す表(CLl細胞上の、scFv-9抗原及びCD38発現の比較)である。

【図12】免疫沈降及び質量分析法によるscFv抗原の特定を示す。

40

【図13】3種のscFv抗体がヒトOX-2/CD200cDNAクローニングで一時的にトランスフェクトされた293-EBNA細胞へ特異的に結合することを示す。

【図14】OX-2/CD200トランスフェクト細胞の存在は、IL-2及びIFN-等のTh1サイトカインのダウンレギュレーションを生じることを示す。

【図15】混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在は、IL-2へのTh1応答のダウンレギュレーションを生じたことを示す。

【図16】混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在は、IFN-へのTh1応答のダウンレギュレーションを生じたことを示す。

【図17A】ヒト(細胞)の存在又は不存在のいずれかの下で、 $4 \times 10^6$ RAJI細胞を皮下注射した全ての群のNOD/SCIDマウスの腫瘍体積の平均+/-SDを示す(グループ1~

50

5 ) 。

【図17B】ヒト(細胞)の存在又は不存在のいずれかの下で、 $4 \times 10^6$  RAJI細胞を皮下注射した全ての群のNOD/SCIDマウスの腫瘍体積の平均 + / - SDを示す(グループ6~11)。

【図18】2種のパラメトリック検定(スチューデントt-法及びWelch法)並びに1種のノンパラメトリック検定、Wilcoxon法を使用して実施した統計的分析の結果を示す。

〔 义 1 〕

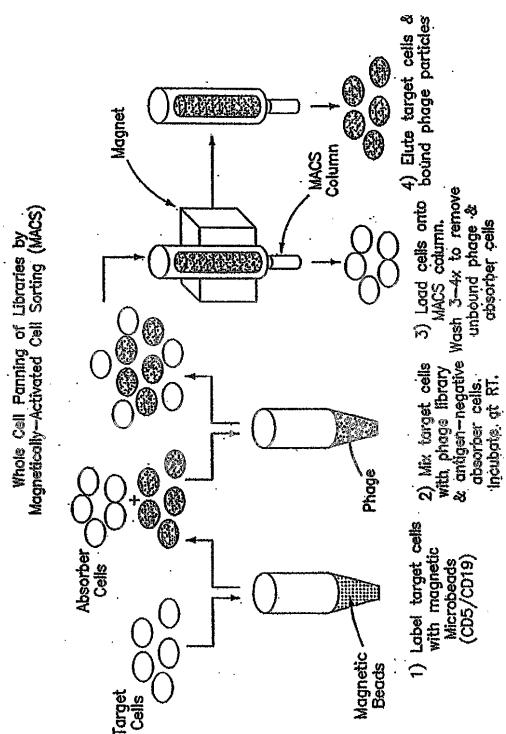
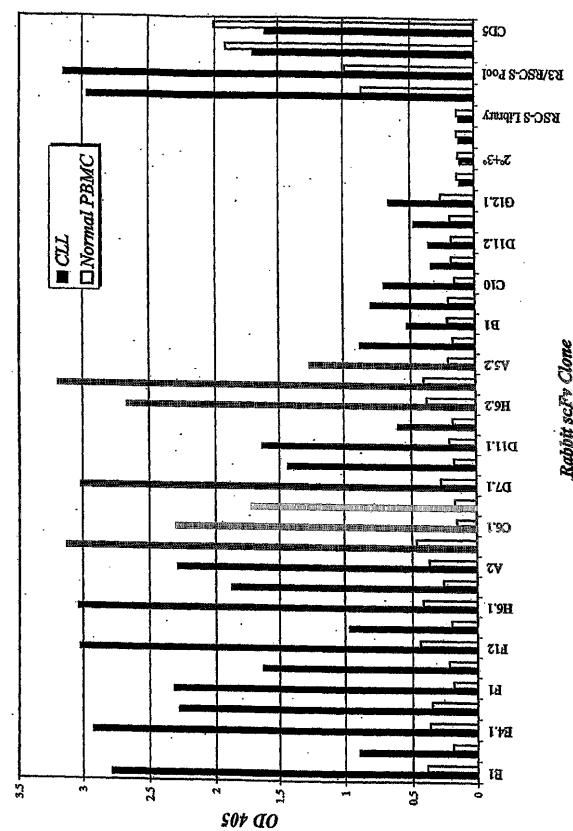


Fig. 1

( 2 )



**Fig 3c. CELL ELISA 4/22/00**

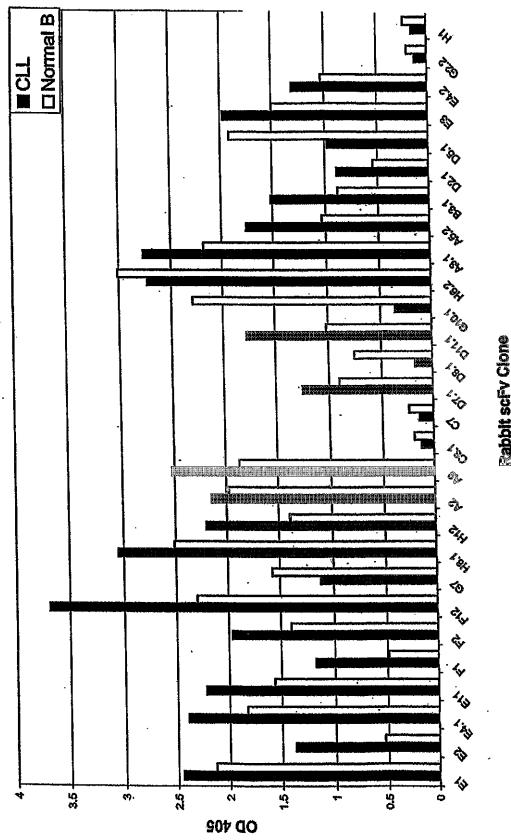
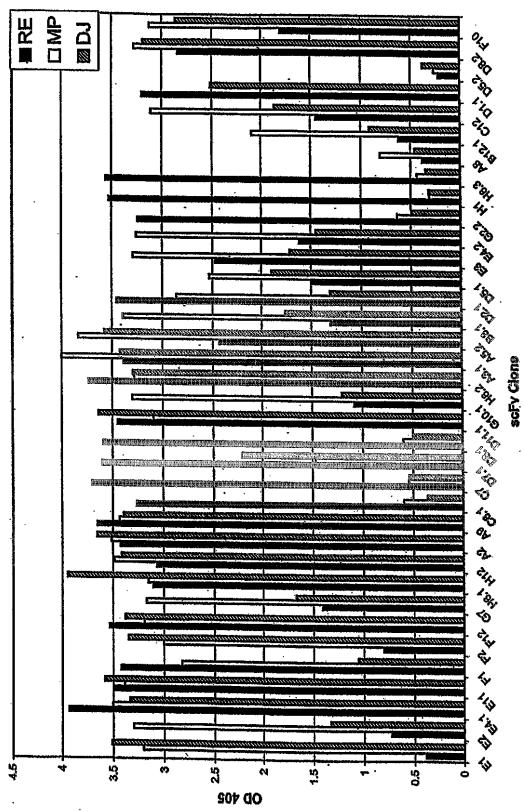


Fig 4a. CELL ELISA 5/21/00



**Fig 3b. CELL ELISA 4/22/00**

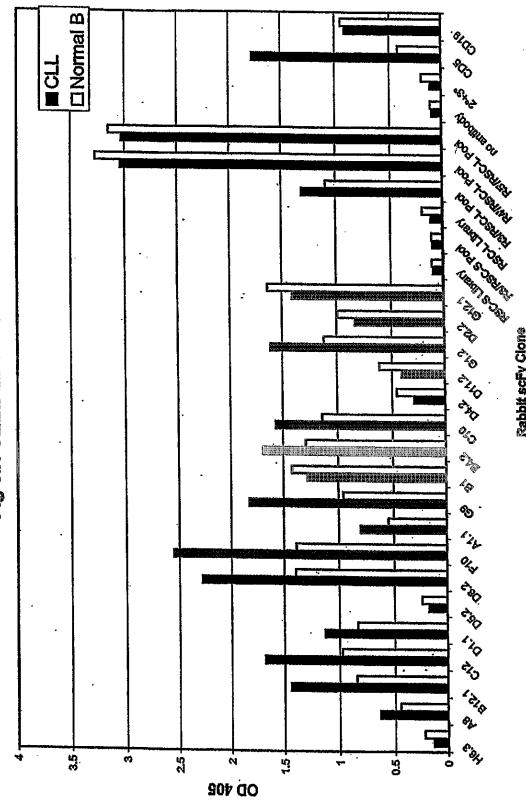


Fig. 4b. CELL ELISA 5/21/00

**Fig 6a. CELL ELISA 9/15/00**

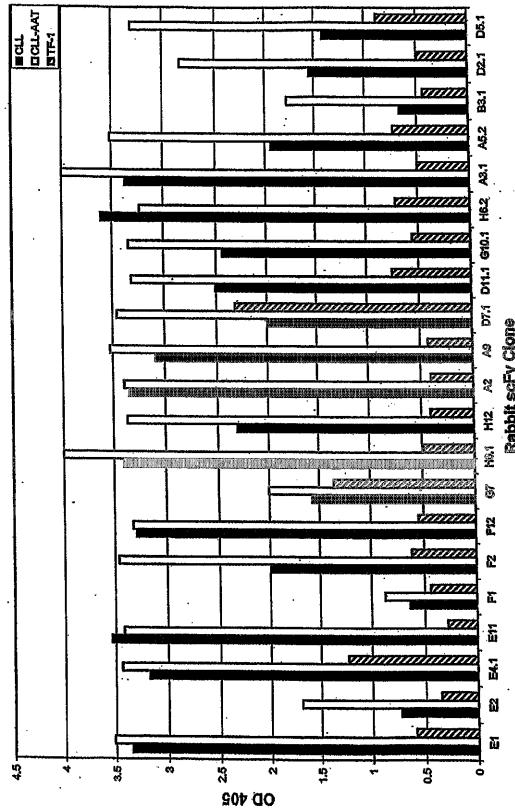


Fig 5a: CELL ELISA 8/19/00

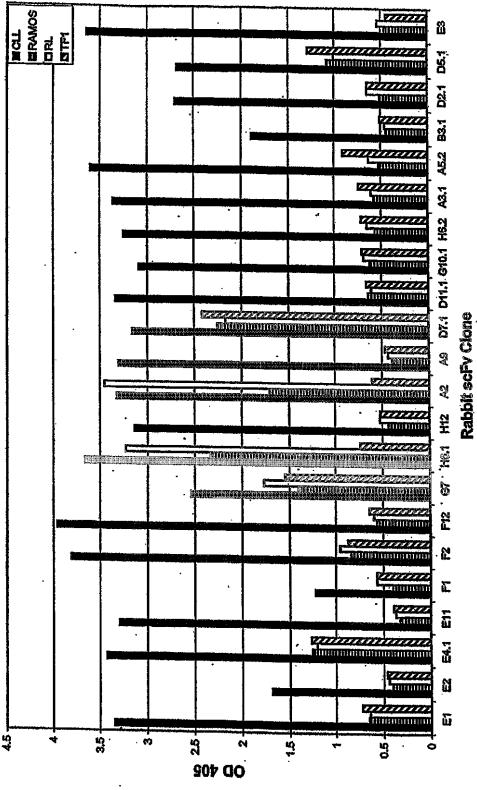
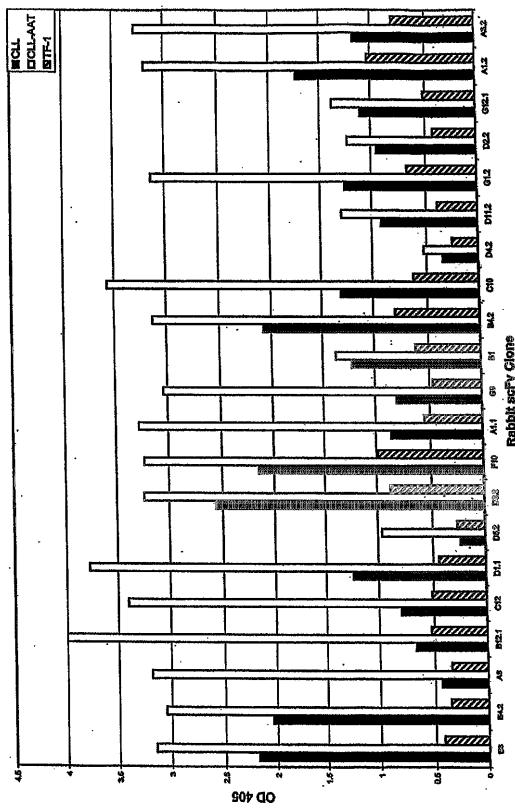


Fig. 6b. CELL ELISA 9/15/00



Page 5b. CEDD ELSA.8/19/00

Fig. 8c. CELL ELISA 9/15/00

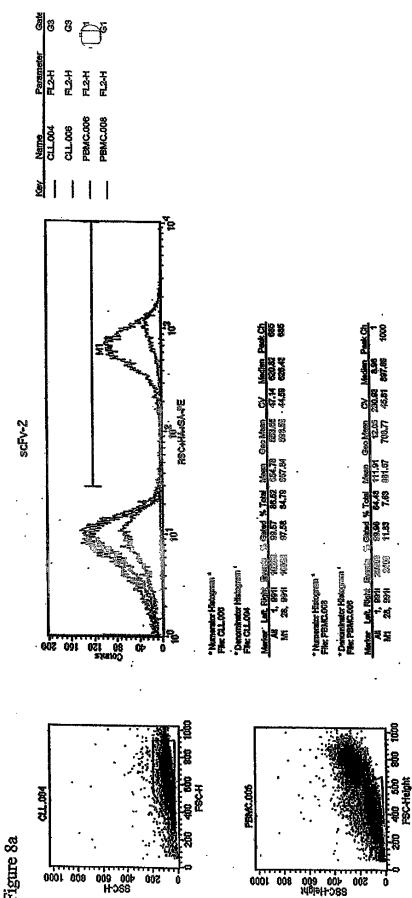
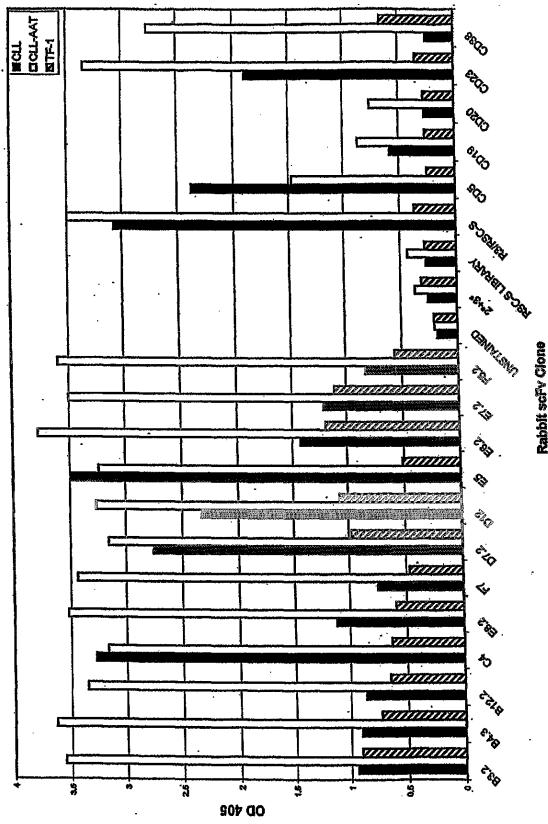


Figure 8a

【図 7】

Figure 7

FL2: scFv-9/HA-biotin/SA-PE  
FL1: CD5-FITC  
FL3: CD19-PerCP

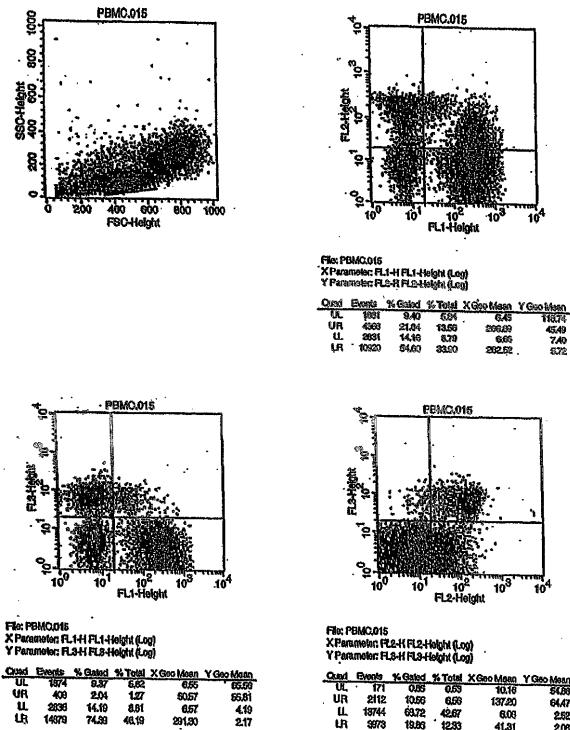


Figure 8b

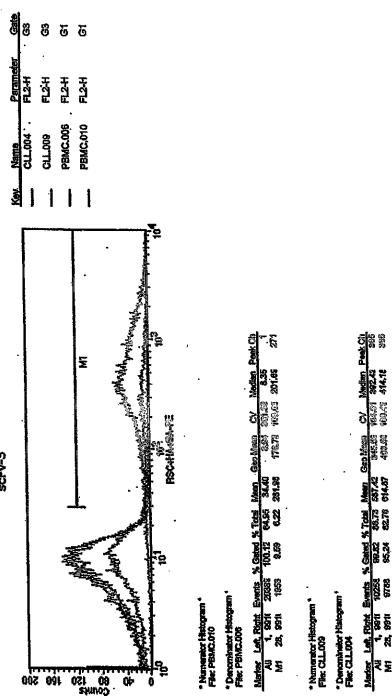


Figure 8b

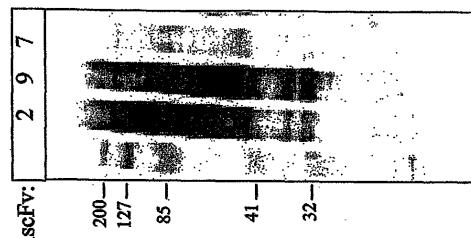
FIGURE 9B

ScFv Clone	Source	Schematic		Reference	Antibodies	B-Cells	B-CLL	Normal PBMC	B-CLL/PBMC Ratio
		ScFv-2	ScFv-3						
1 Ydc	Yeast	+	+	1	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
2 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	2	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
3 Ydc	Yeast	+	+	3	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
4 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	4	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
5 CLL-2b	CD19 <sup>+</sup>	+	+	5	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
6 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	6	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
7 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	7	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
8 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	8	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
9 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	9	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
10 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	10	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
11 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	11	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
12 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	12	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
13 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	13	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
14 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	14	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
15 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	15	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
16 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	16	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
17 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	17	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
18 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	18	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
19 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	19	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
20 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	20	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
21 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	21	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
22 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	22	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
23 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	23	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
24 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	24	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
25 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	25	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
26 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	26	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
27 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	27	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
28 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	28	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
29 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	29	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
30 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	30	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
31 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	31	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
32 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	32	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
33 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	33	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
34 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	34	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
35 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	35	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
36 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	36	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
37 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	37	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
38 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	38	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
39 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	39	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
40 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	40	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
41 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	41	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
42 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	42	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
43 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	43	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
44 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	44	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
45 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	45	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
46 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	46	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
47 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	47	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
48 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	48	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
49 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	49	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
50 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	50	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
51 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	51	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
52 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	52	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
53 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	53	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
54 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	54	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
55 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	55	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
56 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	56	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
57 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	57	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
58 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	58	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
59 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	59	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
60 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	60	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
61 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	61	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
62 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	62	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
63 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	63	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
64 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	64	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
65 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	65	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
66 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	66	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
67 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	67	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
68 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	68	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
69 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	69	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
70 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	70	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
71 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	71	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
72 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	72	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
73 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	73	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
74 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	74	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
75 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	75	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
76 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	76	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
77 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	77	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
78 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	78	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
79 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	79	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
80 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	80	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
81 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	81	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
82 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	82	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
83 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	83	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
84 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	84	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
85 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	85	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
86 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	86	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
87 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	87	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
88 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	88	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
89 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	89	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
90 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	90	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
91 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	91	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
92 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	92	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
93 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	93	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
94 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	94	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
95 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	95	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
96 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	96	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
97 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	97	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
98 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	98	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
99 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	99	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
100 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	100	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
101 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	101	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
102 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	102	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
103 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	103	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
104 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	104	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
105 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	105	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
106 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	106	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
107 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	107	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
108 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	108	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
109 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	109	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
110 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	110	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
111 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	111	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
112 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	112	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
113 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	113	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
114 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	114	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
115 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	115	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
116 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	116	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
117 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	117	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
118 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	118	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
119 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	119	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
120 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	120	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
121 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	121	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
122 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	122	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
123 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	123	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
124 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	124	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
125 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	125	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
126 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	126	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
127 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	127	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
128 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	128	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
129 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	129	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
130 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	130	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
131 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	131	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
132 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	132	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
133 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+	+	133	CD19 <sup>+</sup>	+	+	+	+
134 CLL-1c	CD19 <sup>+</sup>	+							

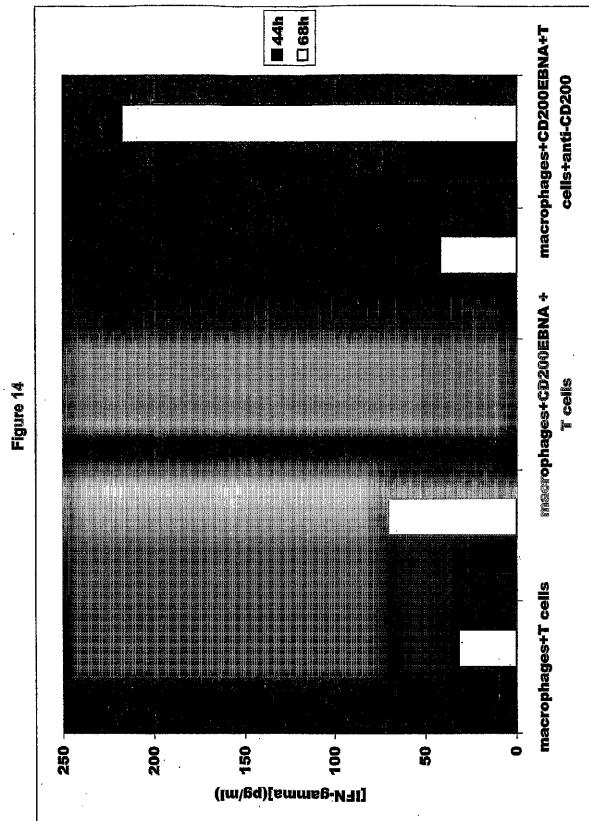
【図12】

**Fig 12. Identification of scFv Antigens**

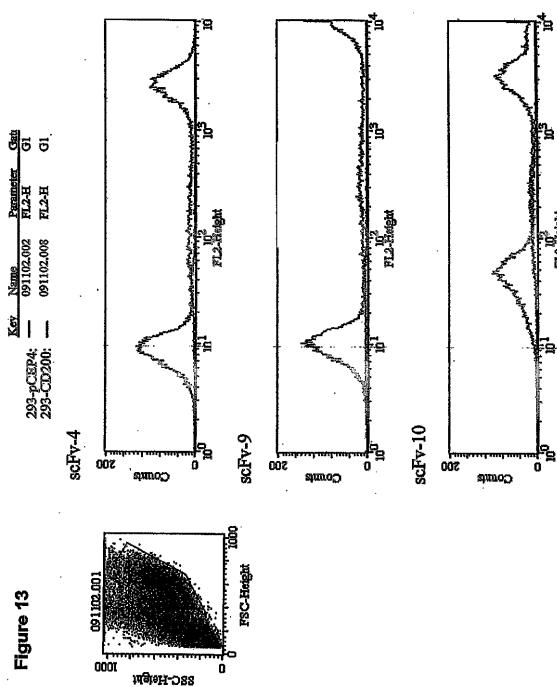
- Cell-surface biotinylation (CLL-AAT cells)
- Membrane isolation (nitrogen cavitation, differential centrifugation)
- Immunoprecipitation with scFv-HA coupled to Anti-HA beads
- SDS-PAGE
- Detection by Coomassie-stain or AP-streptavidin Western blot
- MALDI-MS or LC-MS/MS to obtain peptide mass spectra/peptide sequences



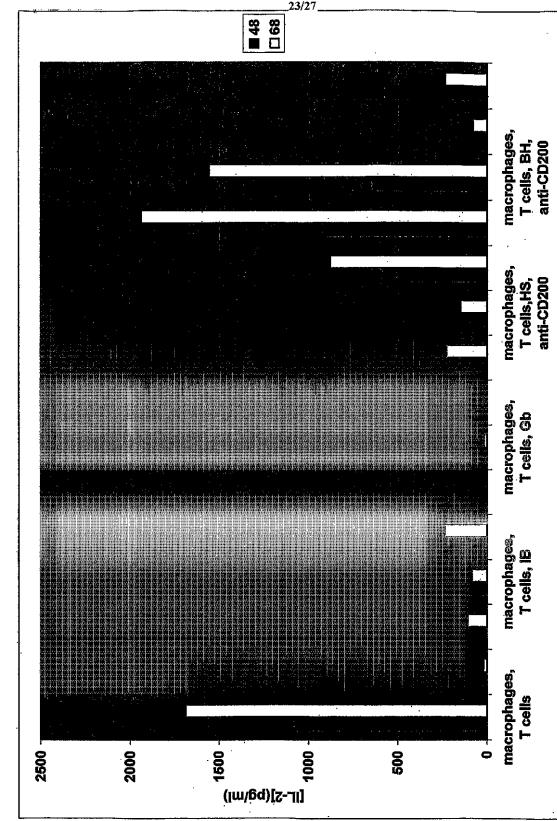
【図14】



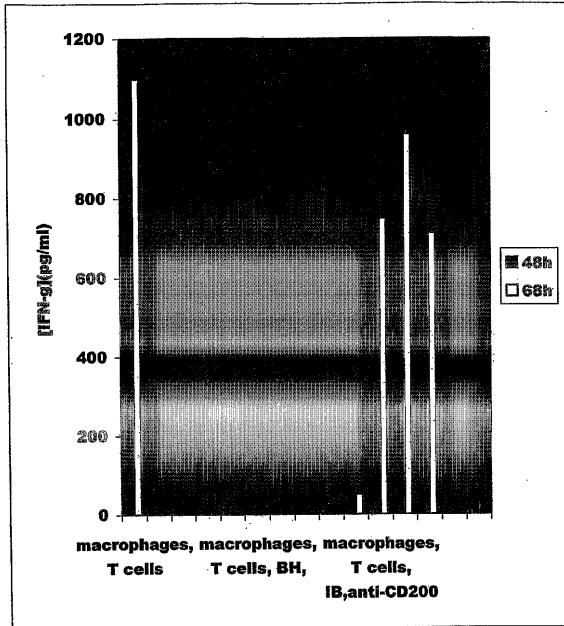
【図13】



【図15】

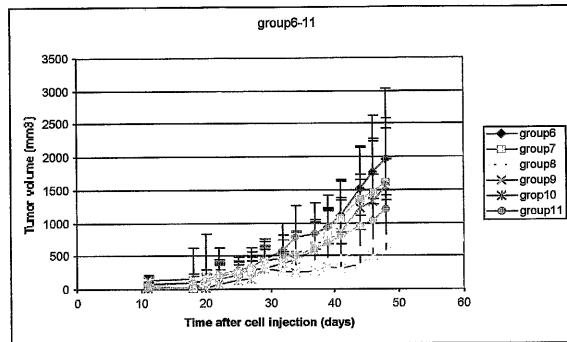


**Figure 17A**



**Figure 17B**

Group 6: 10 mice,  $4 \times 10^6$  RAJI cells each  
 Group 7: 10 mice,  $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^6$  PBL donor 3  
 Group 8: 10 mice,  $4 \times 10^6$  RAJI +  $5 \times 10^6$  PBL donor 3  
 Group 9: 9 mice,  $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^7$  PBL donor 3  
 Group 10: 10 mice,  $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^6$  PBL donor 4  
 Group 11: 14 mice,  $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^7$  PBL donor 4



【 四 18 】

n=not significant

८  
८

**【手続補正書】**

【提出日】平成17年10月27日(2005.10.27)

**【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】**

OX-2/CD200が被験者中でアップレギュレートされるかを決定するステップ、及びその被験者へOX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを投与するステップを含有する方法。

**【請求項2】**

OX-2/CD200がアップレギュレートされる症状に悩む被験者へ、OX-2/CD200へ又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを投与することを含むOX-2/CD200がアップレギュレートされる症状の治療方法。

**【請求項3】**

癌に悩む被験者中でOX-2/CD200がアップレギュレートされるかを決定するステップ、及びその被験者へOX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを投与するステップを含有する癌治療方法。

**【請求項4】**

CLLに悩む被験者中でOX-2/CD200がアップレギュレートされるかを決定するステップ、及びその被験者へOX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを投与するステップを含有するCLL治療方法。

**【請求項5】**

被験者へOX-2/CD200へ結合する抗体を投与するステップを含有する請求項1～4いずれか1項記載の方法。

**【請求項6】**

被験者へOX-2/CD200へ結合するモノクローナル抗体を投与するステップを含有する請求項1～4いずれか1項記載の方法。

**【請求項7】**

被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合する抗体を投与するステップを含有する請求項1～4いずれか1項記載の方法。

**【請求項8】**

被験者へOX-2/CD200レセプターへ結合するモノクローナル抗体を投与するステップを含有する請求項1～4いずれか1項記載の方法。

**【請求項9】**

悪性癌細胞によりアップレギュレートされるポリペプチドの代謝経路を抑制する抗体を投与するステップを含有する癌治療方法。

**【請求項10】**

上記抗体はアップレギュレートされるポリペプチドへ結合する請求項9の方法。

**【請求項11】**

上記抗体は、アップレギュレートされるポリペプチドが相互作用するレセプターへ結合する請求項9の方法。

**【請求項12】**

上記抗体はポリペプチドの発現を調節する抗原へ結合する請求項9の方法。

**【請求項13】**

上記ポリペプチドはOX-2/CD200である請求項9の方法。

**【請求項14】**

ポリペプチドの発現が悪性癌細胞によりアップレギュレートされることを特定するため

に癌患者をスクリーニングするステップ；及びアップレギュレートされるポリペプチドの代謝経路を抑制する抗体を、アップレギュレーションが観察される患者へ投与するステップを含有する方法。

【請求項 15】

患者のスクリーニングステップは、CLL患者のスクリーニングを含む請求項14の方法。

【請求項 16】

患者のスクリーニングステップは、OX-2/CD200のアップレギュレーションの検出を含む請求項14の方法。

【請求項 17】

抗体投与ステップは、OX-2/CD200へ結合する抗体の投与を含む請求項14の方法。

【請求項 18】

抗体投与ステップは、OX-2/CD200が相互作用するレセプターへ結合する抗体の投与を含む請求項14の方法。

【請求項 19】

抗体投与ステップは、OX-2/CD200の発現を調節する抗原へ結合する抗体の投与を含む請求項14の方法。

【請求項 20】

SEQ.ID.Nos：5、12及び13の群から選ばれる配列を有する軽鎖CDR1領域を有する抗体の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 21】

SEQ.ID.Nos：21及び23の群から選ばれる配列を有する軽鎖CDR2領域を有する抗体の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 22】

SEQ.ID.Nos：29、37及び38の群から選ばれる配列を有する軽鎖CDR3領域を有する抗体の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 23】

SEQ.ID.Nos：50、55及び56の群から選ばれる配列を有する重鎖CDR1領域を有する抗体の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 24】

SEQ.ID.Nos：69、74及び75の群から選ばれる配列を有する重鎖CDR2領域を有する抗体の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 25】

SEQ.ID.Nos：88、93及び94の群から選ばれる配列を有する重鎖CDR3領域を有する抗体の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 26】

SEQ.ID.Nos：5、12、13、21、23、29、37、38、50、55、56、69、74、75、88、93及び94の群から選ばれる1以上の配列を有する抗体の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 27】

ヒト化抗体の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 28】

Fv、scFv、Fab'又はF(ab')2の投与ステップを含有する請求項1～4、9及び14いずれか1項記載の方法。

【請求項 29】

抗体が結合する抗原を特定する方法であり、CLL患者から採取した組織を使用して得られる抗体ライブラリーを作成するステップ；上記ライブラリーの1以上の構成員を、ATCC寄託番号PTA-3920として寄託された細胞系CLL-AATの溶解産物と接触させるステップ；及び上記ライブラリーの少なくとも1の構成員へ結合する抗原の特徴付けをす

るステップ；を含有する方法。

【請求項 3 0】

上記ライブラリー作成ステップは、CLL細胞を有する有機体又はその一部を免疫化することを含む請求項 2 9 の方法。

【請求項 3 1】

上記ライブラリー作成ステップは、合成抗体ライブラリーをCLL細胞又は細胞系とパンニングすることを含む請求項 2 9 の方法。

【請求項 3 2】

ライブラリーはライブラリー構成員を単離する能力を発揮するファージによりスクリーニングされる請求項 3 1 の方法。

【請求項 3 3】

ライブラリーは、1 以上のCLL患者から単離された原発性CLL細胞とパンニングされる請求項 3 1 の方法。

【請求項 3 4】

更にCLL細胞上でアップレギュレートされる抗原へ結合する抗体ライブラリーの構成員を特定するステップを含有する請求項 2 9 の方法。

【請求項 3 5】

上記抗体ライブラリーの構成員はOX-2/CD200へ結合する請求項 3 4 の方法。

【請求項 3 6】

ATCC 寄託番号 PTA - 3920 として寄託された細胞系 CLL-AAT 中の細胞を使用して得られる抗体ライブラリーを作成するステップ；上記ライブラリーの1 以上の構成員と CLL 患者から採取した組織からの細胞の溶解産物とを接触させるステップ；及び上記ライブラリーの少なくとも 1 の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップを含有する抗体が結合する抗原を特定する方法。

【請求項 3 7】

有機体を CLL 患者から採取した組織からの CLL 細胞の少なくとも一部で免疫化するステップ；有機体の免疫化に対する免疫反応を基礎として抗体ライブラリーを構築するステップ；上記ライブラリーの1 以上の構成員と CLL 細胞とを接触させるステップ；及び上記ライブラリーの少なくとも 1 の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップ；を含有する抗体が結合する抗原を特定する方法。

【請求項 3 8】

上記ライブラリーの1 以上の構成員と CLL 細胞とを接触させるステップは、上記ライブラリーの1 以上の構成員と CLL 患者から採取した組織からの細胞の溶解産物とを接触させることを含む請求項 3 6 の方法。

【請求項 3 9】

抗体が結合する抗原を特定する方法であり、

有機体を CLL 細胞の少なくとも一部で免疫化させるステップ；

有機体の免疫化に対する免疫反応を基礎として抗体ライブラリーを構築するステップ；

上記ライブラリーの1 以上の構成員を ATCC 寄託番号 PTA - 3920 として寄託された細胞系 CLL-AAT の溶解産物と接触させるステップ；及び

上記ライブラリーの少なくとも 1 の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップを含有する方法。

【請求項 4 0】

CLL 細胞によりアップレギュレートされる抗原へ結合する抗体。

【請求項 4 1】

抗原は OX-2/CD200 である請求項 4 0 の抗体。

【請求項 4 2】

SEQ.ID.Nos : 5 、 12 及び 13 の群から選ばれる配列を有する軽鎖 CDR1 領域を含有する請求項 4 0 の抗体。

【請求項 4 3】

SEQ.ID.Nos : 2 1 及び 2 3 の群から選ばれる配列を有する軽鎖 C D R 2 領域を含有する請求項 4 0 の抗体。

**【請求項 4 4】**

SEQ.ID.Nos : 2 9 、 3 7 及び 3 8 の群から選ばれる配列を有する軽鎖 C D R 3 領域を含有する請求項 4 0 の抗体。

**【請求項 4 5】**

SEQ.ID.Nos : 5 0 、 5 5 及び 5 6 の群から選ばれる配列を有する重鎖 C D R 1 領域を含有する請求項 4 0 の抗体。

**【請求項 4 6】**

SEQ.ID.Nos : 6 9 、 7 4 及び 7 5 の群から選ばれる配列を有する重鎖 C D R 2 領域を含有する請求項 4 0 の抗体。

**【請求項 4 7】**

SEQ.ID.Nos : 8 8 、 9 3 及び 9 4 の群から選ばれる配列を有する重鎖 C D R 3 領域を含有する請求項 4 0 の抗体。

**【請求項 4 8】**

SEQ.ID.Nos : 5 、 1 2 、 1 3 、 2 1 、 2 3 、 2 9 、 3 7 、 3 8 、 5 0 、 5 5 、 5 6 、 6 9 、 7 4 、 7 5 、 8 8 、 9 3 及び 9 4 の群から選ばれる 1 以上の配列を含有する請求項 4 0 の抗体。

**【請求項 4 9】**

上記抗体はヒト化抗体である請求項 4 0 の抗体。

**【請求項 5 0】**

上記抗体は Fv 、 scFv 、 Fab' 又は F(ab')2 である請求項 4 0 の抗体。

**【手続補正書】**

**【提出日】** 平成 17 年 10 月 28 日 (2005.10.28)

**【手続補正 1】**

**【補正対象書類名】** 明細書

**【補正対象項目名】** 0 0 1 8

**【補正方法】** 変更

**【補正の内容】**

**【0 0 1 8】**

図 9 a ~ 9 c は、 C D R 配列の概要 (表 1) 及び選択された scFv 抗体の結合特異性を示す。図 9 b において、左欄のクローニング番号は、下記 scFv 番号と対応する： A2c (scFv-1) , G12.1c (scFv-2) , B4.2a (scFv-17) , E1c (scFv-3) , F2d (scFv-18) , E5e (scFv-4) , H6 .2b (scFv-5) , G10.1 (scFv-19) , D11.1c (scFv-6) , A5.2c (scFv-20) , F1d (scFv-7) , F1e (scFv-8) , E4.2 (scFv-21) , E2c (scFv-9) , A9c (scFv-9) , E11e (scFv-10) , A1.1 (scFv-11) , F5.2 (scFv-12) , F10b (scFv-22) , F7a (scFv-23) , F6b (scFv-13) , C12b (scFv-24) , D2.1b (scFv-14) , D1.1 (scFv-25) , D2.2a (scFv-15) , 及び D2.2b (scFv-16) 。

**【手続補正 2】**

**【補正対象書類名】** 明細書

**【補正対象項目名】** 0 0 6 6

**【補正方法】** 変更

**【補正の内容】**

**【0 0 6 6】**

scFv クローニングの主要なスクリーニングは、原発性 CLL 細胞を正常ヒト P B M C と比較する ELISA により行った。CLL 細胞で陽性であり正常 P B M C では陰性であったクローニングを、正常ヒト B 細胞、ヒト B 細胞系、 T F - 1 細胞、及び CLL-AAT 細胞系に関する ELISA で再スクリーニングした。クローニングも又 3 人の異なる患者から単離された CLL 細胞で ELISA により再スクリーニングして、患者特異的又は血液タイプ特異的抗原と認められるクローニングを排除した。代表的 ELISA からの結果を図 2 ~ 6 に示し、図 9 a ~ c にまとめた。

得られた特異的 scFv 抗体 クローニングの数を D N A フィンガープリント法及び塩基配列決定

法により決定した。scFvDNA挿入部分をPCR法によりプラスミドから増幅し、制限酵素BstNIで消化した。得られたフラグメントを4%アガロースゲル上で分離し、臭化エチジウムで染色した。異なる制限フラグメントパターンを有するクローニは、当然異なるアミノ酸配列を有する。同一のパターンを有するクローニは、類似又は同一の配列を有すると予想される。特異的なBstNIフィンガープリントを有するクローニを、更にDNA塩基配列決定法により分析した。非常に関係する相補性決定領域を有する抗体の16グループへクラスター化できる25の異なる配列が発見された(図9a~c)。

**【手続補正3】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0075

【補正方法】変更

【補正の内容】

**【0075】**

scFv - 9 から完全 IgGへの転換

scFv - 9 の軽鎖及び重鎖V遺伝子を、それぞれの遺伝子の可変領域を、ヒトラムダ軽鎖不变領域遺伝子、及びヒトIgG1重鎖不变領域CH1遺伝子と、それぞれ結合するプライマーを使用したオーバーラップPCR法により増幅した。scFv - 9 の軽鎖遺伝子及び重鎖遺伝子の可変領域を、特異的のプライマーで増幅し、ヒトラムダ軽鎖不变領域遺伝子及びIgG1重鎖不变領域CH1遺伝子を分離的に特異的のプライマーで下記の通り増幅した:  
R9VL-F1 QP: 5' GGC CTC TAG ACA GCC TGT GCT GAC TCA GTC GCC CTG 3' (SEQ ID No: 103)

R9VL/hCL2-rev: 5' CGA GGG GGC AGC CTT GGG CTG ACC TGT GAC GGT CAG CTG GGT C 3' (SEQ ID No: 104)

R9VL/hCL2-F: 5' GAC CCA GCT GAC CGT CAC AGG TCA GCC CAA GGC TGC CCC CTC G 3' (SEQ ID No: 105)

R9VH-F1: 5' TCT AAT CTC GAG CAG CAG CTG ATG GAG TCC G 3' (SEQ ID No: 106)

R9VH/hGG-rev: 5' GAC CGA TGG GCC CTT GGT GGA GGC TGA GGA GAC GGT GAC CAG GGT GC 3' (SEQ ID No: 107)

R9VH/hCG-F: 5' GCA CCC TGG TCA CCG TCT CCT CAG CCT CCA CCA AGG GCC CAT CGG TG 3' (SEQ ID No: 108)

hCL2-rev: 5' CCA CTG TCA GAG CTC CCG GGT AGA AGT C 3' (SEQ ID No: 109)

hCG-rev: 5' GTC ACC GGT TCG GGG AAG TAG TC 3' (SEQ ID No: 110)

増幅した生成物を精製し、オーバーラップPCR法を実施した。

**【手続補正4】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0083

【補正方法】変更

【補正の内容】

**【0083】**

【図1】磁気活性化細胞分離(MACS)による抗体ライブラリーの細胞表面パンニング中に含まれる代表的ステップを概略的に図示する。

【図2】選択された(ウサギ)scFvクローニの、原発性B-CLL細胞への結合の存在及び正常ヒトPBMCへの結合の不在を示す、全細胞ELISAの結果を示すグラフである。

【図3】図3a及び3bは、選択された(ウサギ)scFv抗体の、原発性B-CLL細胞、及び正常原発性ヒトB細胞への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図4】図4a及び4bは、scFvクローニングが患者特異的(即ちイディオタイプ)又は血液タイプ特異的(即ちHLA)抗原へ結合するか否かを決定するために使用される全細胞ELISAの結果を示す。

【図5】図5a及び5bは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及び3種のヒト白血病細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図6】図6a、6b及び6cは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及びCLL-AAT、B-CLL患者由来の細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図7】3色フローサイトメトリーにより分析した本発明のscFv抗体結合特異性を示す。

【図8】図8a、8b及び8cは、本発明のscFv抗体により認識される抗原の発現レベルを示す。

【図9a】図9a(表1:CLL scFvクローニングのまとめ)は、CDR配列の概要及び選択されたscFv抗体の結合特異性を提供する。

【図9b】図9b(CLЛ特異的ウサギscFv抗体のCDR配列)は、CDR配列の概要及び選択されたscFv抗体の結合特異性を提供する。

【図9c】図9cは、代表的クローニングの発現パターンを提供する。

【図10】正常PBMCと比較した、図8a~8cに記載されている原発性CLL細胞でのscFv抗原の発現レベルのフローサイトメトリー結果の概要を示す表2(scFv抗原で標識された、B-CLL細胞及び正常PBMCの平均蛍光強度)である。

【図11】10人のCLL患者から単離された末梢血単核球上の、scFv-9抗原とCD38<sup>+</sup>細胞の発現レベル割合を比較した、フローサイトメトリー結果の概要を示す表(CLL細胞上の、scFv-9抗原及びCD38発現の比較)である。

【図12】免疫沈降及び質量分析法によるscFv抗原の特定を示す。

【図13】3種のscFv抗体がヒトOX-2/CD200cDNAクローニングで一時的にトランスフェクトされた293-EBNA細胞へ特異的に結合することを示す。

【図14】OX-2/CD200トランスフェクト細胞の存在は、IL-2及びIFN-等のTh1サイトカインのダウンレギュレーションを生じることを示す。

【図15】混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在は、IL-2へのTh1応答のダウンレギュレーションを生じたことを示す。

【図16】混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在は、IFN-へのTh1応答のダウンレギュレーションを生じたことを示す。

【図17A】ヒト(細胞)の存在又は不存在のいずれかの下で、 $4 \times 10^6$ RAJI細胞を皮下注射した全ての群のNOD/SCIDマウスの腫瘍体積の平均+/-SDを示す(グループ1~5)。

【図17B】ヒト(細胞)の存在又は不存在のいずれかの下で、 $4 \times 10^6$ RAJI細胞を皮下注射した全ての群のNOD/SCIDマウスの腫瘍体積の平均+/-SDを示す(グループ6~11)。

【図18】2種のパラメトリック検定(スチュードントt-法及びWelch法)並びに1種のノンパラメトリック検定、Wilcoxon法を使用して実施した統計的分析の結果を示す。

【手続補正5】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図9b

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図9b】

Table 1. CDR Sequences of CLL Specific Rabbit scFv Antibodies

CLONE	LC-CDR1	LC-CDR2	LC-CDR3
A2.c	IVYAWT---YIATWAK (SEQ ID NO: 45) SYGLS (SEQ ID NO: 46)	TLLTGYSVGSVIA (SEQ ID NO: 1) QASESIN---YIYLA (SEQ ID NO: 2) QASSINR---YIYLA (SEQ ID NO: 2) QASESIN---YIYLA (SEQ ID NO: 3)	ATHRGCGSSSEPHVY (SEQ ID NO: 25) GASNLY---ES (SEQ ID NO: 19) GASNLY---AS (SEQ ID NO: 20) GASNLY---ES (SEQ ID NO: 19) LAFTL---AS (SEQ ID NO: 21) GASNLY---ES (SEQ ID NO: 19) GASNLY---ES (SEQ ID NO: 19) GASNLY---ES (SEQ ID NO: 19) GASNLY---ES (SEQ ID NO: 22)
G12.1c	TYCYS (SEQ ID NO: 47)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 4) QASOSIN---YIYLA (SEQ ID NO: 5)	QSGYSA---GVT (SEQ ID NO: 27) QSGYSA---GVT (SEQ ID NO: 28) QSGYSA---GVT (SEQ ID NO: 29) QSGYSP---GVT (SEQ ID NO: 30) QSGYSG---GAT (SEQ ID NO: 31)
B4.2a	SNMAG (SEQ ID NO: 48)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 6)	QSGYSA---GAT (SEQ ID NO: 32)
E1c	TYHANG (SEQ ID NO: 49)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 7)	O-GVSSYPT (SEQ ID NO: 32) O-GVSSYPT-T (SEQ ID NO: 33)
F2d	SDWTC (SEQ ID NO: 50)	LASENVIS---AVV (SEQ ID NO: 8)	AGKSSSTD-GTA (SEQ ID NO: 34)
F3e	SDWIS (SEQ ID NO: 51)	LASENVIS---AVV (SEQ ID NO: 9)	O-SGYSA---GAT (SEQ ID NO: 35)
H6.2b	TYLSTGYSVGEFPVY (SEQ ID NO: 12)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 10)	LGSGYPSST---GTA (SEQ ID NO: 39)
G10.1	TYLSTGYSVGEFPVY (SEQ ID NO: 12)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 11)	QSGYSA---GAT (SEQ ID NO: 40)
D11.1c	HTDDDKHQS (SEQ ID NO: 12)	HTDDDKHQS (SEQ ID NO: 12)	O-GVSSYPT (SEQ ID NO: 36) O-GVSSYPT-T (SEQ ID NO: 37)
A5.2c	HTDDDKHQS (SEQ ID NO: 13)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 13)	AGKSSSTD-GTA (SEQ ID NO: 38)
Fid	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 14)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 14)	LGSGYPSST---GTA (SEQ ID NO: 39)
F1e	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 15)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 15)	QSGYSA---GAT (SEQ ID NO: 40)
F4.2	RASTL---AS (SEQ ID NO: 16)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 16)	O-GVSSYPT (SEQ ID NO: 41)
F10b	RASTL---AS (SEQ ID NO: 17)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 17)	QSGYSA---GAT (SEQ ID NO: 27)
E2c	HTDDDKHQS (SEQ ID NO: 18)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 18)	QSGYSA---GAT (SEQ ID NO: 27)
A9c	HTDDDKHQS (SEQ ID NO: 19)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 19)	QSGYSA---GAT (SEQ ID NO: 42)
Elle	HTDDDKHQS (SEQ ID NO: 20)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 20)	O-GVSSYPT (SEQ ID NO: 27)
A1.1	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 21)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 21)	QSGYSA---GAT (SEQ ID NO: 27)
F5.2	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 22)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 22)	QSGYSA---GAT (SEQ ID NO: 43)
F10b	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 23)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 23)	PAQYSGN---LYT (SEQ ID NO: 44)
F7a	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 24)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 24)	O-GVSSYPT (SEQ ID NO: 33)
F6b	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 25)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 25)	
C12b	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 26)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 26)	
D2.1b	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 27)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 27)	
D1.1	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 28)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 28)	
D2.2a	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 29)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 29)	
D2.2b	GRASNL---ES (SEQ ID NO: 30)	QASOYNAV---YIYLA (SEQ ID NO: 30)	
CLONE	HC-CDR1	HC-CDR2	HC-CDR3
A2.c	IVYAWT---YIATWAK (SEQ ID NO: 64) YDFPVFGNI-YIATWAK (SEQ ID NO: 65)	IVSNGGA---DYASWAK (SEQ ID NO: 64) YNDPFGNI-YIATWAK (SEQ ID NO: 65)	DRYVSSG---YATNL (SEQ ID NO: 85) DRAVASSG---YXXX (SEQ ID NO: 86)
G12.1c	TYCYS (SEQ ID NO: 47)	IVSNGGA---DYASWAK (SEQ ID NO: 66)	DRAVASSG---YXXX (SEQ ID NO: 86)
B4.2a	SNMAG (SEQ ID NO: 48)	IVSNGGT---YIATWAK (SEQ ID NO: 67)	DWTRAGS---YIYGLDL (SEQ ID NO: 87)
E1c	TYHANG (SEQ ID NO: 49)	IVSNGGT---YIATWAK (SEQ ID NO: 68)	DWTRAGS---YIYGLDL (SEQ ID NO: 87)
F2d	SDWTC (SEQ ID NO: 50)	CIYMGSSSTWATWK (SEQ ID NO: 69)	RYTGNDG---YIYPL (SEQ ID NO: 88)
E3e	SDWTC (SEQ ID NO: 51)	YIYDGGT---DYASWAK (SEQ ID NO: 70)	RYTGNDG---YIYPL (SEQ ID NO: 88)
H6.2b	SDWIS (SEQ ID NO: 51)	YIYDGGT---DYASWAK (SEQ ID NO: 70)	DRAVAGNW---ITNL (SEQ ID NO: 89)
G10.1	TYANG (SEQ ID NO: 52)	SIMRSRP---YIATWAK (SEQ ID NO: 71)	DRAVAGNW---ITNL (SEQ ID NO: 89)
D11.1c	TYANG (SEQ ID NO: 52)	SIYARSRP---YIATWAK (SEQ ID NO: 71)	GDASGIP---YFKL (SEQ ID NO: 90)
A5.2c	SNMAG (SEQ ID NO: 53)	TILNGNT---YIATWAK (SEQ ID NO: 72)	GNY---YPL (SEQ ID NO: 91)
Fid	DFAMS (SEQ ID NO: 54)	YIYATGTRDYYIATWAK (SEQ ID NO: 73)	GNY---YPL (SEQ ID NO: 92)
F1e	DFAMS (SEQ ID NO: 54)	YIYATGTRDYYIATWAK (SEQ ID NO: 73)	GLT---YPL (SEQ ID NO: 92)
F4.2	SYGMN (SEQ ID NO: 55)	YIDPDYGT---YIATWAK (SEQ ID NO: 74)	GATSGYPS---YTNL (SEQ ID NO: 93)
F10b	SYGMN (SEQ ID NO: 55)	YIDPDYGT---YIATWAK (SEQ ID NO: 74)	GATSGYPS---YTNL (SEQ ID NO: 93)
E1c	SYGMN (SEQ ID NO: 56)	ITYSGNY---YIATWAK (SEQ ID NO: 75)	G---FNL (SEQ ID NO: 94)
A1.1	TRNMS (SEQ ID NO: 57)	YSSGNN---HYATWAK (SEQ ID NO: 76)	GNA---YSDL (SEQ ID NO: 95)
F1.2	TRNMS (SEQ ID NO: 57)	IIIGSGTT---YIATWAK (SEQ ID NO: 77)	DQPTIYAGDGTGATGTRDL (SEQ ID NO: 96)
F10b	SYTMS (SEQ ID NO: 58)	IIISGTS---YIATWAK (SEQ ID NO: 78)	DQPTIYAGDGTGATGTRDL (SEQ ID NO: 97)
F7a	SYTMS (SEQ ID NO: 59)	IIISGSA---YIATWAK (SEQ ID NO: 79)	DQPTIYAGGTYGATGTRDL (SEQ ID NO: 98)
F6b	SNMIS (SEQ ID NO: 60)	IIVGSGTT---YIATWAK (SEQ ID NO: 80)	DQPTIYAGGTYG---ATGTRDL (SEQ ID NO: 99)
C12b	SNRIS (SEQ ID NO: 60)	IIVGSGTT---YIATWAK (SEQ ID NO: 80)	DQPTIYAGGTYG---ATGTRDL (SEQ ID NO: 99)
D2.1b	TNAMIS (SEQ ID NO: 61)	TITYGTTNA---YIATWAK (SEQ ID NO: 81)	GNT---YSDL (SEQ ID NO: 100)
D1.1	TNAMIS (SEQ ID NO: 61)	TITYGTTNA---YIATWAK (SEQ ID NO: 81)	GNT---YSDL (SEQ ID NO: 100)
D2.2a	SSYWIC (SEQ ID NO: 62)	CIYPSNGSTYIATWAK (SEQ ID NO: 82)	AYIXYGGG---FFDL (SEQ ID NO: 101)
D2.2b	NYGW (SEQ ID NO: 63)	YIDPFVGS---YIATWAK (SEQ ID NO: 83)	EASYFV---GMDL (SEQ ID NO: 102)

クローン：配列用の代表的なクローンの表示 LC : Ig重鎖 HC : Ig軽鎖 CDR : 相補性決定領域

【図9c】

表1(続き) : CLL特異的ウサギscFv抗体の発現パターン

Expression Pattern:							
CLONE	CLL	B	RL	Ramos	TF-1	Ag	Linker
A2c	+	+	++	+	-	S	
G12.1c	+	+	+	+	-	CD19	L
B4.2a	+	nd	+	+	-		L
E1c	++	+	-	-	-	CD23	S
F2d	++	+	-	-	-		S
E5e	±	nd	-	-	-		S
H6.2b	++	++	-	-	-		S
G10.1	+	+	-	-	-		S
D11.1c	++	+	-	-	-	CD23	S
A5.2c	++	+	-	-	-		S
F1d	+	±	-	-	-		S
F1e	++	nd	-	-	-		S
E4.2	+	+	-	-	-		S
E2c	+	±	-	-	-		S
A9c	++	+	-	-	-		S
E11e	++	+	-	-	-		S
A1.1	+	+	nd	nd	nd		L
F5.2	+	nd	+	+	-		L
F10b	nd	nd	nd	nd	nd		L
F7a	nd	nd	nd	nd	nd		L
F6b	nd	nd	nd	nd	nd		L
C12b	nd	nd	nd	nd	nd		L
D2.1b	nd	nd	nd	nd	nd		S
D1.1	+	+	nd	nd	nd		L
D2.2a	nd	nd	nd	nd	nd		L
D2.2b	nd	nd	nd	nd	nd		S

クローン：配列用の代表的なクローンの表示

発現パターン：全細胞ELISAアッセイにより決定された原発性ヒト細胞及び細胞系へのscFv抗体の結合

C L L : 慢性リンパ性白血病（原発性腫瘍及びCLL-AAT細胞系）

B : 正常、原発性ヒトBリンパ腫

R L : 非ホジキンリンパ腫細胞系

R a m o s : バーキットリンパ腫細胞系

T F - 1 : ヒト赤芽球症細胞系

A g : scFv抗体で認識された抗原（免疫沈降法及び質量分光分析により測定）

L i n k e r : V L 及びV H領域間のリンカー配列の種類 (S ; 短リンカー、L ; 長リンカー)

## 【手続補正書】

【提出日】平成19年2月22日(2007.2.22)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

OX-2/CD200が被験者中でアップレギュレートされるかを決定するための組成物であって、該組成物は、OX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを含有する組成物。

## 【請求項2】

OX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを含有する、OX-2/CD200がアップレギュレートされる症状を治療するための組成物。

**【請求項3】**

OX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを含有する、癌を治療するための組成物。

**【請求項4】**

OX-2/CD200又はOX-2/CD200レセプターへ結合するポリペプチドを含有する、CLLを治療するための組成物。

**【請求項5】**

OX-2/CD200へ結合する抗体を含有する、請求項1～4いずれか1項記載の組成物。

**【請求項6】**

OX-2/CD200へ結合するモノクローナル抗体を含有する、請求項1～4いずれか1項記載の組成物。

**【請求項7】**

OX-2/CD200レセプターへ結合する抗体を含有する、請求項1～4いずれか1項記載の組成物。

**【請求項8】**

OX-2/CD200レセプターへ結合するモノクローナル抗体を含有する、請求項1～4いずれか1項記載の組成物。

**【請求項9】**

悪性癌細胞によりアップレギュレートされるポリペプチドの代謝経路を妨害する抗体を含有する、癌を治療するための組成物。

**【請求項10】**

上記抗体はアップレギュレートされるポリペプチドへ結合する、請求項9記載の組成物。

**【請求項11】**

上記抗体は、アップレギュレートされるポリペプチドが相互作用するレセプターへ結合する、請求項9記載の組成物。

**【請求項12】**

上記抗体はポリペプチドの発現を調節する抗原へ結合する、請求項9記載の組成物。

**【請求項13】**

上記ポリペプチドはOX-2/CD200である、請求項9記載の組成物。

**【請求項14】**

ポリペプチドの発現が悪性癌細胞によりアップレギュレートされることを特定するために癌患者をスクリーニングするための組成物であって、該組成物は、アップレギュレートされるポリペプチドの代謝経路を妨害する抗体を含有する、組成物。

**【請求項15】**

前記患者は、CLL患者を含む、請求項14記載の組成物。

**【請求項16】**

前記患者のスクリーニングは、OX-2/CD200のアップレギュレーションの検出を含む、請求項14記載の組成物。

**【請求項17】**

前記抗体は、OX-2/CD200へ結合する、請求項14記載の組成物。

**【請求項18】**

前記抗体は、OX-2/CD200が相互作用するレセプターへ結合する、請求項14記載の組成物。

**【請求項19】**

前記抗体は、OX-2/CD200の発現を調節する抗原へ結合する、請求項14記載の組成物。

**【請求項20】**

SEQ.ID.Nos: 5、12及び13からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖CDR1領域を有する抗体を含有する、請求項1～4、9又は14いずれか1項記載の組成物。

**【請求項21】**

SEQ.ID.Nos : 2 1 及び 2 3 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 C D R 2 領域を有する抗体を含有する、請求項 1 ~ 4、9 又は 1 4 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 2 2】

SEQ.ID.Nos : 2 9、3 7 及び 3 8 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 C D R 3 領域を有する抗体を含有する、請求項 1 ~ 4、9 又は 1 4 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 2 3】

SEQ.ID.Nos : 5 0、5 5 及び 5 6 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 C D R 1 領域を有する抗体を含有する、請求項 1 ~ 4、9 又は 1 4 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 2 4】

SEQ.ID.Nos : 6 9、7 4 及び 7 5 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 C D R 2 領域を有する抗体を含有する、請求項 1 ~ 4、9 又は 1 4 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 2 5】

SEQ.ID.Nos : 8 8、9 3 及び 9 4 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 C D R 3 領域を有する抗体を含有する、請求項 1 ~ 4、9 又は 1 4 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 2 6】

SEQ.ID.Nos : 5、1 2、1 3、2 1、2 3、2 9、3 7、3 8、5 0、5 5、5 6、6 9、7 4、7 5、8 8、9 3 及び 9 4 からなる群から選ばれる一以上の配列を含む抗体を含有する、請求項 1 ~ 4、9 又は 1 4 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 2 7】

ヒト化抗体を含有する、請求項 1 ~ 4、9 又は 1 4 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 2 8】

Fv、scFv、Fab' 又は F(ab')2 を含有する、請求項 1 ~ 4、9 又は 1 4 いずれか 1 項記載の組成物。

【請求項 2 9】

抗体が結合する抗原を特定する方法であり、CLL患者から採取した組織を使用して得られる抗体ライブラリーを作成するステップ；

上記ライブラリーの 1 以上の構成員を、ATCC 寄託番号 P T A - 3 9 2 0 として寄託された細胞系 CLL-AAT の溶解産物と接触させるステップ；及び

上記ライブラリーの少なくとも 1 の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップ；を含有する、方法。

【請求項 3 0】

上記ライブラリー作成ステップは、CLL細胞を有する非ヒト有機体又はその一部を免疫化することを含む、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

上記ライブラリー作成ステップは、合成抗体ライブラリーを CLL 細胞又は CLL 細胞系とパンニングすることを含む、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 2】

上記ライブラリーは、ファージディスプレイによりスクリーニングされ、ライブラリー構成員を単離する、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

上記ライブラリーは、1 以上のCLL患者から単離された原発性CLL細胞とパンニングされる、請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 4】

更にCLL細胞上でアップレギュレートされる抗原へ結合する抗体ライブラリーの構成員を特定するステップを含有する、請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 5】

上記抗体ライブラリーの構成員は OX-2/CD200 へ結合する、請求項 3 4 記載の方法。

【請求項 3 6】

ATCC 寄託番号 P T A - 3 9 2 0 として寄託された細胞系 CLL - AAT 中の細胞を使用して得られる抗体ライブラリーを作成するステップ；

上記ライブラリーの 1 以上の構成員と CLL 患者から採取した組織からの細胞の溶解産物とを接觸させるステップ；及び

上記ライブラリーの少なくとも 1 の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップ；を含有する、抗体が結合する抗原を特定する方法。

【請求項 3 7】

非ヒト有機体を CLL 患者から採取した組織からの CLL 細胞の少なくとも一部で免疫化するステップ；

上記非ヒト有機体の免疫化に対する免疫反応を基礎として抗体ライブラリーを構築するステップ；

上記ライブラリーの 1 以上の構成員と CLL 細胞とを接觸させるステップ；及び

上記ライブラリーの少なくとも 1 の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップ；を含有する、抗体が結合する抗原を特定する方法。

【請求項 3 8】

上記ライブラリーの 1 以上の構成員と CLL 細胞とを接觸させるステップは、上記ライブラリーの 1 以上の構成員と CLL 患者から採取した組織からの細胞の溶解産物とを接觸させることを含む、請求項 3 6 記載の方法。

【請求項 3 9】

抗体が結合する抗原を特定する方法であり、

非ヒト有機体を CLL 細胞の少なくとも一部で免疫化するステップ；

上記非ヒト有機体の免疫化に対する免疫反応を基礎として抗体ライブラリーを構築するステップ；

上記ライブラリーの 1 以上の構成員と CLL 細胞とを接觸させるステップ；及び

上記ライブラリーの少なくとも 1 の構成員へ結合する抗原の特徴付けをするステップ；を含有する、方法。

【請求項 4 0】

CLL 細胞によりアップレギュレートされる抗原へ結合する抗体。

【請求項 4 1】

上記抗原は OX-2/CD200 である、請求項 4 0 記載の抗体。

【請求項 4 2】

SEQ.ID.Nos : 5、12 及び 13 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 CDR 1 領域を含有する、請求項 4 0 記載の抗体。

【請求項 4 3】

SEQ.ID.Nos : 21 及び 23 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 CDR 2 領域を含有する請求項 4 0 記載の抗体。

【請求項 4 4】

SEQ.ID.Nos : 29、37 及び 38 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 CDR 3 領域を含有する、請求項 4 0 記載の抗体。

【請求項 4 5】

SEQ.ID.Nos : 50、55 及び 56 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 CDR 1 領域を含有する、請求項 4 0 記載の抗体。

【請求項 4 6】

SEQ.ID.Nos : 69、74 及び 75 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 CDR 2 領域を含有する、請求項 4 0 記載の抗体。

【請求項 4 7】

SEQ.ID.Nos : 88、93 及び 94 からなる群から選ばれる配列を含む軽鎖 CDR 3 領域を含有する、請求項 4 0 記載の抗体。

【請求項 4 8】

SEQ.ID.Nos : 5、12、13、21、23、29、37、38、50、55、56、69、74、75、88、93 及び 94 からなる群から選ばれる一以上の配列を含有する、請求項 4 0 記載の抗体。

**【請求項 4 9】**

上記抗体はヒト化抗体である、請求項 4 0 記載の抗体。

**【請求項 5 0】**

上記抗体はFv、scFv、Fab'又はF(ab')2である、請求項 4 0 記載の抗体。

**【手続補正 2】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 2】

**技術分野**

本発明は、慢性リンパ球性白血病（CLL）細胞由来の細胞系ならびにCLL及び他の疾患の研究及び治療におけるそれらの使用に関する。特に、本発明は、2001年1月11日にアメリカ培養コレクション（ATCC、マナサス、バージニア、USA）へ、ブダペスト条約に基づきATCC寄託番号PTA-3920として寄託されたCLL細胞系指定記号「CLL-AAT」に関する。

**【手続補正 3】**

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 8 3

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 8 3】

【図1】磁気活性化細胞分離(MACS)による抗体ライブラリーの細胞表面パンニング中に含まれる代表的ステップを概略的に図示する。

【図2】選択された(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞への結合の存在及び正常ヒトPBMCへの結合の不在を示す、全細胞ELISAの結果を示すグラフである。

【図3 a】図3a及び3bは、選択された(ウサギ)scFv抗体の、原発性B-CLL細胞、及び正常原発性B細胞への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図3 b】図3a及び3bは、選択された(ウサギ)scFv抗体の、原発性B-CLL細胞、及び正常原発性B細胞への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図4 a】図4a及び4bは、scFvクローニングが患者特異的(即ちイディオタイプ)又は血液タイプ特異的(即ちHLA)抗原へ結合するか否かを決定するために使用される全細胞ELISAの結果を示す。

【図4 b】図4a及び4bは、scFvクローニングが患者特異的(即ちイディオタイプ)又は血液タイプ特異的(即ちHLA)抗原へ結合するか否かを決定するために使用される全細胞ELISAの結果を示す。

【図5 a】図5a及び5bは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及び3種のヒト赤血球細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図5 b】図5a及び5bは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及び3種のヒト赤血球細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図6 a】図6a、6b及び6cは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及びCLL-AAT、B-CLL患者由来の細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図6 b】図6a、6b及び6cは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及びCLL-AAT、B-CLL患者由来の細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図6 c】図6a、6b及び6cは、(ウサギ)scFvクローニングの、原発性B-CLL細胞及びCLL-AAT、B-CLL患者由来の細胞系への結合を比較する、全細胞ELISAの結果を示す。

【図7】3色フローサイトメトリーにより分析した本発明のscFv抗体結合特異性を示す。

【図8 a】図8a、8b及び8cは、本発明のscFv抗体により認識される抗原の発現レベルを示す。

す。

【図 8 b】図 8a、8b及び8cは、本発明のscFv抗体により認識される抗原の発現レベルを示す。

【図 8 c】図 8a、8b及び8cは、本発明のscFv抗体により認識される抗原の発現レベルを示す。

【図 9 a】図9a(表1: CLLscFvクローニングのまとめ)は、CDR配列の概要及び選択されたscFv抗体の結合特異性を提供する。

【図 9 b】図9b(CLL特異的ウサギscFv抗体のCDR配列)は、CDR配列の概要及び選択されたscFv抗体の結合特異性を提供する。

【図 9 c】図9cは、代表的クローニングの発現パターンを提供する。

【図 10】正常PBMCと比較した、図8a～8cに記載されている原発性CLL細胞でのscFv抗体の発現レベルのフローサイトメトリー結果の概要を示す表2(scFv抗体で標識されたB-CLL細胞及び正常PBMCの平均蛍光強度)である。

【図 11】10人のCLL患者から単離された末梢血単核球上での、scFv-9抗原とCD38+細胞の発現レベル割合を比較した、フローサイトメトリー結果の概要を示す表(CLЛ細胞上のscFv-9抗原及びCD38発現の比較)である。

【図 12】免疫沈降及び質量分析法によるscFv抗原の特定を示す。

【図 13】3種のscFv抗体がヒトOX-2/CD200cDNAクローニングで一時的にトランスフェクトされた293-EBNA細胞へ特異的に結合することを示す。

【図 14】OX-2/CD200トランスフェクト細胞の存在は、IL-2及びIFN-等のTh1サイトカインのダウンレギュレーションを生じることを示す。

【図 15】混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在は、IL-2へのTH1応答のダウンレギュレーションを生じたことを示す。

【図 16】混合リンパ球反応中のCLL細胞の存在は、IFN-へのTH1応答のダウンレギュレーションを生じたことを示す。

【図 17 A】ヒト(細胞)の存在又は不存在のいずれかの下で、 $4 \times 10^6$  RAJI細胞を皮下注射した全ての群のNOD/SCIDマウスの腫瘍体積の平均+/-SDを示す(グループ1～5)。

【図 17 B】ヒト(細胞)の存在又は不存在のいずれかの下で、 $4 \times 10^6$  RAJI細胞を皮下注射した全ての群のNOD/SCIDマウスの腫瘍体積の平均+/-SDを示す(グループ6～11)。

【図 18】2種のパラメトリック検定(スチュードントt-法及びWelch法)並びに1種のノンパラメトリック検定、Wilcoxon法を使用して実施した統計的分析の結果を示す。

【手続補正4】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】全図

【補正方法】変更

【補正の内容】

【図1】

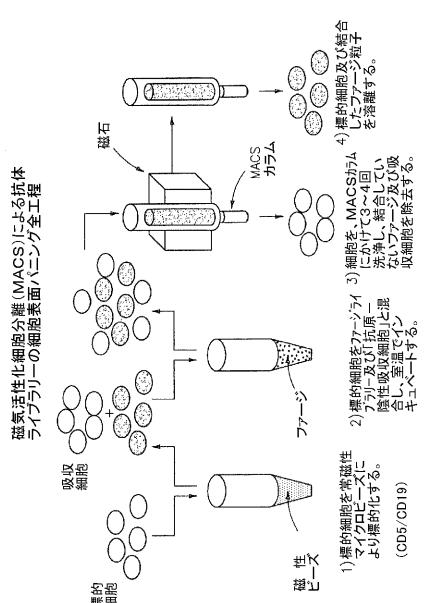


FIG. 1

【図2】

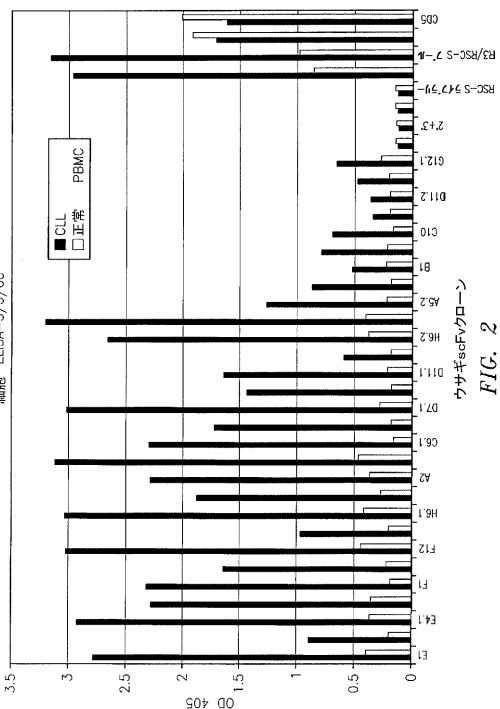


FIG. 2

【図3 a】

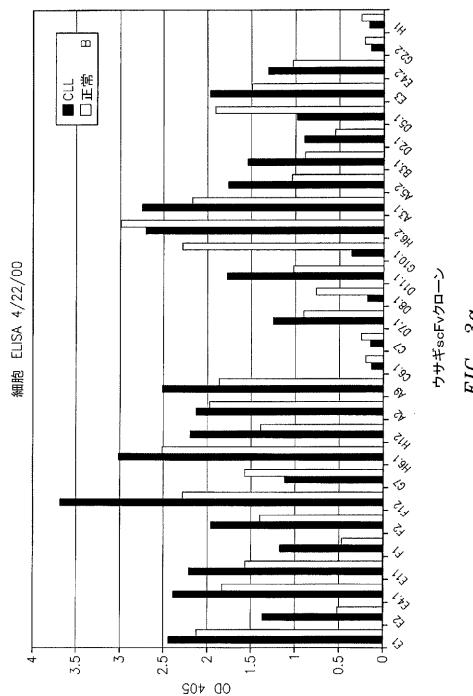


FIG. 3a

【図3 b】

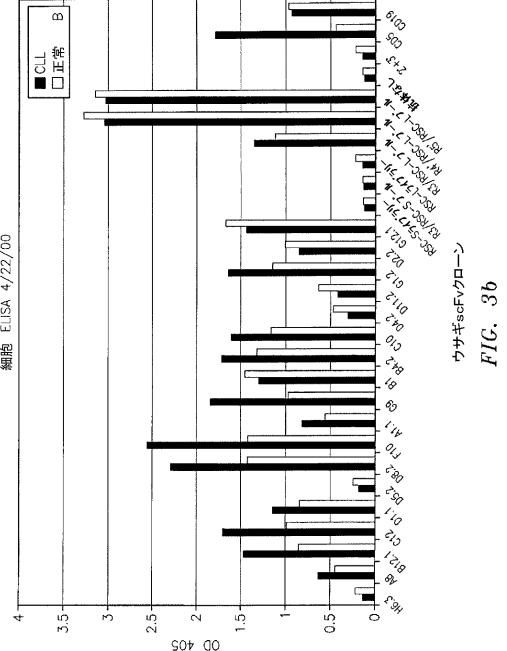


FIG. 3b

【図4 a】

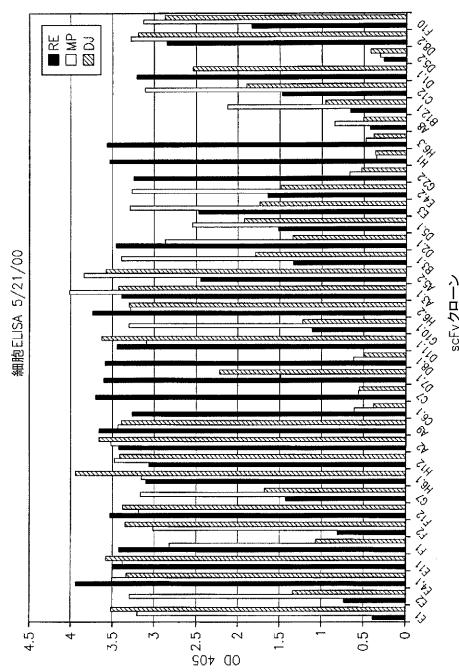


FIG. 4a

【図4 b】

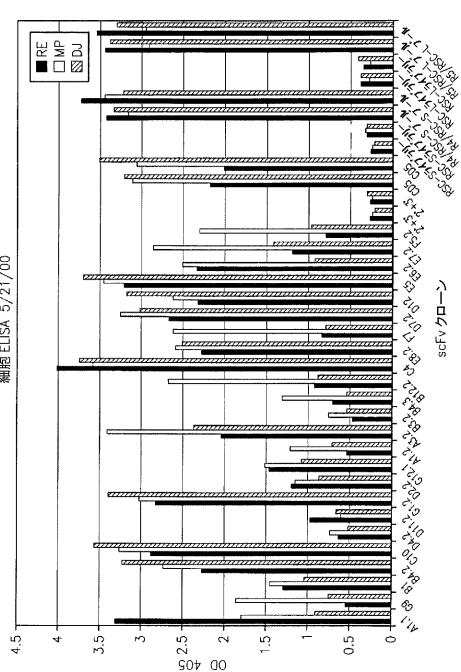


FIG. 4b

【図5 a】

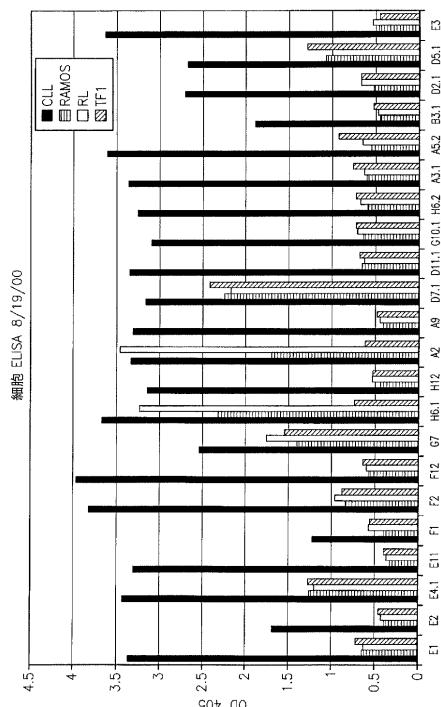


FIG. 5a

【図5 b】

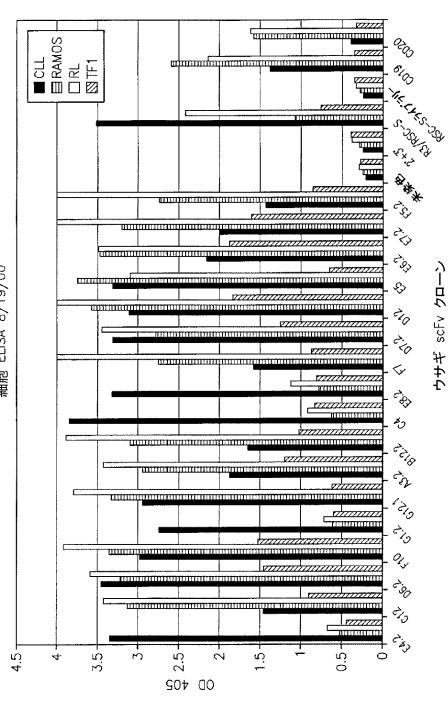


FIG. 5b

【図 6 a】

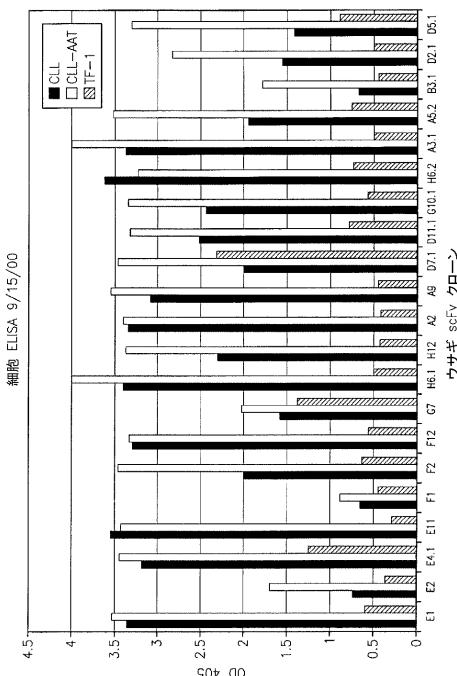
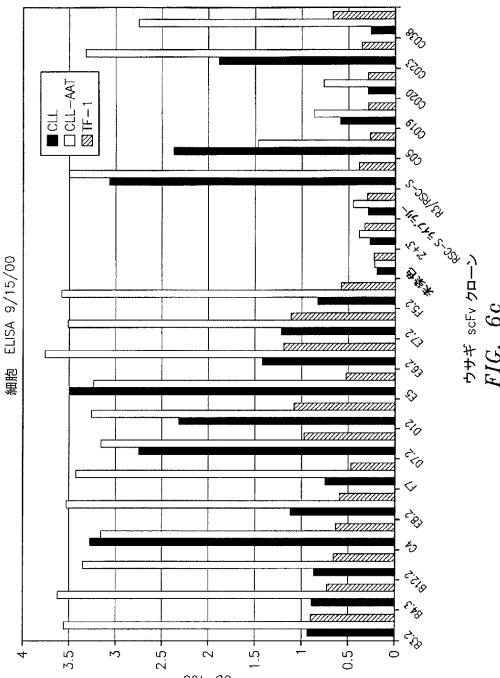


FIG. 6a

【 図 6 c 】



ウサギ scFv フ  
FIG. 6c

【図 6 b】

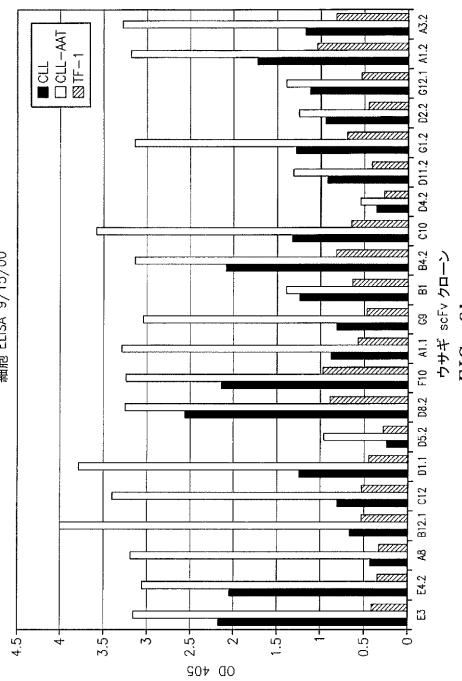


FIG. 6b

【 図 7 】

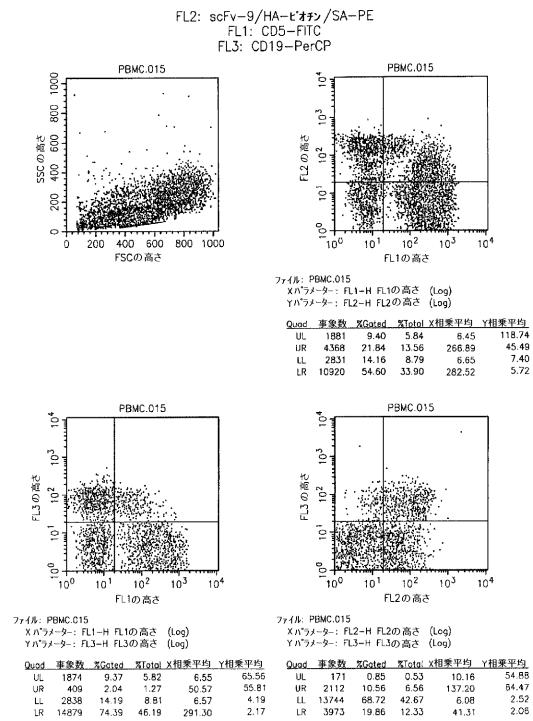
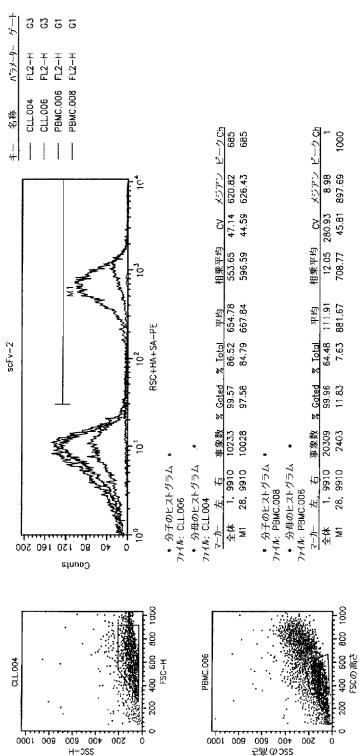


FIG. 7

【図 8 a】



【図 8 b】

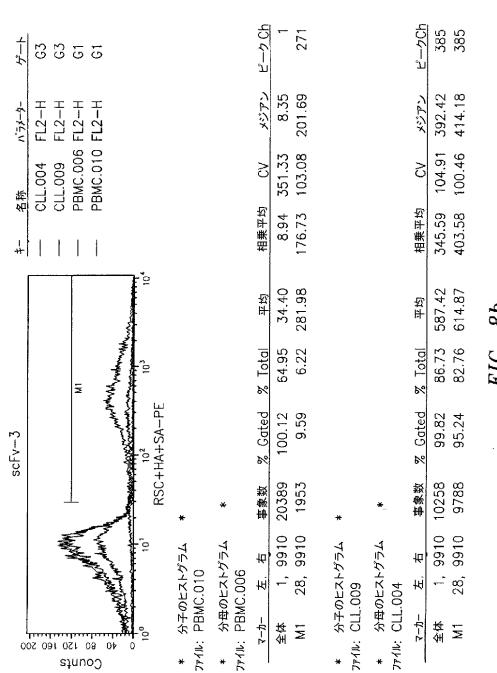
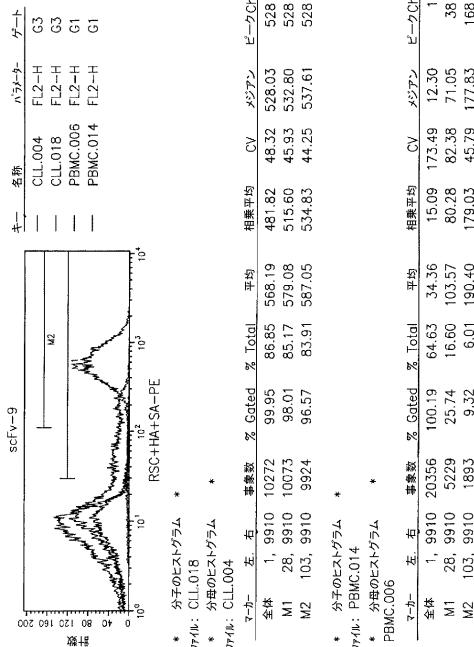


FIG. 8a

FIG. 8c

【図 8 c】



【図 9 a】

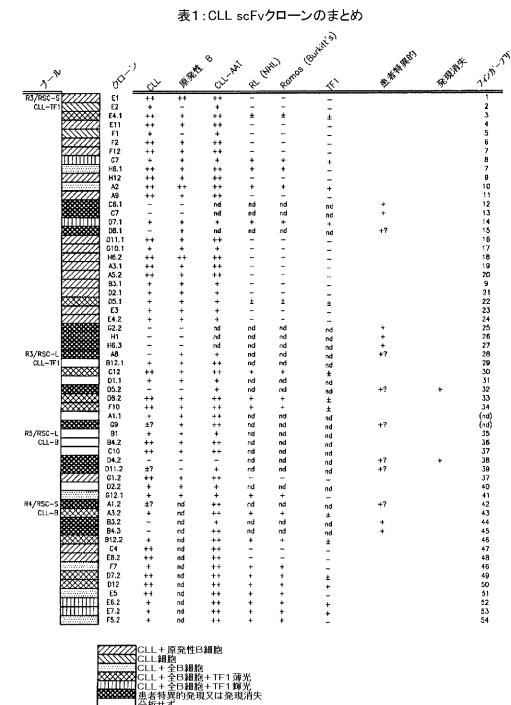


FIG. 9a

表1:CLL scFvクローニングのまとめ

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	20356	100.19	64.63	15.09	64.95	34.40
CLL 006	28,9910	5229	25.74	16.60	103.57	80.28	47.14
CLL 010	103,9910	1893	9.32	6.01	190.40	179.03	111.91
CLL 018	1,9910	10272	99.95	86.85	568.19	481.82	64.48
CLL 004	28,9910	10073	98.01	85.17	519.08	515.60	64.48
CLL 018	103,9910	9924	96.57	83.91	587.05	534.83	53.76
PBMC 006	1,9910	10073	98.01	85.17	519.08	515.60	64.48
PBMC 014	103,9910	9924	96.57	83.91	587.05	534.83	53.76

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 009	1,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 018	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
PBMC 006	1,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46
PBMC 014	28,9910	9788	95.24	82.76	614.87	403.58	100.46

名前	Total	% Gated	% Total	相乗平均	CV	相乗平均	CV
CLL 004	1,9910	10288	99.82	66.73	587.42	34.40	39.42
CLL 009	28,9910	1953	9.59	6.22	28.98	176.73	103.08
CLL 010	28,9910						



【図 13】

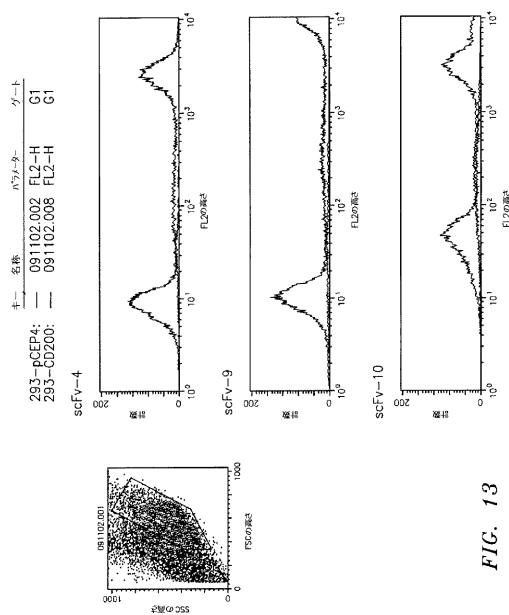


FIG. 13

【図 14】

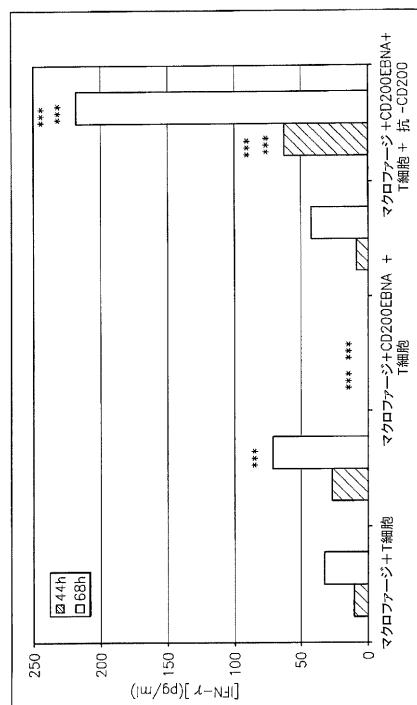


FIG. 14

【図 15】

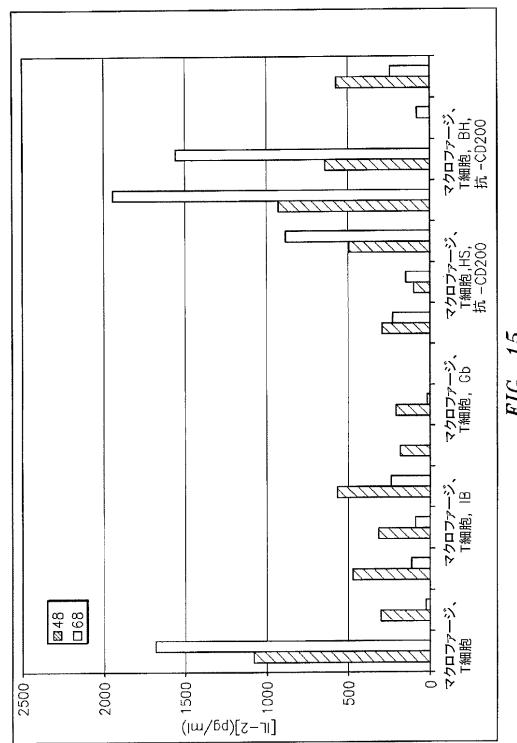


FIG. 15

【図 16】

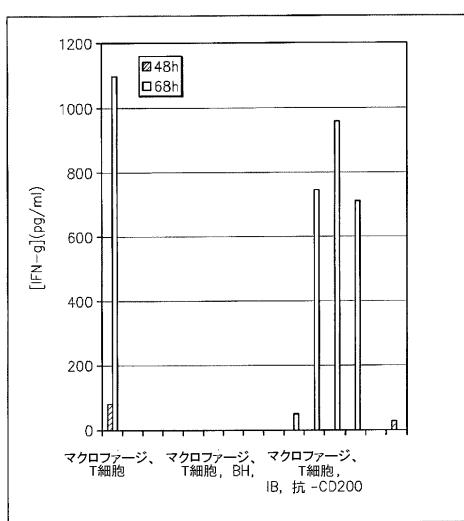


FIG. 16

【図 17A】

グループ 1:マウス8頭、それぞれ $4 \times 10^6$  RAJI細胞  
 グループ 2:マウス9頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^6$  PBL ドナー 1  
 グループ 3:マウス7頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $5 \times 10^6$  PBL ドナー 3  
 グループ 4:マウス6頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^6$  PBL ドナー 2  
 グループ 5:マウス7頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $5 \times 10^6$  PBL ドナー 2

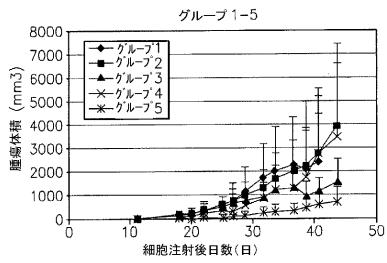


FIG. 17A

【図 17B】

グループ 6:マウス10頭、それぞれ $4 \times 10^6$  RAJI細胞  
 グループ 7:マウス10頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^6$  PBL ドナー 3  
 グループ 8:マウス10頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $5 \times 10^6$  PBL ドナー 3  
 グループ 9:マウス9頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^7$  PBL ドナー 3  
 グループ 10:マウス10頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^6$  PBL ドナー 4  
 グループ 11:マウス14頭、 $4 \times 10^6$  RAJI +  $1 \times 10^7$  PBL ドナー 4

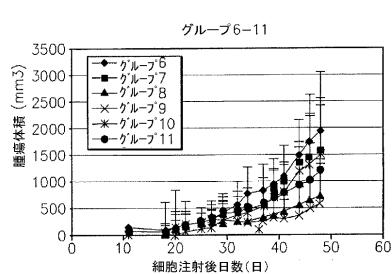


FIG. 17B

【図 18】

群別と比較する グループに対するP2-P7の比較値		群別と比較する グループ6に対するP7-P11を比較する										
d22	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d25	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d27	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d29	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d32	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d34	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d36	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d39	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d41	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d43	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d45	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d46	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
d50	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns

FIG. 18

ns = 有意でない。  
有意味なグループは赤で示した。

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 35/02</b>	<b>(2006.01)</b>	A 6 1 P 35/00
C 1 2 P 21/08	(2006.01)	A 6 1 P 35/02
C 1 2 N 15/09	(2006.01)	C 1 2 P 21/08
		C 1 2 N 15/00 A

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

(72)発明者 キャサリン エス . ボーディッシュ

アメリカ合衆国 9 2 0 1 4 カリフォルニア、デル マー、ボキータ ドライブ 1 3 7 5 4

(72)発明者 ジョン マクホーター

アメリカ合衆国 9 2 1 2 6 カリフォルニア、サン デイエゴ、クウェスター ポイント 9 4 9  
9

(72)発明者 アンケ クレッツロンメル

アメリカ合衆国 9 2 1 1 6 カリフォルニア、サン デイエゴ、ケンジントン ドライブ 4 5  
3 5

F ターム(参考) 4B024 AA01 AA12 BA45 CA02 CA09 EA04

4B064 AG27 CA20 CC24 DA05 DA14

4C084 AA02 BA44 NA14 ZB21 ZB26 ZB27

4C085 AA13 AA14 BB01 BB41 BB43 CC21 DD62 EE01

4H045 AA11 AA30 BA10 CA41 DA76 EA28 EA51 FA74