

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012 年 6 月 7 日(07.06.2012)



(10) 国際公開番号

WO 2012/074097 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/15* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/077924
- (22) 国際出願日: 2011 年 12 月 2 日(02.12.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
61/419,342 2010 年 12 月 3 日(03.12.2010) US
- (71) 出願人(米国を除く全ての指定国について): 協和
発酵キリン株式会社(Kyowa Hakko Kirin Co., Ltd.)
[JP/JP]; 〒1008185 東京都千代田区大手町 1 丁目
6 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人(米国についてのみ): 丹羽 倫平
(NIWA Rinpei). 中川 知明(NAKAGAWA Tomoaki).
村上 拓也(MURAKAMI Takuya). 久保田 麗夫
(KUBOTA Tsuguo).
- (74) 代理人: 小栗 昌平, 外(OGURI Shohei et al.); 〒
1050003 東京都港区西新橋一丁目 7 番 1 3 号
虎ノ門イーストビルディング 10 階 栄光特許
事務所 Tokyo (JP).
- (81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保
護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA,
BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO,
CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS,
JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS,
LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT,
QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保
護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW,
MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ
ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨー
ロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),
OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告(条約第 21 条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト
(規則 5.2(a))

(54) Title: ANTI-CD33 ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗 C D 3 3 抗体

(57) Abstract: Provided are: a monoclonal antibody or a fragment thereof, said monoclonal antibody being capable of binding to the extracellular region of a human CD33 cell at a high affinity and exerting a high ADCC activity; a DNA encoding said antibody or fragment; a vector containing said DNA; a transformant obtained by transferring said vector; a method for producing the aforesaid antibody or fragment using said transformant; and a therapeutic agent and a diagnostic agent using the aforesaid antibody or fragment.

(57) 要約: 本発明は、高いアフィニティーでヒト C D 3 3 細胞外領域に結合し、かつ高い A D C C 活性を発揮するモノクローナル抗体またはその断片、該抗体または該断片をコードする D N A、該 D N A を含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いる該抗体または該断片の製造方法、抗体または該断片を用いる治療剤および診断剤を提供する。



WO 2012/074097 A1

明 細 書

発明の名称：抗CD33抗体

技術分野

[0001] 本発明は、高いアフィニティーでヒトCD33細胞外領域に結合し、かつ高い抗体依存的細胞傷害活性（antibody-dependent cellular cytotoxicity、以下ADCC活性と表記することがある）を発揮するモノクローナル抗体またはその断片、該抗体を産生するハイブリドーマ、該抗体をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該ハイブリドーマまたは該形質転換体を用いる抗体または該断片の製造方法、抗体または該断片を用いる治療剤および診断剤に関する。

背景技術

[0002] Cluster of differentiation（以下、CDと表記することがある）33は、骨髓系前駆細胞、単球および顆粒球に発現する、分子量約6.7万の糖タンパク質である。CD33はI型膜貫通タンパク質であり、細胞外に2つのイムノグロブリンスーパーファミリドメイン（N末より細胞膜側に向かって、順にIgV、IgC2）が存在し、各ドメインに存在するそれぞれ3つのシステイン残基がドメイン内およびドメイン間ジスルフィド結合を形成している。CD33細胞外領域には合計5箇所のN結合型糖鎖付加配列が存在する。CD33はIgV領域を介してシアル酸と結合することが知られ、別名シグレック-3、シアロアドヘジンとも呼ばれるが、その機能の詳細については不明である（非特許文献1）。

[0003] CD33は、別名gp67、シアロアドヘジン、シグレック-3としても知られ、1988年に遺伝子がクローニングされ（非特許文献2）、CD33のDNA配列、アミノ酸配列および立体構造は、公的データベース上に公開されており、例えば、P20138（SWISSPROT）、M23197（EMBL）等のアクセッション番号から参照可能である。

[0004] CD33に結合するモノクローナル抗体（以下、mAbと表記することがある）として、初めて確立されたL4F3、L1B2は1983年に報告されている（非特許文献3）。以後、CD33に対する多くのモノクローナル抗体（以下、抗CD33mAbと表記することがある）が報告されている。報告されている抗CD33mAbの多くは、同じまたは隣接した領域を認識することが知られている（非特許文献1）。

[0005] CD33は大部分の急性骨髄性白血病（acute myelogenous leukemia、以下AMLと表記することがある）細胞において正常細胞に比べて高い発現が認められ、一方、造血幹細胞においては発現していないことから、抗CD33mAbはAML治療薬を目指し臨床応用が進められている。例えば、抗CD33mAbであるP67.6とカリケアマイシン誘導体の結合物であるゲムツズマブオゾガマイシンはAML治療薬として臨床において使用されている。

[0006] 癌治療薬として開発されている抗CD33mAbには、例えば、gemtuzumab ozogamicin（P67.6）（非特許文献4）、lintuzumab（HuM195）（非特許文献5）などがある。これらの抗体は、標的細胞であるCD33発現細胞を特異的に傷害することにより薬効を発揮する抗体である。gemtuzumab ozogamicinは細胞表面上のCD33抗原に結合した後、細胞内に取り込まれる性質を持ち、この性質を利用してカリケアマイシン誘導体を細胞内に送り込み、細胞内において細胞傷害活性を持つ。lintuzumabの薬効メカニズムはADCC活性が主であると考えられる（非特許文献6）。

[0007] ADCC活性とは標的細胞上の抗原に結合した抗体がそのFc領域により免疫細胞のFc受容体と結合することで免疫細胞（ナチュラルキラー細胞など）を活性化し、標的細胞を傷害する活性である。一方、これらの抗体の補体依存性傷害活性（以下、CDC活性と表記することがある）は、抗原発現量が高い場合にのみ発現する（非特許文献6）。

[0008] CDC活性とは標的細胞上の抗原に結合した抗体が血液中の補体関連タン

パク質群からなる一連のカスケード（補体活性化経路）を活性化し、標的細胞を傷害する活性である。また、補体の活性化により生じるタンパク質断片により免疫細胞の遊走および活性化を誘導することができる。

[0009] 通常 I g G 型のヒト抗体には、その定常領域に 1 箇所の N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を有している。しかし、可変領域中にも N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を有している抗体は、糖鎖の結合が変化し、医薬品として均一な抗体の安定供給が困難となる。さらには、蛋白質同士の結合に必須である場合もあり、例えば、L F A - 3 (l y m p h o c y t e f u n c t i o n - a s s o c i a t e d a n t i g e n 3) では C D 2 との結合に N 結合型糖鎖が必要であると報告されており、抗体の結合部位である可変領域に糖鎖が結合することにより、抗体の抗原への結合性が変化してしまう可能性が考えられる（非特許文献 7）。

[0010] 抗体と F c 受容体との結合においては、抗体のヒンジ領域及び定常領域の 2 番目のドメインに結合している糖鎖の重要性が示唆されている（非特許文献 8）。抗体分子の F c 領域に結合している N-グリコシド結合複合型糖鎖の非還元末端へのガラクトースの付加、および還元末端の N-アセチルグルコサミンへのフコースの付加に関しては多様性があることが知られており（非特許文献 9）、特に糖鎖の還元末端の N-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない抗体は、高い A D C C 活性を示すことが報告されている（非特許文献 10、特許文献 1）。

[0011] 一般に医薬品として利用される抗体の多くは、遺伝子組換え技術を用いて作製され、動物細胞、例えば、チャイニーズ・ハムスター卵巣組織由来の C H O 細胞などを宿主細胞として製造されているが、発現させた抗体の糖鎖構造は宿主細胞によって異なる。

[0012] 抗体生産細胞内の α 1, 6-フコシルトランスフェラーゼ、G D P-マンノース 4, 6-デヒドラターゼまたは G D P-4-ケト-6-デオキシ-D-マンノース-3, 5-エピメラーゼの活性を低下または欠失することにより、抗体分子の F c 領域に結合する N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末

端のN-アセチルグルコサミンにフコースが結合していない糖鎖の割合を増加させることが出来る（特許文献2）。

[0013] 抗体のサブクラスにより、CDC活性が異なることが知られている。CDC活性はヒトIgG1およびIgG3において高く、その強さは一般的に $\text{IgG3} \geq \text{IgG1} \gg \text{IgG2} \approx \text{IgG4}$ の序列となる。さらに、ヒトIgG1の定常領域のCH2ドメインをIgG3のCH2ドメインと交換することによりCDC活性がIgG3よりもさらに高まることが出来ることが知られている（特許文献3）。

先行技術文献

特許文献

[0014] 特許文献1：国際公開第00／61739号

特許文献2：国際公開第02／31140号

特許文献3：米国特許出願公開第2007／0148165号明細書

非特許文献

[0015] 非特許文献1：Leucocyte Typing VI, 972 (1997)

非特許文献2：Blood, 72, 314 (1988)

非特許文献3：Blood, 62, 124 (1983)

非特許文献4：Biocomjugate Chem, 13, 47 (2002)

非特許文献5：J. Clin. Oncol., 23, 4110 (2005)

非特許文献6：Cancer Res., 52, 73 (1997)

非特許文献7：Trends in Glycoscience and Glycotechnology, 11, 1 (1991)

非特許文献8：Chemical Immunology, 65, 88 (1997)

非特許文献9：Biochemistry, 36, 130 (1997)

非特許文献10：J. Biol. Chem., 278, 3466 (2003)

発明の開示

発明が解決しようとする課題

[0016] 本発明の課題は、高いアフィニティーでヒトCD33細胞外領域に結合し、かつ高いADCC活性を発揮するモノクローナル抗体またはその断片、該抗体または該断片をコードするDNA、該DNAを含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いる該抗体または該断片の製造方法、並びに該抗体または該断片を含む治療剤および診断剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0017] 本発明者らは、高いアフィニティーでヒトCD33細胞外領域に結合するマウスおよびラットモノクローナル抗体を取得し、該抗体の重鎖可変領域（以下、VHと表記することがある）の相補性決定領域（Complementarity Determining Region、以下、CDRと表記することがある）1～3および軽鎖可変領域（以下、VLと表記することがある）のCDR1～3を有する抗CD33ヒト化抗体、ならびに該CDRの一部のアミノ酸残基を適宜置換した抗CD33ヒト化抗体を作製し、本発明を完成するに至った。

[0018] すなわち、本発明は以下のとおりである。

1. (i) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号99で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(ii) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号100で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で

示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR 2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR 3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD 33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(iii) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、配列番号101で示されるアミノ酸配列を含むCDR 2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR 3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR 2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR 3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD 33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、または

(iv) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、配列番号102で示されるアミノ酸配列を含むCDR 2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR 3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR 2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR 3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD 33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

2. 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、配列番号96で示されるアミノ酸配列を含むCDR 2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR 3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR 1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR 2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR 3を有する軽鎖可変領域を含む、ヒトCD 33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

3. 配列番号86で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号85で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前項2に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

4. 配列番号 87 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 85 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前項 2 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

5. (i) 配列番号 34 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 1、配列番号 35 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 2、および配列番号 36 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 37 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 1、配列番号 38 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 2、および配列番号 39 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 3 を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(ii) 配列番号 40 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 1、配列番号 41 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 2、および配列番号 42 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 43 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 1、配列番号 44 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 2、および配列番号 45 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 3 を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(iii) 配列番号 46 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 1、配列番号 47 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 2、および配列番号 48 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 49 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 1、配列番号 50 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 2、および配列番号 51 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 3 を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(iv) 配列番号 52 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 1、配列番号 53 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 2、および配列番号 54 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 55 で示されるアミノ酸配列を含む CDR 1、配列番号 56 で示されるアミノ酸配列を

含むCDR2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、または

(v) 配列番号58で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号59で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号60で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号61示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号62で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号63で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

6. (i) 配列番号132で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号137で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒトCD33に結合するモノクローナル抗体、

(ii) 配列番号133で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号138で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒトCD33に結合するモノクローナル抗体、

(iii) 配列番号134で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号139で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒトCD33に結合するモノクローナル抗体、

(iv) 配列番号135で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号140で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒトCD33に結合するモノクローナル抗体、または

(v) 配列番号136で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号141で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒトCD33に結合するモノクローナル抗体が結合するヒトCD33上のエピトープに結合する、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

7. (i) 配列番号132で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域およ

び配列番号 137 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体、

(i i) 配列番号 133 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 138 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体、

(i i i) 配列番号 134 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 139 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体、

(i v) 配列番号 135 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 140 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体、または

(v) 配列番号 136 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 141 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体と競合してヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

8. ヒト CD33 に対する解離定数 K_D が $4.0 \times 10^{-9} M$ 以下である、前項 1 から 7 のいずれか 1 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

9. ヒト CD33 に対する解離定数 K_D が $2.0 \times 10^{-9} M$ 以下である、前項 8 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

10. 重鎖定常領域を含む前項 1 から 9 のいずれか 1 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片であって、重鎖定常領域のクラスがヒト IgG であるモノクローナル抗体または該抗体の断片。

11. ヒト IgG のサブクラスがヒト IgG1 である、前項 10 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

12. 重鎖定常領域を含む前項 1 から 11 のいずれか 1 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片であって、重鎖定常領域の Fc に結合している N 結合複合型糖鎖にフコースが結合していないモノクローナル抗体または該抗体の断片。

13. 軽鎖定常領域を含む前項1から12のいずれか1に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片であって、軽鎖定常領域のクラスがヒト κ であるモノクローナル抗体または該抗体の断片。

14. Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFvまたはCDRを含むペプチドである、前項1から13のいずれか1に記載の抗体の断片。

15. 前項1から14のいずれか1に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片をコードするDNA。

16. 前項15に記載のDNAを含有する組換えベクター。

17. (i) 配列番号89で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクター、

(ii) 配列番号90で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクター、

(iii) 配列番号91で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクター、

(iv) 配列番号90で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードするDNAおよび配列番号89で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクター、

または

(v) 配列番号91で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードするDNAおよび配列番号89で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクター。

18. 前項16および17に記載の組換えベクターから選ばれる少なくとも1の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

19. 以下の(i)または(ii)の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる前項18に記載の形質転換体。

(i) 配列番号89で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクターおよび配列番号90で示されるアミノ酸配列

を含む重鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクター

(i i) 配列番号89で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクターおよび配列番号91で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードするDNAを含む組換えベクター

20. 前項18または19に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に前項1から14のいずれか1に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片を生成蓄積させ、該培養物から該モノクローナル抗体または該抗体の断片を採取することを特徴とする、前項1から14のいずれか1に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片の製造方法。

21. 前項1から14のいずれか1に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片を有効成分として含有する医薬組成物。

22. 前項1から14のいずれか1に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片を有効成分として含有する、CD33陽性細胞が関与する疾患の治療剤。

23. CD33陽性細胞が関与する疾患が、癌、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患である、前項22に記載の治療剤。

24. 癌が、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または脾臓癌である、前項23に記載の治療剤。

25. 血液癌が、急性骨髄性白血病、未分化大細胞型リンパ腫、急性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫である、前項24に記載の治療剤。

26. 前項1から14のいずれか1に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片を哺乳動物に投与する工程を含む、CD33陽性細胞が関与する疾患を治療する方法。

27. CD33陽性細胞が関与する疾患が、癌、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患である、前項26に記載の方法。

28. 癌が、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌

、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌である、前項 27 に記載の方法。

29. 血液癌が、急性骨髄性白血病、未分化大細胞型リンパ腫、急性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫である、前項 28 に記載の方法。

30. CD33 陽性細胞が関与する疾患を治療するための、前項 1 から 14 のいずれか 1 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片の使用。

31. CD33 陽性細胞が関与する疾患が、癌、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患である、前項 30 に記載の使用。

32. 癌が、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌である、前項 31 に記載の使用。

33. 血液癌が、急性骨髄性白血病、未分化大細胞型リンパ腫、急性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫である、前項 32 に記載の使用。

発明の効果

[0019] 実施例でも示されるように、本発明のモノクローナル抗体は高いアフィニティーでヒト CD33 細胞外領域に結合し、かつ高い ADCC 活性を発揮する。従って、本発明は、該抗体または該断片、該抗体または該断片をコードする DNA、該 DNA を含むベクター、該ベクターを導入して得られる形質転換体、該形質転換体を用いる該抗体または該断片の製造方法、並びに該抗体または該断片を含む治療剤および診断剤を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1A]図 1 A は、ヒト CD33 発現ベクター構築の概略図を示す。

[図1B]図 1 B は、カニクイザル CD33 発現ベクター構築の概略図を示す。

[図1C]図 1 C は、チンパンジー CD33 発現ベクター構築の概略図を示す。

[図2]図 2 は、ヒスチジンタグ付加可溶型ヒト CD33 発現ベクター構築の概略図を示す。

[図3]図3は、ラットおよびマウス抗CD33モノクローナル抗体の評価（FCM）を示す。

[図4]図4は、ラットおよびマウス抗CD33モノクローナル抗体の評価（ELISA）を示す。

[図5A]図5Aは、抗CD33キメラ抗体発現ベクター構築概略図を示す。

[図5B]図5Bは、抗CD33キメラ抗体発現ベクター構築概略図を示す。

[図6]図6は、抗CD33キメラ抗体の評価（FCM）を示す。

[図7]図7は、抗CD33キメラ抗体の評価（ELISA）を示す。

[図8]図8は、抗CD33キメラ抗体の評価（ADCC）を示す。

[図9]図9は、抗CD33キメラ抗体の評価（CDC）を示す。

[図10]図10は、抗CD33キメラ抗体の細胞膜上での抗体の結合量（図10A）および残存率（図10B）を示す。

[図11]図11は、HM195-1、-113F抗体発現ベクター構築の概略図を示す。

[図12]図12は、抗CD33ヒト化抗体の評価（ADCC）を示す。

[図13]図13は、抗CD33ヒト化抗体の細胞膜上での抗体の結合量（図13A）および残存率（図13B）を示す。

[図14]図14は、抗CD33ヒト化抗体のヒト末梢血中における細胞除去活性を示す。

[図15]図15は、抗CD33ヒト化抗体のヒト、カニクイザルおよびチンパンジーCD33に対する反応性を示す。

発明を実施するための形態

[0021] 本発明は、高いアフィニティーでヒトCD33細胞外領域に結合し、これに伴い、高いADCC活性を有するモノクローナル抗体またはその断片に関する（以下、単に「CD33」と表記した場合には、ヒトCD33を意味するものとする）。

[0022] 本発明におけるCD33としては、配列番号3またはP20138（SWISSPROT）で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドまたは配列

番号3またはEMBLアクセッション番号M23197で示されるアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ酸配列からなり、かつCD33の機能を有するポリペプチド、ならびに配列番号3またはEMBLアクセッション番号M23197で示されるアミノ酸配列と60%以上、好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するアミノ酸配列を有するポリペプチド、最も好ましくは95%以上の相同性を有するアミノ酸配列からなり、かつCD33の機能を有するポリペプチドなどが挙げられる。

[0023] 配列番号3またはP20138 (SWISSPROT) で示されるアミノ酸配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、部位特異的変異導入法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] などを用いて、例えば配列番号3で示されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードするDNAに部位特異的変異を導入することにより得ることができる。欠失、置換または付加されるアミノ酸の数は特に限定されないが、好ましくは1個~数十個、例えば、1~20個、より好ましくは1個~数個、例えば、1~5個のアミノ酸である。

[0024] CD33をコードする遺伝子としては、配列番号4またはEMBLアクセッション番号M23197で示される塩基配列が挙げられる。配列番号4またはEMBLアクセッション番号M23197で示される塩基配列において

、１以上の塩基が欠失、置換または付加された塩基配列からなり、かつCD 33の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、配列番号4またはEMBLアクセッション番号M23197で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有する塩基配列、好ましくは80%以上の相同性を有する塩基配列、さらに好ましくは95%以上の相同性を有する塩基配列からなり、かつCD 33の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子、ならびに配列番号4またはEMBLアクセッション番号M23197で示される塩基配列を有するDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAからなり、かつCD 33の機能を有するポリペプチドをコードするDNAを含む遺伝子なども本発明のCD 33をコードする遺伝子に包含される。

[0025] ストリンジェントな条件下でハイブリダイズするDNAとしては、配列番号4またはEMBLアクセッション番号M23197で示される塩基配列を有するDNAをプローブに用いた、コロニー・ハイブリダイゼーション法、ブランク・ハイブリダイゼーション法、サザンブロット・ハイブリダイゼーション法、またはDNAマイクロアレイ法などにより得られるハイブリダイズ可能なDNAを意味する。

[0026] 具体的には、ハイブリダイズしたコロニー若しくはブランク由来のDNA、または該配列を有するPCR産物若しくはオリゴDNAを固定化したフィルターまたはスライドガラスを用いて、0.7~1.0mol/Lの塩化ナトリウム存在下、65℃でハイブリダイゼーション [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、DNA Cloning 1: Core Techniques, A Practical Approach, Second Edition, Oxford University, (1

995)] を行った後、0.1～2倍濃度のSSC溶液（1倍濃度のSSC溶液の組成は、150mmol/L塩化ナトリウム、15mmol/Lクエン酸ナトリウムよりなる）を用い、65℃条件下でフィルターまたはスライドガラスを洗浄することにより同定できるDNAを挙げることができる。

[0027] ハイブリダイズ可能なDNAとしては、配列番号4またはEMBLアクセッション番号M23197で示される塩基配列と少なくとも60%以上の相同性を有するDNA、好ましくは80%以上の相同性を有するDNA、さらに好ましくは95%以上の相同性を有するDNAをあげることができる。

[0028] 真核生物の蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列には、しばしば遺伝子の多型が認められる。本発明において用いられる遺伝子に、このような多型によって塩基配列に小規模な変異を生じた遺伝子も、本発明のCD33をコードする遺伝子に包含される。

[0029] 本発明における相同性の数値は、特に明示した場合を除き、当業者に公知の相同性検索プログラムを用いて算出される数値であってよいが、塩基配列については、BLAST [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値など、アミノ酸配列については、BLAST2 [Nucleic Acids Res., 25, 3389 (1997)、Genome Res., 7, 649 (1997)、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Education/BLASTinfo/information3.html>] においてデフォルトのパラメータを用いて算出される数値などが挙げられる。

[0030] デフォルトのパラメータとしては、G (Cost to open gap) が塩基配列の場合は5、アミノ酸配列の場合は11、-E (Cost to extend gap) が塩基配列の場合は2、アミノ酸配列の場合は1、-q (Penalty for nucleotide mismatch) が-3、-r (reward for nucleotide match) が1、-e (expect value) が10、-W (wor

dsize) が塩基配列の場合は11残基、アミノ酸配列の場合は3残基、
 -y [Dropoff (X) for blast extensions
 in bits] がblastn の場合は20、blastn以外のプ
 ログラムでは7、-X (X dropoff value for gapp
 ed alignment in bits) が15および-Z (fina
 l X dropoff value for gapped align
 ment in bits) がblastn の場合は50、blastn
 以外のプログラムでは25である (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/html/blastcgihelp.html>)。

[0031] 配列番号3またはP20138 (SWISSPROT) で示されるアミノ
 酸配列の部分配列からなるポリペプチドは、当業者に公知の方法によって作
 製することができる。例えば、配列番号3で示されるアミノ酸配列をコード
 するDNAの一部を欠失させ、これを含む発現ベクターを導入した形質転換
 体を培養することにより作製することができる。また、上記の方法で作製さ
 れるポリペプチドまたはDNAに基づいて、上記と同様の方法により、配列
 番号3またはP20138 (SWISSPROT) で示されるアミノ酸配列
 の部分配列において1以上のアミノ酸が欠失、置換または付加されたアミノ
 酸配列を有するポリペプチドを得ることができる。さらに、配列番号3また
 はP20138 (SWISSPROT) で示されるアミノ酸配列の部分配列
 からなるポリペプチド、または配列番号3またはP20138 (SWISS
 PROT) で示されるアミノ酸配列の部分配列において1以上のアミノ酸が
 欠失、置換または付加されたアミノ酸配列を有するポリペプチドは、フルオ
 レニルメチルオキシカルボニル (Fmoc) 法、t-ブチルオキシカルボニ
 ル (tBoc) 法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0032] 本発明におけるCD33の細胞外領域としては、例えば、配列番号3で示
 される該ポリペプチドのアミノ酸配列を公知の膜貫通領域予測プログラムS
 OSUI (<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp>

／SOSUI／SOSUI__submit.)、TMHMM ver. 2 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>) またはExPASy Proteomics Server (<http://Ca.expasy.org/>) などを用いて予測された領域などが挙げられる。具体的には、SOSUIにおいて予測される細胞外ドメインであるN末より242番目までが挙げられる。細胞外ドメインは、2つのイムノグロブリンスーパーファミリドメインを有しており、いずれのドメインも含まれる。

[0033] 本発明におけるCD33の細胞外領域としては、配列番号3またはP20138 (SWISSPROT) で示されるアミノ酸配列を有するCD33の細胞外領域が天然状態でとりうる構造と同等の構造を有していればいずれの構造でもよい。CD33の細胞外領域が天然状態でとりうる構造とは、細胞膜上に発現しているCD33の天然型の立体構造のことをいう。

[0034] CD33の機能について詳細は不明である。本発明におけるCD33の機能としては、例えば、骨髄系細胞の分化段階において発現し、シアル酸を持った細胞、例えばCD34陽性幹細胞と接着し、細胞の分化の制御に関与することが挙げられる。また、CD33はシアル酸結合たんぱく質であることから、シアル酸分子との結合活性、およびシアル酸分子との結合による細胞内シグナル伝達機能、または細胞の運動能の変化もCD33の機能として挙げられる。

[0035] 本発明の抗体またはその断片が、CD33細胞外領域に結合することは、固相サンドイッチ法などを用いたラジオイムノアッセイ、または酵素免疫測定法 (ELISA) などを用いたCD33を発現した細胞に対する公知の免疫学的検出法、好ましくは蛍光細胞染色法などの特定の抗原を発現した細胞と特定抗原に対する抗体の結合性を調べることで確認することができる。

[0036] 例えば、FMAT8100HTSシステム (アプライドバイオシステム社製) などを用いる蛍光抗体染色法 [Cancer Immunol. Imm

another, 36, 373 (1993)]、フローサイトメトリーを用いる蛍光細胞染色法、またはBiacoreシステム（ジーイーヘルスケア社製）などを用いた表面プラズモン共鳴などの方法が挙げられる。また、公知の免疫学的検出法 [Monoclonal Antibodies—Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などを組み合わせて確認することもできる。

[0037] CD33を発現した細胞としては、CD33を発現していればいずれの細胞でもよく、例えばヒト体内に天然に存在する細胞、ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株、または遺伝子組換え技術により得られた細胞などが挙げられる。

[0038] ヒト体内に天然に存在する細胞としては、例えば、正常単球、顆粒球または骨髓系細胞のほか、骨髓系白血病、例えば、AML患者体内において該ポリペプチドが発現している細胞が挙げられる。例えば、バイオプシーなどで得られた腫瘍細胞のうちでCD33が発現している細胞などが挙げられる。

[0039] ヒト体内に天然に存在する細胞から樹立された細胞株としては、上記の癌患者から得られたCD33が発現している細胞を株化して得られた細胞株のうち、CD33を発現している細胞株が挙げられる。例えば、ヒトから樹立された細胞株であるヒト骨髓系白血病細胞株NB-4 [DSMZ番号: ACC207] またはHL-60 [ATCC番号: CCL-240] などが挙げられる。

[0040] 遺伝子組換え技術により得られた細胞としては、具体的には、例えば、該CD33をコードするcDNAを含む発現ベクターを昆虫細胞または動物細胞などに導入することにより得られる、該CD33を発現した細胞などが挙げられる。

- [0041] 本発明の抗体は、ヒトCD33の細胞外領域に結合し、かつ高いADCC活性を有するヒトCD33に対するモノクローナル抗体および該抗体の断片であって、ヒトCD33に高いアフィニティーを有することが好ましい。ヒトCD33に高いアフィニティーを有するとは、ヒトCD33に対する解離定数が低いことをいう。
- [0042] 本発明の抗体のヒトCD33に対する解離定数（以下、 K_D と表記することがある）は、 $4.0 \times 10^{-9} M$ 以下であることが好ましく、より好ましくは $2.0 \times 10^{-9} M$ 以下である。例えば、 $0.5 \times 10^{-9} M \sim 4.0 \times 10^{-9} M$ 、 $1.0 \times 10^{-9} M \sim 4.0 \times 10^{-9} M$ 、 $0.5 \times 10^{-9} M \sim 2.0 \times 10^{-9} M$ または $1.0 \times 10^{-9} M \sim 2.0 \times 10^{-9} M$ である。
- [0043] ヒトCD33に対する解離定数 K_D を $4.0 \times 10^{-9} M$ 以下とすることにより、治療用抗体として十分なアフィニティーでCD33の細胞外領域に結合することができ、かつ高いADC活性および抗腫瘍活性を有することができる。既に臨床試験が実施されているlintuzumab（HuM195）は、解離定数 K_D が $4 \times 10^{-9} M$ 程度のアフィニティーであり、治療効果を示していることから、本発明の抗体は、更に高い治療効果を示すことができる。
- [0044] アフィニティーとは、反応速度論的な解析により測定されるものであり、例えばBiacore T100（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）などを用いて測定することができる。
- [0045] また、本発明の抗体は、抗原との解離が非常に緩やかである事の特徴とする。解離が緩やかである事、または、解離が緩やかである事および細胞内への取り込みが緩やかである事から、細胞表面上に結合した抗体の量および残存率が高いという利点を有する。
- [0046] 本発明においてモノクローナル抗体としては、ハイブリドーマにより生産される抗体、または抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した形質転換体により生産される遺伝子組換え抗体をあげることができる。
- [0047] モノクローナル抗体とは、単クローンの抗体産生細胞が分泌する抗体で

あり、ただ一つのエピトープ（抗原決定基ともいう）を認識し、モノクローナル抗体を構成するアミノ酸配列（１次構造）が均一である。

[0048] エピトープとは、モノクローナル抗体が認識し、結合する単一のアミノ酸配列、アミノ酸配列からなる立体構造、糖鎖が結合したアミノ酸配列および糖鎖が結合したアミノ酸配列からなる立体構造などが挙げられる。

[0049] 本発明のモノクローナル抗体が認識し、結合するエピトープとしては、好ましくはCD33の細胞外領域、配列番号3で示されるアミノ酸配列の18～259番目のアミノ酸配列に含まれる複数のアミノ酸残基からなるエピトープ、より好ましくはCD33の細胞外領域の細胞膜から遠いイムノグロブリンドメインに含まれる複数のアミノ酸残基からなるエピトープ、またはCD33の細胞外領域の細胞膜に近いイムノグロブリンドメインに含まれる複数のアミノ酸残基からなるエピトープなどをあげることができる。

[0050] 本発明において、解離が遅いとは、Biacore T100において算出される抗体の解離速度定数 k_d の値が、より小さな値を示すことである。解離速度定数 k_d は、例えばBiacore T100（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を用いて測定され、付属ソフトウェアBiacore T100 evaluation software（Biacore社製）により算出することができる。

[0051] 本発明において、ADCC活性を有する抗体とは、CD33発現細胞に対して、同時に複数の抗体のADCC活性を、公知の測定方法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]を用いて測定した場合、検出可能なADCC活性を有する抗体である。

[0052] 本発明において、CDC活性を有する抗体とは、CD33発現細胞に対して、同時に複数の抗体のCDC活性を、ヒト補体を用いて公知のCDC測定方法[Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)]を用いて測定した場合、検出可能なCDC活性を有する抗体である。

[0053] また、本発明のモノクローナル抗体としては、具体的には、下記(i)～

(v) のいずれか 1 の抗体が結合するヒト CD33 上のエピトープと同じエピトープに結合するモノクローナル抗体、下記 (i) ~ (v) のいずれか 1 の抗体と競合してヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体、および下記 (i) ~ (v) のいずれか 1 の抗体と同等の反応性を有する抗体等が挙げられる。

(i) 抗体の V_H が配列番号 132 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の V_L が配列番号 137 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

(ii) 抗体の V_H が配列番号 133 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の V_L が配列番号 138 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

(iii) 抗体の V_H が配列番号 134 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の V_L が配列番号 139 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

(iv) 抗体の V_H が配列番号 135 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の V_L が配列番号 140 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

(v) 抗体の V_H が配列番号 136 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の V_L が配列番号 141 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体が結合するヒト CD33 上のエピトープに結合するモノクローナル抗体

[0054] また、本発明のモノクローナル抗体としては、下記 (i) ~ (v) のいずれか 1 の抗体が結合するヒト CD33 上のエピトープと同じエピトープに結合するモノクローナル抗体、下記 (i) ~ (v) のいずれか 1 の抗体と競合してヒト CD33 に結合するモノクローナル抗体、および下記 (i) ~ (v) のいずれか 1 の抗体と同等の反応性を有する抗体等が挙げられる。

(i) 抗体の V_H が配列番号 103 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体の V_L が配列番号 95 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

(ii) 抗体の V_H が配列番号 104 で表されるアミノ酸配列であり、かつ

抗体のV L が配列番号 9 5 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

(i i i) 抗体のV H が配列番号 1 0 5 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のV L が配列番号 9 5 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

(i v) 抗体のV H が配列番号 9 3 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のV L が配列番号 9 5 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

(v) 抗体のV H が配列番号 1 0 6 で表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のV L が配列番号 9 5 で表されるアミノ酸配列であるモノクローナル抗体

[0055] さらに本発明のモノクローナル抗体としては、以下の (i) ~ (v) のヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体が挙げられる。

(i) 配列番号 3 4 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 5 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 3 6 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 3 7 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 3 8 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 3 9 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体

(i i) 配列番号 4 0 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 1 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 4 2 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 4 3 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 4 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 4 5 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体

(i i i) 配列番号 4 6 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 7 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 4 8 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 4 9 示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 5 0 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 5 1 で示されるアミノ酸配列を含む C D R

3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体
(iv) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号53で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体
(v) 配列番号58で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号59で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号60で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号61示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号62で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号63で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体

[0056] さらに、本発明のモノクローナル抗体には、配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号53で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体のV領域にN結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を有さないように改変した抗体（以下、改変型抗体と表記することがある）も包含される。

[0057] 本発明のモノクローナル抗体としては、具体的には、抗体のVHのCDR1およびCDR3が、それぞれ配列番号52および54で示されるアミノ酸配列を含み、かつ、抗体のVLのCDR1、CDR2およびCDR3が、それぞれ配列番号55、56および57で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体が挙げられる。

[0058] 上記の抗体のVHのCDR2としては、改変型抗体のVHのCDR2であ

って、例えば、配列番号 53 で示されるアミノ酸配列の 3 番目の A s n を他のアミノ酸残基に置換する改変、および 5 番目の S e r を他のアミノ酸残基に置換する改変のうち、少なくとも 1 つの改変が導入されたアミノ酸配列を含む C D R 2 が挙げられる。

[0059] 具体的には、例えば、以下の (1) ~ (5) のアミノ酸配列などが挙げられる。

(1) 配列番号 53 で示されるアミノ酸配列の 3 番目の A s n を T y r に置換した配列番号 99 で表されるアミノ酸配列

(2) 配列番号 53 で示されるアミノ酸配列の 3 番目の A s n を S e r に置換した配列番号 100 で表されるアミノ酸配列

(3) 配列番号 53 で示されるアミノ酸配列の 3 番目の A s n を G l n に置換した配列番号 101 で表されるアミノ酸配列

(4) 配列番号 53 で示されるアミノ酸配列の 5 番目の S e r を A l a に置換した配列番号 96 で表されるアミノ酸配列

(5) 配列番号 53 で示されるアミノ酸配列の 5 番目の S e r を G l y に置換した配列番号 102 で表されるアミノ酸配列

[0060] ハイブリドーマは、例えば上記の C D 33 を発現した細胞などを抗原として調製し、該抗原を免疫した動物より抗原特異性を有する抗体生産細胞を誘導し、さらに、該抗体生産細胞と骨髓腫細胞とを融合させることにより、調製することができる。該ハイブリドーマを培養するか、または該ハイブリドーマを動物に投与して該動物を腹水癌化させ、該培養液または腹水から分離、精製することにより抗 C D 33 モノクローナル抗体を取得することができる。

[0061] 抗原を免疫する動物としてはハイブリドーマを作製することが可能であれば、いかなるものも用いることができるが、好ましくはマウス、ラット、ハムスター、ニワトリ、ラビットおよびウシなどが用いられる。また、このような動物から抗体産生能を有する細胞を取得し、該細胞に *in vitro* で免疫を施した後に、骨髓腫細胞と融合して作製したハイブリドーマが生産

する抗体なども本発明の抗体に包含される。

[0062] 本発明において遺伝子組換え抗体としては、例えば、ヒト型キメラ抗体、ヒト型CDR移植抗体（ヒト化抗体という場合もある）、ヒト抗体または抗体断片など、遺伝子組換えにより製造される抗体が挙げられる。

[0063] 遺伝子組換え抗体において、モノクローナル抗体の特徴を有し、抗原性が低く、血中半減期が延長されたものは、治療剤として好ましい。遺伝子組換え抗体は、例えば、上記本発明のモノクローナル抗体を遺伝子組換え技術を用いて改変したものが挙げられる。

[0064] ヒト型キメラ抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLとヒト抗体の重鎖定常領域（以下、CHと表記することがある）および軽鎖定常領域（以下、CLと表記することがある）とからなる抗体をいう。

[0065] 本発明のヒト型キメラ抗体は、CD33を特異的に認識し、かつCD33の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマより、VHおよびVLをコードするcDNAを取得し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0066] ヒト型キメラ抗体のCHとしては、ヒトイムノグロブリン（以下、hIgと表記することがある）に属すればいかなるものでもよいが、好ましくはhIgGクラスのものを用いられ、さらにhIgGクラスに属するhIgG1、hIgG2、hIgG3またはhIgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型キメラ抗体のCLとしては、hIgに属すればいずれのものでもよく、κクラスまたはλクラスのものを用いることができる。

[0067] 更に、本発明のキメラ抗体としては、上述のモノクローナル抗体と競合して、CD33の細胞外領域に結合するキメラ抗体および上述のキメラ抗体が結合するCD33の細胞外領域上に存在するエピトープと、同じエピトープに結合するキメラ抗体を挙げることができる。

[0068] ヒト型CDR移植抗体は、ヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列をヒト抗体のVHおよびVLの適切な位置に移植した抗体をいう。本発明のヒト型CDR移植抗体は、CD33を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するヒト以外の動物のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから産生されるヒト以外の動物の抗体のVHおよびVLのCDRのアミノ酸配列を任意のヒト抗体のVHおよびVLのフレームワーク領域（以下、FRと表記することがある）に移植したV領域をコードするcDNAを構築し、ヒト抗体のCHおよびCLをコードする遺伝子を有する動物細胞用発現ベクターにそれぞれ挿入してヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築し、動物細胞へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0069] ヒト型CDR移植抗体のCHとしては、hlgに属すればいかなるものでもよいが、好ましくはhlgGクラスのものを用いられ、さらにhlgGクラスに属するhlgG1、hlgG2、hlgG3、またはhlgG4といったサブクラスのいずれも用いることができる。また、ヒト型CDR移植抗体のCLとしては、hlgに属すればいずれのものでもよく、κクラスまたはλクラスのものを用いることができる。

[0070] 本発明のヒト型CDR移植抗体としては、具体的には、例えば、抗体のVHが、配列番号84で表されるアミノ酸配列、または配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSer、27番目のGly、28番目のSer、29番目のVal、30番目のSer、40番目のGln、45番目のGly、46番目のLeu、49番目のIle、72番目のVal、93番目のVal、95番目のTyr、97番目のAlaおよび106番目のThrから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含み、および／または、抗体のVLが、配列番号85で表されるアミノ酸配列、または配列番号85で表されるアミノ酸配列中の2番目のIle、8番目のPro、11番目のLeu、15番目のProおよび90番目のValから選ばれる少なくとも1つのアミノ酸残基が他のアミ

ノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含む、ヒト化抗体などが挙げられるが、導入される改変の数に制限はない。

[0071] 例えば、以下に示すヒト化抗体が挙げられる。

抗体のVHが配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSer、27番目のGly、28番目のSer、29番目のVal、30番目のSer、40番目のGln、45番目のGly、46番目のLeu、49番目のIle、72番目のVal、93番目のVal、95番目のTyr、97番目のAlaおよび106番目のThrから選ばれる少なくとも1のアミノ酸残基が、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体。

[0072] 前記ヒト化抗体の中でも、以下の(1)～(3)が好ましい。

(1) 抗体のVHが配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のGly、40番目のGln、45番目のGly、46番目のLeu、49番目のIle、72番目のVal、および97番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体

(2) 抗体のVHが配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のGly、28番目のSer、29番目のVal、30番目のSer、72番目のVal、および97番目のAlaが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体

(3) 抗体のVHが配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のGly、および72番目のValが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体

[0073] 上記のアミノ酸改変の結果、得られる抗体のVHのアミノ酸配列としては、例えば、配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThr

に、および106番目のThrをValに置換する改変から選ばれる少なくとも1つの改変が導入されたアミノ酸配列が挙げられる。

[0074] 14個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列が挙げられる。

[0075] 13個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(14)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、29番目のValをIleに、30番目

のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目

のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(8) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(9) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(10) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(11) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番

目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(12) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(13) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(14) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

[0076] 10個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(3)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

[0077] 8個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号84で表されるアミノ酸配列中の28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列などが挙げられる

[0078] 7個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のGlyをTyrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをAr

gに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列などが挙げられる

[0079] 6個の改変が導入されたV Hのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のG l yをT y rに、28番目のS e rをT h rに、29番目のV a lをI l eに、30番目のS e rをT h rに、72番目のV a lをA r gに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列などが挙げられる

[0080] 5個の改変が導入されたV Hのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、45番目のG l yをA r gに、46番目のL e uをM e tに、49番目のI l eをM e tに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列などが挙げられる

[0081] 4個の改変が導入されたV Hのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(6)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、45番目のG l yをA r gに、46番目のL e uをM e tに、および49番目のI l eをM e tに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のG l yをT y rに、28番目のS e rをT h rに、29番目のV a lをI l eに、および30番目のS e rをT h rに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、45番目のG l yをA r gに、46番目のL e uをM e tに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、45番目のG l yをA r gに、49番目のI l eをM e tに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、46番目のL e uをM e tに、49番目のI l eをM e tに、および9

7番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の45番目のG l yをA r gに、46番目のL e uをM e tに、49番目のI l eをM e tに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列

[0082] 2個の改変が導入されたV Hのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(12)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のG l yをT y rに、および72番目のV a lをA r gに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の27番目のG l yをT y rに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、および45番目のG l yをA r gに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、および46番目のL e uをM e tに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、および49番目のI l eをM e tに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の40番目のG l nをL y sに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の45番目のG l yをA r gに、および46番目のL e uをM e tに置換したアミノ酸配列

(8) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の45番目のG l yをA r gに、および49番目のI l eをM e tに置換したアミノ酸配列

(9) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の45番目のG l yをA r gに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列

(10) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の46番目のL e uをM e tに、および49番目のI l eをM e tに置換したアミノ酸配列

(11) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の46番目のL e uをM e tに、および97番目のA l aをT h rに置換したアミノ酸配列

(12) 配列番号84で表されるアミノ酸配列中の49番目のIleをMetに、および97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列

[0083] 1個の改変が導入されたVHのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号84で表されるアミノ酸配列中の25番目のSerをThrに置換したアミノ酸配列、27番目のGlyをTyrに置換したアミノ酸配列、28番目のSerをThrに置換したアミノ酸配列、29番目のValをIleに置換したアミノ酸配列、30番目のSerをThrに置換したアミノ酸配列、40番目のGlnをLysに置換したアミノ酸配列、45番目のGlyをArgに置換したアミノ酸配列、46番目のLeuをMetに置換したアミノ酸配列、49番目のIleをMetに置換したアミノ酸配列、72番目のValをArgに置換したアミノ酸配列、93番目のValをThrに置換したアミノ酸配列、95番目のTyrをPheに置換したアミノ酸配列、97番目のAlaをThrに置換したアミノ酸配列、または、106番目のThrをValに置換したアミノ酸配列、が挙げられる。

[0084] 抗体のVLについては、例えば、配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のIle、8番目のPro、11番目のLeu、15番目のPro、および90番目のValから選ばれる少なくとも1のアミノ酸残基が、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体が挙げられる。

[0085] 前記ヒト化抗体の中でも、以下の(1)～(4)が好ましい。

(1) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のIle、11番目のLeu、15番目のPro、および90番目のValが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体

(2) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のIle、15番目のPro、および90番目のValが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体。

(3) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のIle、11番目のLeu、および15番目のProが、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体。

(4) 配列番号 85 のアミノ酸配列中の 2 番目の I l e、および 15 番目の P r o が、他のアミノ酸残基に置換されたアミノ酸配列を含むヒト化抗体

[0086] 上記のアミノ酸改変の結果、得られる抗体 V L のアミノ酸配列としては、配列番号 85 のアミノ酸配列中の 2 番目の I l e を V a l に、8 番目の P r o を L e u に、11 番目の L e u を G l n に、15 番目の P r o を L e u に、および 90 番目の V a l が L e u に置換する改変から選ばれる少なくとも 1 つの改変が導入されたアミノ酸配列が挙げられる。

[0087] 5 個の改変が導入された V L のアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号 85 のアミノ酸配列中の 2 番目の I l e を V a l に、8 番目の P r o を L e u に、11 番目の L e u を G l n に、15 番目の P r o を L e u に、および 90 番目の V a l が L e u に置換したアミノ酸配列が挙げられる。

[0088] 4 個の改変が導入された V L のアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の (1) ~ (5) のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号 85 のアミノ酸配列中の 8 番目の P r o を L e u に、11 番目の L e u を G l n に、15 番目の P r o を L e u に、および 90 番目の V a l が L e u に置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号 85 のアミノ酸配列中の 2 番目の I l e を V a l に、11 番目の L e u を G l n に、15 番目の P r o を L e u に、および 90 番目の V a l が L e u に置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号 85 のアミノ酸配列中の 2 番目の I l e を V a l に、8 番目の P r o を L e u に、15 番目の P r o を L e u に、および 90 番目の V a l が L e u に置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号 85 のアミノ酸配列中の 2 番目の I l e を V a l に、8 番目の P r o を L e u に、11 番目の L e u を G l n に、および 90 番目の V a l が L e u に置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号 85 のアミノ酸配列中の 2 番目の I l e を V a l に、8 番目の P r o を L e u に、11 番目の L e u を G l n に、および 15 番目の P r

oをL e uに置換したアミノ酸配列

[0089] 3個の改変が導入されたV Lのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(3)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のI l eをV a lに、8番目のP r oをL e uに、および15番目のP r oをL e uに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のI l eをV a lに、11番目のL e uをG l nに、および15番目のP r oをL e uに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のI l eをV a lに、15番目のP r oをL e uに、および90番目のV a lがL e uに置換したアミノ酸配列

[0090] 2個の改変が導入されたV Lのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、以下の(1)～(7)のアミノ酸配列が挙げられる。

(1) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のI l eをV a lに、および8番目のP r oをL e uに置換したアミノ酸配列

(2) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のI l eをV a lに、および11番目のL e uをG l nに置換したアミノ酸配列

(3) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のI l eをV a lに、および15番目のP r oをL e uに置換したアミノ酸配列

(4) 配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のI l eをV a lに、および90番目のV a lがL e uに置換したアミノ酸配列

(5) 配列番号85のアミノ酸配列中の8番目のP r oをL e uに、および15番目のP r oをL e uに置換したアミノ酸配列

(6) 配列番号85のアミノ酸配列中の11番目のL e uをG l nに、および15番目のP r oをL e uに置換したアミノ酸配列

(7) 配列番号85のアミノ酸配列中の15番目のP r oをL e uに、および90番目のV a lがL e uに置換したアミノ酸配列

- [0091] 1個の改変が導入されたV Lのアミノ酸配列としては、具体的には、例えば、配列番号85のアミノ酸配列中の2番目のI l eをV a lに置換したアミノ酸配列、8番目のP r oをL e uに置換したアミノ酸配列、11番目のL e uをG l nに置換したアミノ酸配列、15番目のP r oをL e uに置換したアミノ酸配列、または、90番目のV a lがL e uに置換したアミノ酸配列、が挙げられる。
- [0092] ヒト抗体は、元来、ヒト体内に天然に存在する抗体をいうが、最近の遺伝子工学的、細胞工学的、発生工学的な技術の進歩により作製されたヒト抗体ファージライブラリーおよびヒト抗体産生トランスジェニック動物から得られる抗体なども含まれる。
- [0093] ヒト体内に天然に存在する抗体は、例えば、ヒト末梢血リンパ球を単離し、E Bウイルスなどを感染させ不死化し、クローニングすることにより、該抗体を産生するリンパ球を培養でき、培養上清中より該抗体を精製することができる。
- [0094] ヒト抗体ファージライブラリーは、ヒトB細胞から調製した抗体遺伝子をファージ遺伝子に挿入することによりF a bまたはs c F vなどの抗体断片をファージ表面に発現させたライブラリーである。該ライブラリーより、抗原を固定化した基質に対する結合活性を指標として所望の抗原結合活性を有する抗体断片を表面に発現しているファージを回収することができる。該抗体断片は、さらに、遺伝子工学的手法により2本の完全なH鎖および2本の完全なL鎖からなるヒト抗体分子へも変換することができる。
- [0095] ヒト抗体産生トランスジェニック動物は、ヒト抗体遺伝子が細胞内に組込まれた動物を意味する。具体的には、例えば、マウスE S細胞へヒト抗体遺伝子を導入し、該E S細胞をマウスの初期胚へ移植後、発生させることによりヒト抗体産生トランスジェニックマウスを作製することができる。ヒト抗体産生トランスジェニック動物からのヒト抗体は、通常のヒト以外の動物で行われているハイブリドーマ作製方法を用い、ヒト抗体産生ハイブリドーマを取得し、培養することで培養上清中にヒト抗体を産生蓄積させることによ

り作製できる。

[0096] 上述の抗体または抗体断片を構成するアミノ酸配列において、1つ以上のアミノ酸が欠失、付加、置換または挿入され、かつ上述の抗体またはその断片と同様な活性を有するモノクローナル抗体またはその断片も、本発明のモノクローナル抗体またはその断片に包含される。

[0097] 欠失、置換、挿入および／または付加されるアミノ酸の数は1個以上でありその数は特に限定されないが、部位特異的変異導入法 [Molecular Cloning 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997)、Nucleic Acids Research, 10, 6487 (1982)、Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 79, 6409 (1982)、Gene, 34, 315 (1985)、Nucleic Acids Research, 13, 4431 (1985)、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)] などの周知の技術により、欠失、置換もしくは付加できる程度の数である。例えば、1～数十個、好ましくは1～20個、より好ましくは1～10個、さらに好ましくは1～5個である。

[0098] 上記の抗体のアミノ酸配列において1つ以上のアミノ酸残基が欠失、置換、挿入または付加されたとは、次のことを示す。即ち、同一配列中の任意、かつ1または複数のアミノ酸配列中において、1または複数のアミノ酸残基の欠失、置換、挿入または付加があることを意味する。また、欠失、置換、挿入または付加が同時に生じる場合もあり、置換、挿入または付加されるアミノ酸残基は天然型と非天然型いずれの場合もある。

[0099] 天然型アミノ酸残基としては、例えば、L-アラニン、L-アスパラギン、L-アスパラギン酸、L-グルタミン、L-グルタミン酸、グリシン、L-ヒスチジン、L-イソロイシン、L-ロイシン、L-リジン、L-メチオ

ニン、L-フェニルアラニン、L-プロリン、L-セリン、L-スレオニン、L-トリプトファン、L-チロシン、L-バリン、またはL-システインなどが挙げられる。

[0100] 以下に、相互に置換可能なアミノ酸残基の好ましい例を示す。同一群に含まれるアミノ酸残基は相互に置換可能である。

A群：ロイシン、イソロイシン、ノルロイシン、バリン、ノルバリン、アラニン、2-アミノブタン酸、メチオニン、O-メチルセリン、t-ブチルグリシン、t-ブチルアラニン、シクロヘキシルアラニン

B群：アスパラギン酸、グルタミン酸、イソアスパラギン酸、イソグルタミン酸、2-アミノアジピン酸、2-アミノスベリン酸

C群：アスパラギン、グルタミン

D群：リジン、アルギニン、オルニチン、2, 4-ジアミノブタン酸、2, 3-ジアミノプロピオン酸

E群：プロリン、3-ヒドロキシプロリン、4-ヒドロキシプロリン

F群：セリン、スレオニン、ホモセリン

G群：フェニルアラニン、チロシン

[0101] 本発明において、抗体断片としては、例えば、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv、diabody、dsFvおよびCDRを含むペプチドなどが挙げられる。

[0102] Fabは、IgGを蛋白質分解酵素であるパパインで処理して得られる断片のうち（H鎖の224番目のアミノ酸残基で切断される）、H鎖のN末端側約半分とL鎖全体がジスルフィド結合で結合した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0103] 本発明のFabは、CD33を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体をパパインで処理して得ることができる。また、該抗体のFabをコードするDNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、Fabを製造することもできる。

[0104] $F(a b')_2$ は、IgGのヒンジ領域の2個のジスルフィド結合の下部を蛋白質分解酵素であるペプシンで分解して得られた、2つのFab領域がヒンジ部分で結合して構成された、分子量約10万の抗原結合活性を有する断片である。本発明の $F(a b')_2$ は、CD33を特異的に認識し、かつその細胞外領域に結合するモノクローナル抗体をペプシンで処理して得ることができる。また、下記のFab'をチオエーテル結合またはジスルフィド結合させ、作製することもできる。

[0105] Fab'は、上記 $F(a b')_2$ のヒンジ領域のジスルフィド結合を切断した分子量約5万の抗原結合活性を有する抗体断片である。本発明のFab'は、本発明のCD33を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合する $F(a b')_2$ をジチオスレイトールなどの還元剤で処理して得ることができる。また、Fab'断片をコードするDNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、Fab'を製造することもできる。

[0106] scFvは、1本のVHと1本のVLとを適当なペプチドリinker（以下、Pと表記する）を用いて連結した、VH-P-VLまたはVL-P-VHポリペプチドで、抗原結合活性を有する抗体断片である。

[0107] 本発明のscFvは、本発明のCD33を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするcDNAを取得し、scFvをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0108] d i a b o d yは、scFvが二量体化した抗体断片で、二価の抗原結合活性を有する抗体断片である。二価の抗原結合活性は、同一であることもできるし、一方を異なる抗原結合活性とすることもできる。

[0109] 本発明のd i a b o d yは、本発明のCD33を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のVHおよびVLをコードするc

DNAを取得し、s c F vをコードするDNAをペプチドリンカーのアミノ酸配列の長さが8残基以下となるように構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0110] d s F vは、V HおよびV L中のそれぞれ1アミノ酸残基をシステイン残基に置換したポリペプチドを該システイン残基間のジスルフィド結合を介して結合させたものをいう。システイン残基に置換するアミノ酸残基は既知の方法 [Protein Engineering, 7, 697 (1994)] に従って、抗体の立体構造予測に基づいて選択することができる。

[0111] 本発明のd s F vは、本発明のC D 3 3を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のV HおよびV Lをコードするc DNAを取得し、d s F vをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。

[0112] C D Rを含むペプチドは、V HまたはV LのC D Rの少なくとも1領域以上を含んで構成される。複数のC D Rを含むペプチドは、直接または適当なペプチドリンカーを介して結合させることができる。本発明のC D Rを含むペプチドは、本発明のC D 3 3を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体のV HおよびV LのC D RをコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物用発現ベクターまたは真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、製造することができる。また、C D Rを含むペプチドは、F m o c法、またはt B o c法などの化学合成法によって製造することもできる。

[0113] 本発明のモノクローナル抗体は、本発明のC D 3 3の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその断片に放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、蛋白質、または抗体医薬などを化学的若しくは遺伝子工学的に結合させた抗体の誘導体を包含する。

- [0114] 本発明における、抗体の誘導体は、本発明のCD33の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその断片のH鎖若しくはL鎖のN末端側あるいはC末端側、抗体またはその断片中の適当な置換基若しくは側鎖、さらにはモノクローナル抗体またはその断片中の糖鎖などに、放射性同位元素、低分子の薬剤、高分子の薬剤、免疫賦活剤、蛋白質または抗体医薬などを化学的手法〔抗体工学入門，地人書館（1994）〕により結合させることにより製造することができる。
- [0115] また、本発明のCD33の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその断片をコードするDNAと、結合させたい蛋白質または抗体医薬をコードするDNAとを連結させて発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを適当な宿主細胞へ導入し、発現させる遺伝子工学的な手法より製造することができる。
- [0116] 放射性同位元素としては、例えば、 ^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{90}Y 、 ^{64}Cu 、 ^{99}Tc 、 ^{77}Lu 、または ^{211}At などが挙げられる。放射性同位元素は、クロアミンT法などによって抗体に直接結合させることができる。また、放射性同位元素をキレートする物質を抗体に結合させてもよい。キレート剤としては、例えば、1-イソチオシアネートベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸（MX-DTPA）などが挙げられる。
- [0117] 低分子の薬剤としては、例えば、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗剤、抗生物質、植物アルカロイド、トポイソメラーゼ阻害剤、ホルモン療法剤、ホルモン拮抗剤、アロマトラーゼ阻害剤、P糖蛋白阻害剤、白金錯体誘導体、M期阻害剤若しくはキナーゼ阻害剤などの抗癌剤〔臨床腫瘍学，癌と化学療法社（1996）〕、ハイドロコチゾン若しくはプレドニゾンなどのステロイド剤、アスピリン若しくはインドメタシンなどの非ステロイド剤、金チオマレート若しくはペニシラミンなどの免疫調節剤、サイクロフォスファミド若しくはアザチオプリンなどの免疫抑制剤、またはマレイン酸クロルフェニラミン若しくはクレマシチンのような抗ヒスタミン剤などの抗炎症剤〔炎症と抗炎症療法，医歯薬出版株式会社（1982）〕などが挙げら

れる。

[0118] 抗癌剤としては、例えば、アミフォスチン（エチオール）、シスプラチン、ダカルバジン（DTIC）、ダクチノマイシン、メクロレタミン（ナイトロジェンマスタード）、ストレプトゾシン、シクロフォスファミド、イホスファミド、カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、ドキソルビシン（アドリアマイシン）、エピルビシン、ゲムシタビン（ゲムザール）、ダウノルビシン、プロカルバジン、マイトマイシン、シタラビン、エトポシド、メトトレキセート、5-フルオロウラシル、フルオロウラシル、ビンブラスチン、ビンクリスチン、ブレオマイシン、ダウノマイシン、ペプロマイシン、エストラムスチン、パクリタキセル（タキソール）、ドセタキセル（タキソテア）、アルデスロイキン、アスパラギナーゼ、ブスルファン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、クラドリビン、カンプトテシン、10-ヒドロキシー-7-エチルーカンプトテシン（SN38）、フロクスウリジン、フルダラビン、ヒドロキシウレア、イホスファミド、イダルビシン、メスナ、イリノテカン（CPT-11）、ノギテカン、ミトキサントロン、トポテカン、ロイプロリド、メゲストロール、メルファラン、メルカプトプリン、ヒドロキシカルバミド、プリカマイシン、ミトタン、ペガスパラガーゼ、ペントスタチン、ピボプロマン、ストレプトゾシン、タモキシフェン、ゴセレリン、リュープロレニン、フルタミド、テニポシド、テストラクトン、チオグアニン、チオテパ、ウラシルマスタード、ビノレルビン、クロラムブシル、ハイドロコチゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、ビンデシン、ニムスチン、セムスチン、カペシタビン、トムデックス、アザシチジン、UFT、オキザロプラチン、ゲフィチニブ（イレッサ）、イマチニブ（STI571）、エルロチニブ、FMS-like tyrosine kinase 3（Flt3）阻害剤、vascular endothelial growth factor receptor（VEGFR）阻害剤、fibroblast growth factor receptor（FGFR）阻害剤、イレッサ、タルセバなどのepi

dermal growth factor receptor (EGFR) 阻害剤、ラディシコール、17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン、ラパマイシン、アムサクリン、オールートランスレチノイン酸、サリドマイド、アナストロゾール、ファドロゾール、レトロゾール、エキセメスタン、金チオマレート、D-ペニシラミン、ブシラミン、アザチオプリン、ミゾリビン、シクロスポリン、ラパマイシン、ヒドロコルチゾン、ベキサロテン（ターグレチン）、タモキシフェン、デキサメタゾン、プロゲステロン類、エストロゲン類、アナストロゾール（アリミデックス）、ロイプリン、アスピリン、インドメタシン、セレコキシブ、アザチオプリン、ペニシラミン、金チオマレート、マレイン酸クロルフェニラミン、クロロフェニラミン、クレマシチン、トレチノイン、ベキサロテン、砒素、ボルテゾミブ、アロプリノール、カリケアマイシン、イブリツモマブチウキセタン、タルグレチン、オゾガミン、クラリスロマシン、ロイコボリン、イファスファミド、ケトコナゾール、アミノグルテチミド、スラミン、メトトレキセート、マイタンシノイド、またはその誘導体、などが挙げられる。

[0119] 低分子の薬剤と抗体とを結合させる方法としては、例えば、グルタルアルデヒドを介して薬剤と抗体のアミノ基間を結合させる方法、または水溶性カルボジイミドを介して薬剤のアミノ基と抗体のカルボキシル基を結合させる方法などが挙げられる。

[0120] 高分子の薬剤としては、例えば、ポリエチレングリコール（以下、PEGと表記することがある）、アルブミン、デキストラン、ポリオキシエチレン、スチレンマレイン酸コポリマー、ポリビニルピロリドン、ピランコポリマー、またはヒドロキシプロピルメタクリルアミドなどが挙げられる。これらの高分子化合物を抗体またはその断片に結合させることにより、（１）化学的、物理的あるいは生物学的な種々の因子に対する安定性の向上、（２）血中半減期の顕著な延長、（３）免疫原性の消失または抗体産生の抑制、などの効果が期待される〔バイオコンジュゲート医薬品、廣川書店（１９９３）〕。例えば、PEGと抗体を結合させる方法としては、PEG化修飾試薬と反

応させる方法などが挙げられる〔バイオコンジュゲート医薬品，廣川書店（1993）〕。

[0121] PEG化修飾試薬としては、例えば、リジンの ϵ -アミノ基への修飾剤（日本国特開昭61-178926号公報）、アスパラギン酸およびグルタミン酸のカルボキシル基への修飾剤（日本国特開昭56-23587号公報）、またはアルギニンのグアニジノ基への修飾剤（日本国特開平2-117920号公報）などが挙げられる。

[0122] 免疫賦活剤としては、イムノアジュバントとして知られている天然物でもよく、具体例としては、免疫を亢進する薬剤が、 β （1 $\rightarrow$ 3）グルカン（レンチナン、シゾフィラン）、または α ガラクトシルセラミドなどが挙げられる。

[0123] 蛋白質としては、例えば、NK細胞、マクロファージ、または好中球などの免疫担当細胞を活性化するサイトカイン若しくは増殖因子、または毒素蛋白質などが挙げられる。

[0124] サイトカインまたは増殖因子としては、例えば、インターフェロン（以下、INFと記す）- α 、INF- β 、INF- γ 、インターロイキン（以下、ILと記す）-2、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、IL-23、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）、顆粒球／マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）、またはマクロファージコロニー刺激因子（M-CSF）などが挙げられる。

[0125] 毒素蛋白質としては、例えば、リシン、ジフテリアトキシンなどが挙げられ、毒性を調節するためにタンパク質に変異を導入したタンパク毒素も含まれる。

[0126] 抗体医薬としては、例えば、抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原、腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗原、病変部位の血管新生に関与する抗原に対する抗体が挙げられる。

[0127] 抗体の結合によりアポトーシスが誘導される抗原としては、例えば、CD4、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD24、CD

37、CD53、CD72、CD73、CD74、CDw75、CDw76、CD77、CDw78、CD79a、CD79b、CD80 (B7. 1)、CD81、CD82、CD83、CDw84、CD85、CD86 (B7. 2)、human leukocyte antigen (HLA) - Class II、またはEpidermal Growth Factor Receptor (EGFR) などが挙げられる。

[0128] 腫瘍の病態形成に関わる抗原または免疫機能を調節する抗体の抗原としては、例えば、CD4、CD40、CD40リガンド、B7ファミリー分子 (CD80、CD86、CD274、B7-DC、B7-H2、B7-H3、またはB7-H4)、B7ファミリー分子のリガンド (CD28、CTLA-4、ICOS、PD-1、またはBTLA)、OX-40、OX-40リガンド、CD137、tumor necrosis factor (TNF) 受容体ファミリー分子 (DR4、DR5、TNFR1、またはTNFR2)、TNF-related apoptosis-inducing ligand receptor (TRAIL) ファミリー分子、TRAILファミリー分子の受容体ファミリー (TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、またはTRAIL-R4)、receptor activator of nuclear factor kappa B ligand (RANK)、RANKリガンド、CD25、葉酸受容体4、サイトカイン [IL-1 α 、IL-1 β 、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-13、transforming growth factor (TGF) β 、またはTNF α など]、これらのサイトカインの受容体、ケモカイン (SLC、ELC、I-309、TARC、MDC、またはCTACKなど)、またはこれらのケモカインの受容体が挙げられる。

[0129] 病変部位の血管新生を阻害する抗体の抗原としては、例えば、vascular endothelial growth factor (VEGF)、Angiopoietin、fibroblast growth factor (FGF)、EGF、platelet-derived gr

rowth factor (PDGF)、insulin-like growth factor (IGF)、erythropoietin (EPO)、TGF β 、IL-8、Ephillin、SDF-1、またはこれらの受容体などが挙げられる。

[0130] CD33に結合するモノクローナル抗体またはその断片と、蛋白質または抗体医薬との融合抗体は、該モノクローナル抗体または該断片をコードするcDNAに、蛋白質または該抗体医薬をコードするcDNAを連結させ、融合抗体をコードするDNAを構築し、該DNAを原核生物または真核生物用発現ベクターに挿入し、該発現ベクターを原核生物または真核生物へ導入することにより発現させ、該融合抗体を製造することができる。

[0131] 上記抗体の誘導体を検出方法、定量方法、検出用試薬、定量用試薬または診断剤として使用する場合に、本発明のCD33の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその断片に結合する薬剤としては、通常の免疫学的検出または測定法で用いられる標識体が挙げられる。

[0132] 標識体としては、例えば、アルカリフォスファターゼ、ペルオキシダーゼ若しくはルシフェラーゼなどの酵素、アクリジニウムエステル若しくはロフィンなどの発光物質、またはフルオレセインイソチオシアネート (FITC) 若しくはテトラメチルローダミンイソチオシアネート (RITC) などの蛍光物質などが挙げられる。

[0133] また、本発明は、CD33の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその断片を有効成分として含有するCD33陽性細胞が関与する疾患の治療剤に関する。

[0134] CD33陽性細胞が関与する疾患としては、CD33が発現している細胞が関与する疾患であればいかなるものでもよく、例えば、癌、自己免疫疾患、またはアレルギー性疾患が挙げられる。

[0135] CD33陽性細胞としては、例えば、CD33陽性細胞である単球、マクロファージ、顆粒球などが挙げられる。CD33が発現する単球・好中球は

微生物などの異物除去に関与する細胞であることから、異物貪食が関与する疾患が挙げられる。

[0136] 癌としては、例えば、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌などが挙げられ、好ましくは血液癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌または前立腺癌が挙げられる。

[0137] 血液癌としては、例えば、AML、未分化大細胞型リンパ腫（Anaplastic large cell lymphoma, ALCL）、急性リンパ性白血病（Acute lymphatic leukemia, ALL）、骨髓異形成症候群（myelodysplastic syndrome, MDS）その他リンパ性白血病、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫などが挙げられる。

[0138] 自己免疫疾患としては、例えば、関節リウマチ、乾癬、クローン病、強直性脊椎炎、多発性硬化症、I型糖尿病、肝炎、心筋炎、シェーグレン症候群、または移植後拒絶反応などが挙げられる。

[0139] アレルギー性疾患としては、例えば、急性若しくは慢性気道過敏症、気管支喘息、アトピー性皮膚炎、またはアレルギー性鼻炎などが挙げられる。

[0140] 本発明の治療剤としては、上述した本発明のモノクローナル抗体またはその断片を有効成分として含有する。

[0141] 本発明の抗体またはその断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の任意の方法により製造した医薬製剤として提供するのが望ましい。

[0142] 投与経路は、治療に際して最も効果的なものを使用するのが好ましく、例えば、経口投与、口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内または静脈内などの非経口投与が挙げられ、好ましくは静脈内投与が挙げられる。

[0143] 投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、またはテープ剤などが挙げられる。

。

- [0144] 投与量または投与回数は、目的とする治療効果、投与方法、治療期間、年齢、および体重などにより異なるが、通常成人1日当たり $10\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $20\text{mg}/\text{kg}$ である。
- [0145] さらに、本発明は、CD33の細胞外領域を特異的に認識し、かつ該細胞外領域に結合するモノクローナル抗体またはその断片を有効成分として含有する、CD33の免疫学的検出または測定方法、CD33の免疫学的検出用または測定用試薬、CD33が発現する細胞の免疫学的検出または測定方法、およびCD33陽性細胞が関与する疾患の診断剤に関する。
- [0146] 本発明においてCD33の量を検出または測定する方法としては、任意の公知の方法が挙げられる。例えば、免疫学的検出または測定方法などが挙げられる。
- [0147] 免疫学的検出または測定方法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または抗原量を検出または測定する方法である。免疫学的検出または測定方法としては、例えば、放射性物質標識免疫抗体法（RIA）、酵素免疫測定法（EIAまたはELISA）、蛍光免疫測定法（FIA）、発光免疫測定法（luminescent immunoassay）、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。
- [0148] 本発明のモノクローナル抗体またはその断片を用いてCD33が発現した細胞を検出または測定することにより、CD33に関連する疾患を診断することができる。
- [0149] 該ポリペプチドが発現している細胞の検出には、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、免疫沈降法、蛍光細胞染色法、免疫組織染色法、または免疫組織染色法などが、好ましく用いられる。また、FMAT8100 HTSシステム（アプライドバイオシステム社製）などの蛍光抗体染色法なども用いることができる。
- [0150] 本発明においてCD33を検出または測定する対象となる生体試料としては、例えば、組織細胞、骨髓細胞、骨髓液、血液、血漿、血清、唾液、尿、

糞便、組織液、または培養液など、CD33を発現した細胞を含む可能性のあるものであれば特に限定されない。

[0151] 本発明のモノクローナル抗体またはその断片を含有する診断剤は、目的の診断法に応じて、抗原抗体反応を行なうための試薬、該反応の検出用試薬を含んでもよい。抗原抗体反応を行なうための試薬としては、例えば、緩衝剤または塩などが挙げられる。検出用試薬としては、例えば、該モノクローナル抗体若しくはその断片を認識する標識された二次抗体、または標識に対応した基質などの通常の免疫学的検出若しくは測定法に用いられる試薬が挙げられる。

[0152] 以下に、本発明の抗体の製造方法、疾患の治療方法、および疾患の診断方法について、具体的に説明する。

[0153] 1. モノクローナル抗体の製造方法

(1) 抗原の調製

抗原となるCD33またはCD33を発現させた細胞は、CD33全長またはその部分長をコードするcDNAを含む発現ベクターを、大腸菌、酵母、昆虫細胞、または動物細胞などに導入することにより、得ることができる。また、CD33を多量に発現している各種ヒト腫瘍培養細胞、ヒト組織などからCD33を精製し、得ることが出来る。また、該腫瘍培養細胞、または該組織などをそのまま抗原として用いることもできる。さらに、Fmoc法、またはtBoc法などの化学合成法によりCD33の部分配列を有する合成ペプチドを調製し、抗原に用いることもできる。

[0154] 本発明で用いられるCD33は、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) またはCurrent Protocols In Molecular Biology, John Wiley & Sons (1987-1997) などに記載された方法などを用い、例えば、以下の方法により、該CD33をコードするDNAを宿主細胞中で発現させて、製造する

ことができる。

[0155] まず、CD33をコードする部分を含む完全長cDNAを適当な発現ベクターのプロモーターの下流に挿入することにより、組換えベクターを作製する。上記完全長cDNAの代わりに、完全長cDNAをもとにして調製された、ポリペプチドをコードする部分を含む適当な長さのDNA断片を用いてもよい。次に、得られた該組換えベクターを、該組換えベクターに適合した宿主細胞に導入することにより、ポリペプチドを生産する形質転換体を得ることができる。

[0156] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞における自律複製または染色体中への組込みが可能で、ポリペプチドをコードするDNAを転写できる位置に、適当なプロモーターを含有しているものであればいずれも用いることができる。

[0157] 宿主細胞としては、大腸菌などのエシェリヒア属などに属する微生物、酵母、昆虫細胞、または動物細胞など、目的とする遺伝子を発現できるものであればいずれも用いることができる。

[0158] 大腸菌などの原核生物を宿主細胞として用いる場合、組換えベクターは、原核生物中で自律複製が可能であると同時に、プロモーター、リボソーム結合配列、CD33をコードする部分を含むDNA、および転写終結配列を含むベクターであることが好ましい。また、該組換えベクターには、転写終結配列は必ずしも必要ではないが、構造遺伝子の直下に転写終結配列を配置することが好ましい。さらに、該組換えベクターには、プロモーターを制御する遺伝子を含んでいてもよい。

[0159] 該組換えベクターとしては、リボソーム結合配列であるシャイン・ダルガルノ配列（SD配列ともいう）と開始コドンとの間を適当な距離（例えば6～18塩基）に調節したプラスミドを用いることが好ましい。

[0160] また、該CD33をコードするDNAの塩基配列としては、宿主内での発現に最適なコドンとなるように塩基を置換することができ、これにより目的とするCD33の生産率を向上させることができる。

[0161] 発現ベクターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができる。例えば、pBTrp2、pBTac1、pBTac2（以上、ロシュ・ダイアグノスティックス社製）、pKK233-2（ファルマシア社製）、pSE280（インビトロジェン社製）、pGEMEX-1（プロメガ社製）、pQE-8（キアゲン社製）、pKYP10（日本国特開昭58-110600号公報）、pKYP200 [Agricultural Biological Chemistry, 48, 669 (1984)]、pLSA1 [Agric. Biol. Chem., 53, 277 (1989)]、pGEL1 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 4306 (1985)]、pBluescript II SK (-)（ストラタジーン社製）、pTrs30 [大腸菌JM109/pTrs30 (FERM BP-5407) より調製]、pTrs32 [大腸菌JM109/pTrs32 (FERM BP-5408) より調製]、pGHA2 [大腸菌IGHA2 (FERM BP-400) より調製、日本国特開昭60-221091号公報]、pGKA2 [大腸菌IGKA2 (FERM BP-6798) より調製、日本国特開昭60-221091号公報]、pTerm2（米国特許第4686191号明細書、米国特許第4939094号明細書、米国特許第5160735号明細書）、pSupex、pUB110、pTP5、pC194、pEG400 [J. Bacteriol., 172, 2392 (1990)]、pGEX（ファルマシア社製）、pETシステム（ノバジェン社製）、またはpME18SFL3などが挙げられる。

[0162] プロモーターとしては、使用する宿主細胞中で機能を発揮できるものであればいかなるものでもよい。例えば、trpプロモーター (Ptrp)、lacプロモーター、PLプロモーター、PRプロモーター、またはT7プロモーターなどの、大腸菌やファージなどに由来するプロモーターを挙げることができる。また、例えば、Ptrpを2つ直列させたタンデムプロモーター、tacプロモーター、lacT7プロモーター、またはletIプロ

モーターなどの人為的に設計改変されたプロモーターなども用いることができる。

[0163] 宿主細胞としては、例えば、大腸菌XL1-Blue、大腸菌XL2-Blue、大腸菌DH1、大腸菌MC1000、大腸菌KY3276、大腸菌W1485、大腸菌JM109、大腸菌HB101、大腸菌No. 49、大腸菌W3110、大腸菌NY49、または大腸菌DH5 α などが挙げられる。

[0164] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、使用する宿主細胞へDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、カルシウムイオンを用いる方法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2110 (1972)、Gene, 17, 107 (1982)、Molecular & General Genetics, 168, 111 (1979)] が挙げられる。

[0165] 動物細胞を宿主として用いる場合、発現ベクターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができる。例えば、pcDNA1、pcDM8（フナコシ社製）、pAGE107 [日本国特開平3-22979号公報; Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、pAS3-3（日本国特開平2-227075号公報）、pCDM8 [Nature, 329, 840 (1987)]、pcDNA1/Amp（インビトロジェン社製）、pcDNA3.1（インビトロジェン社製）、pREP4（インビトロジェン社製）、pAGE103 [J. Biochemistry, 101, 1307 (1987)]、pAGE210、pME18SFL3、またはpKANTEX93（国際公開第97/10354号公報）などが挙げられる。

[0166] プロモーターとしては、動物細胞中で機能を発揮できるものであればいずれも用いることができる。例えば、サイトメガロウイルス（CMV）のimmediate early（IE）遺伝子のプロモーター、SV40の初期プロモーター、レトロウイルスのプロモーター、メタロチオネインプロモ

ーター、ヒートショックプロモーター、SR α プロモーター、またはモロニーマウス白血病ウイルスのプロモーターまたはエンハンサーが挙げられる。また、ヒトCMVのIE遺伝子のエンハンサーをプロモーターと共に用いてもよい。

[0167] 宿主細胞としては、例えば、ヒト白血病細胞Namalwa細胞、サル細胞COS細胞、チャイニーズ・ハムスター卵巣細胞CHO細胞 (Journal of Experimental Medicine, 108, 945 (1958); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 60, 1275 (1968); Genetics, 55, 513 (1968); Chromosoma, 41, 129 (1973); Methods in Cell Science, 18, 115 (1996); Radiation Research, 148, 260 (1997); Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980); Proc. Natl. Acad. Sci., 60, 1275 (1968); Cell, 6, 121 (1975); Molecular Cell Genetics, Appendix I, 11 (pp. 883-900);)、CHO/DG44、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DUKXB11 (ATCC CCL-9096)、Pro-5 (ATCC CCL-1781)、CHO-S (Life Technologies, Cat # 11619)、Pro-3、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (またはYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞NSO、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14、シリアンハムスター細胞BHKまたはHBT5637 (日本国特開昭63-000299号公報)、などが挙げられる。

[0168] 宿主細胞への組換えベクターの導入方法としては、動物細胞にDNAを導入する方法であればいずれも用いることができ、例えば、エレクトロポレーション法 [Cytotechnology, 3, 133 (1990)]、リン酸カルシウム法 (日本国特開平2-227075号公報)、またはリポフ

エクシオン法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] などが挙げられる。

[0169] 以上のようにして得られるCD33をコードするDNAを組み込んだ組換えベクターを保有する微生物、または動物細胞などに由来する形質転換体を培地に培養し、培養物中に該CD33を生成蓄積させ、該培養物から採取することにより、CD33を製造することができる。該形質転換体を培地に培養する方法は、宿主の培養に用いられる通常の方法に従って行うことができる。

[0170] 真核生物由来の細胞で発現させた場合には、糖または糖鎖が付加されたCD33を得ることができる。

[0171] 誘導性のプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養するときには、必要に応じてインデューサーを培地に添加してもよい。例えば、lacプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはイソプロピルーβ-D-チオガラクトピラノシドなどを、trpプロモーターを用いた組換えベクターで形質転換した微生物を培養する場合にはインドールアクリル酸などを培地に添加してもよい。

[0172] 動物細胞を宿主として得られた形質転換体を培養する培地としては、例えば、一般に使用されているRPMI 1640培地 [The Journal of the American Medical Association, 199, 519 (1967)]、EagleのMEM培地 [Science, 122, 501 (1952)]、ダルベッコ改変MEM培地 [Virology, 8, 396 (1959)]、199培地 [Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73, 1 (1950)]、Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM) 培地、またはこれら培地に牛胎児血清 (FBS) などを添加した培地などが挙げられる。培養は、通常pH6~8、30~40℃、5%CO₂存在下などの条件下で1~7日間行う。また、培養中必要に応じて、カナマイシン、ペニシリンなどの抗生物質を培地に添加してもよい。

- [0173] CD33をコードする遺伝子の発現方法としては、例えば、直接発現以外に、分泌生産または融合蛋白質発現などの方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] が挙げられる。
- [0174] CD33の生産方法としては、例えば、宿主細胞内に生産させる方法、宿主細胞外に分泌させる方法、または宿主細胞外膜上に生産させる方法が挙げられ、使用する宿主細胞や、生産させるCD33の構造を変えることにより、適切な方法を選択することができる。
- [0175] CD33が宿主細胞内又は宿主細胞外膜上に生産される場合、ポールソンの方法 [J. Biol. Chem., 264, 17619 (1989)]、ロウらの方法 [Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86, 8227 (1989)、Genes Develop., 4, 1288 (1990)]、日本国特開平05-336963号公報、または国際公開第94/23021号公報などに記載の方法を用いることにより、CD33を宿主細胞外に積極的に分泌させることができる。
- [0176] また、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子などを用いた遺伝子増幅系（日本国特開平2-227075号公報）を利用してCD33の生産量を上昇させることもできる。
- [0177] 得られたCD33は、例えば、以下のようにして単離、精製することができる。
- [0178] CD33が細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後に細胞を遠心分離により回収し、水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機、フレンチプレス、マントンガウリンホモゲナイザー、またはダイノミルなどを用いて細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られる上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫酸などによる塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル（DEAE）セファロース、DIAION HPA-75（三菱化学社製）な

どのレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF（ファルマシア社製）などのレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロースなどのレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィー法、クロマトフォーカシング法、または等電点電気泳動などの電気泳動法などの手法を単独または組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

[0179] CD33が細胞内に不溶体を形成して発現した場合は、上記と同様に細胞を回収後破碎し、遠心分離を行うことにより、沈殿画分として該CD33の不溶体を回収する。回収した該CD33の不溶体を蛋白質変性剤で可溶化する。該可溶化液を希釈または透析することにより、該CD33を正常な立体構造に戻した後、上記と同様の単離精製法によりポリペプチドの精製標品を得ることができる。

[0180] CD33またはその糖修飾体などの誘導体が細胞外に分泌された場合には、培養上清において該CD33またはその糖修飾体などの誘導体を回収することができる。該培養物を上記と同様に遠心分離などの手法により処理することにより可溶性画分を取得し、該可溶性画分から、上記と同様の単離精製法を用いることにより、精製標品を得ることができる。

[0181] CD33に適当なペプチドを付加する事により容易に精製が可能となる。例えば、イムノグロブリンのFc領域をCD33に付加する事により、細胞外に分泌されたCD33-Fc融合タンパク質をプロテインAまたはプロテインGなどを用いることにより、精製標品を得ることが出来る。

[0182] また、本発明において用いられるCD33は、Fmoc法、またはtBoc法などの化学合成法によっても製造することができる。また、アドバンストケムテック社製、パーキン・エルマー社製、ファルマシア社製、プロテインテクノロジーインストルメント社製、シンセセルーベガ社製、パーセプチブ社製、または島津製作所社製などのペプチド合成機を利用して化学合成することもできる。

[0183] (2) 動物の免疫と融合用抗体産生細胞の調製

3～20週令のマウス、ラットまたはハムスターなどの動物に、(1)で得られる抗原を免疫して、その動物の脾、リンパ節、末梢血中の抗体産生細胞を採取する。また、免疫原性が低く上記の動物で十分な抗体価の上昇が認められない場合には、CD33ノックアウトマウスを被免疫動物として用いることもできる。

[0184] 免疫は、動物の皮下、静脈内または腹腔内に、例えば、フロイン드의完全アジュバント、または水酸化アルミニウムゲルと百日咳菌ワクチンなどの適当なアジュバントとともに抗原を投与することにより行う。抗原が部分ペプチドである場合には、BSA（ウシ血清アルブミン）、またはKLH（Keyhole Limpet hemocyanin）などのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製し、これを免疫原として用いる。

[0185] 抗原の投与は、1回目の投与の後、1～2週間おきに5～10回行う。各投与後3～7日目に眼底静脈叢より採血し、その血清の抗体価を酵素免疫測定法 [Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] などを用いて測定する。免疫に用いた抗原に対し、その血清が十分な抗体価を示した動物を融合用抗体産生細胞の供給源とする。

[0186] 抗原の最終投与後3～7日目に、免疫した動物より脾臓などの抗体産生細胞を含む組織を摘出し、抗体産生細胞を採取する。脾臓細胞を用いる場合には、脾臓を細断、ほぐした後、遠心分離し、さらに赤血球を除去して融合用抗体産生細胞を取得する。

[0187] (3) 骨髓腫細胞の調製

骨髓腫細胞としては、マウスから得られた株化細胞を用いる。例えば、8-アザグアニン耐性マウス（BALB/c由来）骨髓腫細胞株P3-X63Ag8-U1（P3-U1）[Current Topics in Microbiology and Immunology, 18, 1 (1978)]、P3-NS1/1-Ag41（NS-1）[European J

. Immunology, 6, 511 (1976)]、SP2/O-Ag14 (SP-2) [Nature, 276, 269 (1978)]、P3-X63-Ag8653 (653) [J. Immunology, 123, 1548 (1979)]、またはP3-X63-Ag8 (X63) [Nature, 256, 495 (1975)]などが挙げられる。

[0188] 該骨髓腫細胞は、正常培地〔グルタミン、2-メルカプトエタノール、ジェンタマイシン、FBS、および8-アザグアニンを加えたRPMI 1640培地〕で継代し、細胞融合の3～4日前に正常培地に継代し、融合当日 2×10^7 個以上の細胞数を確保する。

[0189] (4) 細胞融合とモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

(2) で得られる融合用抗体産生細胞と(3) で得られる骨髓腫細胞をMinimum Essential Medium (MEM) 培地またはPBS (リン酸二ナトリウム1.83g、リン酸一カリウム0.21g、食塩7.65g、蒸留水1リットル、pH7.2) でよく洗浄し、細胞数が、融合用抗体産生細胞：骨髓腫細胞=5～10：1になるよう混合し、遠心分離した後、上清を除く。

[0190] 沈澱した細胞群をよくほぐした後、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000)、MEM培地およびジメチルスルホキシドの混液を37℃で、攪拌しながら加える。さらに1～2分間毎にMEM培地1～2mLを数回加えた後、MEM培地を加えて全量が50mLになるようにする。遠心分離後、上清を除く。沈澱した細胞群をゆるやかにほぐした後、融合用抗体産生細胞をHAT培地〔ヒポキサンチン、チミジン、およびアミノプテリンを加えた正常培地〕中にゆるやかに懸濁する。この懸濁液を5%CO₂インキュベーター中、37℃で7～14日間培養する。

[0191] 培養後、培養上清の一部を抜き取り、後述のバインディングアッセイなどのハイブリドーマの選択方法により、CD33を含む抗原に反応し、CD33を含まない抗原に反応しない細胞群を選択する。次に、限界希釈法によりクローニングを2回繰り返し〔1回目はHT培地 (HAT培地からアミノプ

テリンを除いた培地)、2回目は正常培地を使用する]、安定して強い抗体価の認められたものをモノクローナル抗体産生ハイブリドーマとして選択する。

[0192] (5) 精製モノクローナル抗体の調製

プリスタン処理 [2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン (Pristan) 0.5 ml を腹腔内投与し、2週間飼育する] した8~10週令のマウスまたはヌードマウスに、(4) で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを腹腔内に注射する。10~21日でハイブリドーマは腹水癌化する。このマウスから腹水を採取し、遠心分離して固形分を除去後、40~50%硫酸アンモニウムで塩析し、カプリル酸沈殿法、DEAE-セファロースカラム、プロテインA-カラムまたはゲル濾過カラムによる精製を行ない、IgGまたはIgM画分を集め、精製モノクローナル抗体とする。

[0193] また、(4) で得られるモノクローナル抗体産生ハイブリドーマを、10% FBS 添加を添加したRPMI 1640培地などで培養した後、遠心分離により上清を除き、Hybridoma SFM培地に懸濁し、3~7日間培養する。得られた細胞懸濁液を遠心分離し、得られた上清よりプロテインA-カラムまたはプロテインG-カラムによる精製を行ない、IgG画分を集め、精製モノクローナル抗体を得ることもできる。なお、Hybridoma SFM培地には5%ダイゴGF21を添加することもできる。

[0194] 抗体のサブクラスの決定は、サブクラスタイピングキットを用いて酵素免疫測定法により行う。蛋白量の定量は、ローリー法または280nmでの吸光度より算出する。

[0195] (6) モノクローナル抗体の選択

モノクローナル抗体の選択は以下に示す酵素免疫測定法によるバインディングアッセイ、およびBiacoreによるkinetics解析により行う。

[0196] (6-a) バインディングアッセイ

抗原としては、例えば、(1)で得られるCD33をコードするcDNAを含む発現ベクターを大腸菌、酵母、昆虫細胞若しくは動物細胞などに導入して得られた遺伝子導入細胞、リコンビナント蛋白質、またはヒト組織から得た精製ポリペプチド若しくは部分ペプチドなどが挙げられる。抗原が部分ペプチドである場合には、BSAまたはKLHなどのキャリア蛋白質とコンジュゲートを作製して、これを用いる。

[0197] 抗原を96ウェルプレートなどのプレートに分注し、固相化した後、第1抗体として血清、ハイブリドーマの培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を分注し、反応させる。PBSまたはPBS-Tweenなどで、よく洗浄した後、第2抗体としてビオチン、酵素、化学発光物質または放射線化合物などで標識した抗イムノグロブリン抗体を分注して反応させる。PBS-Tweenでよく洗浄した後、第2抗体の標識物質に応じた反応を行ない、免疫原に対し特異的に反応するモノクローナル抗体を選択する。

[0198] また、本発明の抗CD33モノクローナル抗体と競合してCD33に結合するモノクローナル抗体は、上述のバインディングアッセイ系に、被検抗体を添加して反応させることで取得できる。すなわち、被検抗体を加えた時にモノクローナル抗体の結合が阻害される抗体をスクリーニングすることにより、CD33細胞外領域への結合について、取得したモノクローナル抗体と競合するモノクローナル抗体を取得することができる。

[0199] 更に、本発明のCD33の細胞外領域に結合するモノクローナル抗体が認識して、結合するエピトープと、同じエピトープに結合する抗体は、上述のバインディングアッセイ系で取得された抗体のエピトープを同定し、同定したエピトープの、部分的な合成ペプチド、またはエピトープの立体構造に擬態させた合成ペプチド等を作製し、免疫することで、取得することができる。

[0200] (6-b) Biacoreによるkinetics解析

Biacore T100を用い、抗原と被験物の間の結合におけるk_i

n e t i c s を測定し、その結果を機器付属の解析ソフトウェアで解析をする。抗マウス I g G 抗体をセンサーチップ C M 5 にアミンカップリング法により固定した後、ハイブリドーマ培養上清または精製モノクローナル抗体などの被験物質を流し、適当量結合させ、更に濃度既知の複数濃度の抗原を流し、結合、解離を測定する。得られたデータを機器付属のソフトウェアを用い、1 : 1 バインディングモデルにより k i n e t i c s 解析を行い、各種パラメータを取得する。

[0201] または、ヒト C D 3 3 をセンサーチップ上に、例えばアミンカップリング法により固定した後、濃度既知の複数濃度の精製モノクローナル抗体を流し、結合、解離を測定する。得られたデータを機器付属のソフトウェアを用い、バイバレントバインディングモデルにより k i n e t i c s 解析を行い、各種パラメータを取得する。

[0202] 2. 遺伝子組換え抗体の作製

遺伝子組換え抗体の作製例として、以下にヒト型キメラ抗体およびヒト型 C D R 移植抗体の作製方法を示す。

(1) 遺伝子組換え抗体発現用ベクターの構築

遺伝子組換え抗体発現用ベクターは、ヒト抗体の C H および C L をコードする D N A が組み込まれた動物細胞用発現ベクターであり、動物細胞用発現ベクターにヒト抗体の C H および C L をコードする D N A をそれぞれクローニングすることにより構築することができる。

[0203] ヒト抗体の C 領域は任意のヒト抗体の C H および C L を用いることができる。例えば、ヒト抗体の γ 1 サブクラスの C H および κ クラスの C L などを用いる。ヒト抗体の C H および C L をコードする D N A には、c D N A を用いるが、エキソンとイントロンからなる染色体 D N A を用いることもできる。動物細胞用発現ベクターには、ヒト抗体の C 領域をコードする遺伝子を組み込み発現できるものであればいかなるものでも用いることができる。

[0204] 例えば、p A G E 1 0 7 [C y t o t e c h n o l . , 3 , 1 3 3 (1 9 9 0)] 、 p A G E 1 0 3 [J . B i o c h e m . , 1 0 1 , 1 3 0 7 (1

987)]、pHSG274 [Gene, 27, 223 (1984)]、pKCR [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78, 1527 (1981)]、pSG1bd2-4 [Cytotechnol., 4, 173 (1990)]、またはpSE1UK1Sed1-3 [Cytotechnol., 13, 79 (1993)]などが挙げられる。

[0205] 動物細胞用発現ベクターのうちプロモーターとエンハンサーとしては、例えば、SV40の初期プロモーター [J. Biochem., 101, 1307 (1987)]、モロニー Maus 白血病ウイルスLTR [Biochem. Biophys. Res. Commun., 149, 960 (1987)]、または免疫グロブリンH鎖のプロモーター [Cell, 41, 479 (1985)]とエンハンサー [Cell, 33, 717 (1983)]などが挙げられる。

[0206] 遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、遺伝子組換え抗体発現ベクターの構築の容易さ、動物細胞への導入の容易さ、動物細胞内での抗体H鎖およびL鎖の発現量のバランスが均衡するなどの点から、抗体H鎖およびL鎖が同一のベクター上に存在するタイプ（タンデム型）の遺伝子組換え抗体発現用ベクター [J. Immunol. Methods, 167, 271 (1994)]を用いるが、抗体H鎖およびL鎖が別々のベクター上に存在するタイプを用いることもできる。タンデム型の遺伝子組換え抗体発現用ベクターには、pKANTEX93（国際公開第97/10354号）、pEE18 [Hybridoma, 17, 559 (1998)]などを用いる。

[0207] (2) ヒト以外の動物由来の抗体のV領域をコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析

非ヒト抗体のVH及びVLをコードするcDNAの取得およびアミノ酸配列の解析は以下のようにして行うことができる。

[0208] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞よりmRNAを抽出し、cDNAを合成する。合成したcDNAをファージまたはプラスミドなどのベクターにクローニングしてcDNAライブラリーを作製する。該ライブラリーよ

り、マウス抗体のC領域部分またはV領域部分をコードするDNAをプローブとして用い、VHまたはVLをコードするcDNAを有する組換えファージまたは組換えプラスミドをそれぞれ単離する。組換えファージまたは組換えプラスミド上の目的とするマウス抗体のVHまたはVLの全塩基配列をそれぞれ決定し、塩基配列よりVHまたはVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定する。

[0209] 非ヒト抗体を産生するハイブリドーマ細胞を作製するヒト以外の動物には、マウス、ラット、ハムスター、またはラビットなどを用いるが、ハイブリドーマ細胞を作製することが可能であれば、いかなる動物も用いることができる。

[0210] ハイブリドーマ細胞からの全RNAの調製には、チオシアン酸グアニジントリフルオロ酢酸セシウム法 [Methods in Enzymol., 154, 3 (1987)]、またはRNA easy kit (キアゲン社製)などのキットなどを用いる。

[0211] 全RNAからのmRNAの調製には、オリゴ(dT)固定化セルロースカラム法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)]、またはOligo-dT30<Super> mRNA Purification Kit (タカラバイオ社製)などのキットなどを用いる。また、Fast Track mRNA Isolation Kit (インビトロジェン社製)、またはQuickPrep mRNA Purification Kit (ファルマシア社製)などのキットを用いてハイブリドーマ細胞からmRNAを調製することもできる。

[0212] cDNAの合成およびcDNAライブラリーの作製には、公知の方法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current

Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)]、またはSuperScript Plasmid System for cDNA Synthesis and Plasmid Cloning (インビトロジェン社製)、またはZAP-cDNA Synthesis Kit (ストラタジーン社製)などのキットなどを用いる。

[0213] cDNAライブラリーの作製の際、ハイブリドーマ細胞から抽出したmRNAを鋳型として合成したcDNAを組み込むベクターには、該cDNAを組み込めるベクターであればいかなるものでも用いることができる。例えば、ZAP Express [Strategies, 5, 58 (1992)]、pBluescript II SK (+) [Nucleic Acids Research, 17, 9494 (1989)]、λZAPII (Stratagene社製)、λgt10、λgt11 [DNA Cloning: A Practical Approach, 1, 49 (1985)]、Lambda BlueMid (クローンテック社製)、λExCell、pT7T3-18U (ファルマシア社製)、pcD2 [Mol. Cell. Biol., 3, 280 (1983)]、またはpUC18 [Gene, 33, 103 (1985)]などが挙げられる。

[0214] ファージまたはプラスミドベクターにより構築されるcDNAライブラリーを導入する大腸菌には、該cDNAライブラリーを導入、発現および維持できるものであればいかなるものでも用いることができる。例えば、XL1-Blue MRF' [Strategies, 5, 81 (1992)]、C600 [Genetics, 39, 440 (1954)]、Y1088、Y1090 [Science, 222, 778 (1983)]、NM522 [J. Mol. Biol., 166, 1 (1983)]、K802 [J. Mol. Biol., 16, 118 (1966)]、またはJM105 [Gene, 38, 275 (1985)]などが挙げられる。

[0215] cDNAライブラリーからの非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするc

DNAクローンを選択する方法としては、例えば、アイソトープ若しくは蛍光標識したプローブを用いたコロニー・ハイブリダイゼーション法、またはプラーク・ハイブリダイゼーション法 [Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)] などが挙げられる。

[0216] また、プライマーを調製し、mRNAから合成したcDNAまたはcDNAライブラリーを鋳型として、Polymerase Chain Reaction法 [以下、PCR法と表記する、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)、Current Protocols in Molecular Biology, Supplement 1, John Wiley & Sons (1987-1997)] を行うことよりVHまたはVLをコードするcDNAを調製することもできる。

[0217] 選択されたcDNAを、適当な制限酵素などで切断後、pBluescript SK (-) (ストラタジーン社製) などのプラスミドにクローニングし、通常用いられる塩基配列解析方法などにより該cDNAの塩基配列を決定する。塩基配列解析方法には、例えば、ジデオキシ法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463 (1977)] などの反応を行った後、ABI PRISM3700 (PEバイオシステムズ社製) またはA. L. F. DNAシーケンサー (ファルマシア社製) などの塩基配列自動分析装置などを用いる。

[0218] 決定した塩基配列からVHおよびVLの全アミノ酸配列をそれぞれ推定し、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することにより、取得したcDNAが分泌シグナ

ル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列をコードしているかをそれぞれ確認する。

[0219] 分泌シグナル配列を含む抗体のVHおよびVLの完全なアミノ酸配列に関しては、既知の抗体のVHおよびVLの全アミノ酸配列 [Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することにより、分泌シグナル配列の長さおよびN末端アミノ酸配列を推定でき、更にはそれらが属するサブグループを知ることができる。

[0220] また、VHおよびVLの各CDRのアミノ酸配列についても、既知の抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] と比較することによって見出すことができる。

[0221] また、得られたVHおよびVLの完全なアミノ酸配列を用いて、例えば、SWISS-PROTまたはPIR-Proteinなどの任意のデータベースに対してBLAST法 [J. Mol. Biol., 215, 403 (1990)] などの相同性検索を行い、VHおよびVLの完全なアミノ酸配列が新規なものかを確認できる。

[0222] (3) V領域にN結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を有さない遺伝子組換え抗体の作製

V領域に、N結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列 (Asn-Xaa-Ser/Thr) を有さない抗体 (改変型抗体) のV領域は、N結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列のAsn残基および/またはSer残基/Thr残基を他のアミノ酸残基に置換することにより、作製することができる。

[0223] 抗体のV領域、特にCDRは、抗体の抗原への結合性を規定する重要な領域である。従って、抗体のV領域、特にCDRにおける、任意のアミノ酸残基への置換は、抗体の抗原への結合性が変化してしまう可能性がある。従っ

て、上記コンセンサス配列を有さないV領域を作製する際には、抗体の抗原への結合性が変化しないアミノ酸配列に改変する必要がある。その具体的な方法を以下に示す。

[0224] V領域のN結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列中のA s n残基、並びにS e r残基またはT h r残基を抗体の抗原への結合性が変化しないアミノ酸配列に改変するためには、抗原への結合性に影響を与える可能性の少ないアミノ酸残基の予測が重要である。そのため、X線結晶構造解析 [J. M o l. B i o l., 112, 535 (1977)] またはコンピューターモデリング [P r o t e i n E n g i n e e r i n g, 7, 1501 (1994)] 等による抗体の立体構造の構築および解析を行う。

[0225] しかしながら、これら抗体の立体構造の情報に基づいても、抗体のV領域、特にC D Rへの変異の導入は、抗体の抗原への結合性を変化させる可能性がある。そのため、変異の導入に際しては、数種の改変体を作製し、アミノ酸の改変との抗原結合活性との相関を検討する等の、試行錯誤が必要である。

[0226] このようにして、抗体の抗原への結合性に影響を与える可能性の少ないアミノ酸残基の部位特異的変異を推定した後、変異が導入された抗体V領域のアミノ酸配列をコードするD N A配列を設計する。設計したD N A配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成D N Aを合成し、それらを用いてP C R反応を行う。この場合、P C R反応での反応効率及び合成可能なD N Aの長さから、好ましくはH鎖、L鎖とも6本の合成D N Aを設計する。

[0227] または、変異を導入する基となった抗体のV領域をコードするc D N Aにクンケル法などの公知の部位特異的変異導入法 [M o l e c u l a r C l o n i n g, A L a b o r a t o r y M a n u a l, S e c o n d E d i t i o n, C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y P r e s s (1989)] を用いたり、変異を導入する基となった抗体のV領域をコードするc D N A中に存在する制限酵素認識部位を利用して

、N結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を含む部分のアミノ酸配列をコードするDNAに、PCR等で変異を導入し、変異を導入する基となった抗体のV領域をコードするcDNAと置換して、設計したDNA配列を有するcDNAを含むプラスミドを作製することもできる。

[0228] V領域のアミノ酸残基は、上記のようにして得られた遺伝子組換え抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するcDNAを含むプラスミドの塩基配列を上記(2)に記載の方法により決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

[0229] (4) ヒト型キメラ抗体発現ベクターの構築

(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流に、非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングすることで、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築することができる。

[0230] 非ヒト抗体のVHまたはVLをコードするcDNAの3'末端側と、ヒト抗体のCHまたはCLの5'末端側とを連結するために、連結部分の塩基配列が適切なアミノ酸をコードし、かつ適当な制限酵素認識配列になるように設計したVHおよびVLのcDNAを作製する。作製されたVHおよびVLのcDNAを、(1) で得られるヒト型CDR移植抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子の上流にそれらが適切な形で発現する様にそれぞれクローニングし、ヒト型キメラ抗体発現ベクターを構築する。

[0231] また、非ヒト抗体VHまたはVLをコードするcDNAを、適当な制限酵素の認識配列を両端に有する合成DNAを用いてPCR法によりそれぞれ増幅し、(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターにクローニングすることもできる。

[0232] (5) ヒト型CDR移植抗体のV領域をコードするcDNAの構築

ヒト型CDR移植抗体のVHまたはVLをコードするcDNAは、以下のようにして構築することができる。

[0233] 非ヒト抗体のVHまたはVLのCDRのアミノ酸配列を移植するヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列をそれぞれ選択する。選択するFRのアミノ酸配列には、ヒト抗体由来のものであれば、いずれのものでも用いることができる。例えば、Protein Data Bankなどのデータベースに登録されているヒト抗体のFRのアミノ酸配列、またはヒト抗体のFRの各サブグループの共通アミノ酸配列 [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] などを用いる。抗体の結合活性の低下を抑えるため、元の抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列とできるだけ高い相同性（少なくとも60%以上）のFRのアミノ酸配列を選択する。

[0234] 次に、選択したヒト抗体のVHまたはVLのFRのアミノ酸配列に、もとの抗体のCDRのアミノ酸配列をそれぞれ移植し、ヒト型CDR移植抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をそれぞれ設計する。設計したアミノ酸配列を抗体の遺伝子の塩基配列に見られるコドンの使用頻度 [Sequence of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] を考慮してDNA配列に変換し、ヒト型CDR移植抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列をそれぞれ設計する。

[0235] 設計したDNA配列に基づき、100塩基前後の長さからなる数本の合成DNAを合成し、それらを用いてPCR反応を行う。この場合、PCR反応での反応効率及び合成可能なDNAの長さから、好ましくはH鎖、L鎖とも6本の合成DNAを設計する。

[0236] また、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1)で得られるヒト型CDR移植抗体発現用ベクターに容易にヒト型CDR移植抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをクローニングすることができる。

[0237] または、設計したDNA配列に基づき、1本のDNAとして合成された各H鎖、L鎖全長合成DNAを用いることで実施できる。

[0238] PCR反応後、増幅産物をpBluescript SK(−) (ストラタジーン社製)などのプラスミドにそれぞれクローニングし、(2)に記載の方法と同様の方法により、塩基配列を決定し、所望のヒト型CDR移植抗体のVHまたはVLのアミノ酸配列をコードするDNA配列を有するプラスミドを取得する。

[0239] (6) ヒト型CDR移植抗体のV領域のアミノ酸配列の改変

ヒト型CDR移植抗体は、非ヒト抗体のVHおよびVLのCDRのみをヒト抗体のVHおよびVLのFRに移植しただけでは、その抗原結合活性は元の非ヒト抗体に比べて低下する[BIO/TECHNOLOGY, 9, 266(1991)]。ヒト型CDR移植抗体では、ヒト抗体のVHおよびVLのFRのアミノ酸配列の中で、直接抗原との結合に関与しているアミノ酸残基、CDRのアミノ酸残基と相互作用するアミノ酸残基、および抗体の立体構造を維持し、間接的に抗原との結合に関与しているアミノ酸残基を同定し、それらのアミノ酸残基を元の非ヒト抗体のアミノ酸残基に置換することにより、低下した抗原結合活性を上昇させることができる。

[0240] 抗原結合活性に関わるFRのアミノ酸残基を同定するために、X線結晶解析[J. Mol. Biol., 112, 535(1977)]またはコンピューターモデリング[Protein Engineering, 7, 1501(1994)]などを用いることにより、抗体の立体構造の構築および解析を行うことができる。また、それぞれの抗体について数種の改変体を作製し、それぞれの抗原結合活性との相関を検討することを繰り返し、試行錯誤することで必要な抗原結合活性を有する改変型ヒト型CDR移植抗体を取得できる。

[0241] ヒト抗体のVH及びVLのFRのアミノ酸残基は、改変用合成DNAを用いて(4)に記載のPCR反応を行うことにより、改変させることができる。PCR反応後の増幅産物について(2)に記載の方法により、塩基配列を

決定し、目的の改変が施されたことを確認する。

[0242] (7) ヒト型CDR移植抗体発現ベクターの構築

(1) で得られる遺伝子組換え抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子上流に、構築した遺伝子組換え抗体のVHまたはVLをコードするcDNAをそれぞれクローニングし、ヒト型CDR移植抗体発現ベクターを構築することができる。

[0243] 例えば、(4) および(5) で得られるヒト型CDR移植抗体のVHまたはVLを構築する際に用いる合成DNAのうち、両端に位置する合成DNAの5'末端に適当な制限酵素の認識配列を導入することで、(1) で得られるヒト型CDR移植抗体発現用ベクターのヒト抗体のCHまたはCLをコードするそれぞれの遺伝子上流にそれらが適切な形で発現するようにそれぞれクローニングする。

[0244] (8) 遺伝子組換え抗体の一過性発現

(3) および(6) で得られる遺伝子組換え抗体発現ベクター、またはそれらを改変した発現ベクターを用いて遺伝子組換え抗体の一過性発現を行い、作製した多種類のヒト型CDR移植抗体の抗原結合活性を効率的に評価することができる。

[0245] 発現ベクターを導入する宿主細胞としては、遺伝子組換え抗体を発現できる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができるが、例えば、COS-7細胞 [American Type Culture Collection (ATCC) 番号: CRL 1651] が挙げられる [Methods in Nucleic Acids Res., CRC press, 283 (1991)]。

[0246] COS-7細胞への発現ベクターの導入には、DEAE-デキストラン法 [Methods in Nucleic Acids Res., CRC press (1991)]、またはリポフェクション法 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 7413 (1987)] などを用いる。

[0247] 発現ベクターの導入後、培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性は酵素免疫抗体法 [Monoclonal Antibodies—Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] などを用いて測定する。

[0248] (9) 遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株の取得と遺伝子組換え抗体の調製

(3) および (6) で得られた遺伝子組換え抗体発現ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株を得ることができる。

[0249] 宿主細胞への発現ベクターの導入には、エレクトロポレーション法 [日本特開平2-257891号公報、Cytotechnology, 3, 133 (1990)] などを用いる。

[0250] 遺伝子組換え抗体発現ベクターを導入する宿主細胞には、遺伝子組換え抗体を発現させることができる宿主細胞であれば、いかなる細胞でも用いることができる。例えば、CHO-K1 (ATCC CCL-61)、DUKXB11 (ATCC CCL-9096)、Pro-5 (ATCC CCL-1781)、CHO-S (Life Technologies, Cat # 11619)、ラットミエローマ細胞YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20 (またはYB2/0ともいう)、マウスミエローマ細胞NSO、マウスミエローマ細胞SP2/0-Ag14 (ATCC番号:CRL1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞 (ATCC番号:CRL1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子 (以下、dhfrと表記する) が欠損したCHO細胞 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77, 4216 (1980)]、レクチン耐性を獲得したLec13 [Som

atic Cell and Molecular genetics, 12, 55 (1986)]、 α 1, 6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞（国際公開第2005/035586号、国際公開第02/31140号）、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞（ATCC番号：CRL1662）などが挙げられる。

[0251] また、例えば、細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースの合成に関与する酵素などの蛋白質、N-グリコシド結合複合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位が α 結合する糖鎖修飾に関与する酵素などの蛋白質、または細胞内糖ヌクレオチドGDP-フコースのゴルジ体への輸送に関与する蛋白質などの活性が低下または欠失した宿主細胞、例えば α 1, 6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞（国際公開第2005/035586号、国際公開第02/31140号）などが挙げられる。

[0252] 発現ベクターの導入後、遺伝子組換え抗体を安定に発現する形質転換株は、G418硫酸塩（以下、G418と表記する）などの薬剤を含む動物細胞培養用培地で培養することにより選択する（日本国特開平2-257891号公報）。

[0253] 動物細胞培養用培地としては、例えば、RPMI1640培地（インビトロジェン社製）、GIT培地（日本製薬社製）、EX-CELL301培地（ジェイアールエイチ社製）、IMDM培地（インビトロジェン社製）、Hybridoma-SFM培地（インビトロジェン社製）、またはこれら培地にFBSなどの各種添加物を添加した培地などが挙げられる。得られた形質転換株を培地中で培養することで培養上清中に遺伝子組換え抗体を発現蓄積させる。培養上清中の遺伝子組換え抗体の発現量および抗原結合活性はELISA法などにより測定できる。また、形質転換株は、DHFR増幅系（日本国特開平2-257891号公報）などを利用して遺伝子組換え抗体の発現量を上昇させることができる。

[0254] 遺伝子組換え抗体は、形質転換株の培養上清よりプロテインA-カラムを

用いて精製する [Monoclonal Antibodies—Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]。また、ゲル濾過、イオン交換クロマトグラフィーおよび限外濾過などの蛋白質の精製で用いられる方法を組み合わせることもできる。

[0255] 精製した遺伝子組換え抗体のH鎖、L鎖或いは抗体分子全体の分子量は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 [Nature, 227, 680 (1970)]、またはウェスタンブロッティング法 [Monoclonal Antibodies—Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、Antibodies—A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)] など用いて測定することができる。

[0256] 3. 精製モノクローナル抗体またはその断片の活性評価

精製した本発明のモノクローナル抗体またはその断片の活性は、以下のよう
に評価することができる。

[0257] CD33発現細胞株に対する結合活性は、前述の1-(6a)記載のバイ
ンディングアッセイおよび(6b)記載のBiacoreシステムなどを用
いた表面プラズモン共鳴法を用いて測定する。また、蛍光抗体法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] などを用いて測定できる。

[0258] 抗原陽性培養細胞株に対するCDC活性、またはADCC活性は公知の測
定方法 [Cancer Immunol. Immunother., 36, 373 (1993)] により測定する。

[0259] 4. 抗体のエフェクター活性を制御する方法

本発明の抗CD33モノクローナル抗体のエフェクター活性を制御する方

法としては、抗体のFc領域の297番目のアスパラギン（Asn）に結合するN結合複合型糖鎖の還元末端に存在するN-アセチルグルコサミン（GlcNAc）に α -1, 6結合するフコース（コアフコースともいう）の量を制御する方法（国際公開第2005/035586号、国際公開第2002/31140号、国際公開第00/61739号）や、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することで制御する方法などが知られている。本発明の抗CD33モノクローナル抗体にはいずれの方法を用いても、エフェクター活性を制御することができる。

[0260] エフェクター活性とは、抗体のFc領域を介して引き起こされる抗体依存性の活性をいい、ADCC活性、CDC活性、またはマクロファージ若しくは樹状細胞などの食細胞による抗体依存性ファゴサイトーシス（Antibody-dependent phagocytosis, ADP活性）などが知られている。

[0261] 抗体のFcのN結合複合型糖鎖のコアフコースの含量を制御することで、抗体のエフェクター活性を増加または低下させることができる。抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を低下させる方法としては、 α 1, 6-フコース転移酵素遺伝子が欠損したCHO細胞を用いて抗体を発現することで、フコースが結合していない抗体を取得することができる。

[0262] フコースが結合していない抗体は高いADCC活性を有する。一方、抗体のFcに結合しているN結合複合型糖鎖に結合するフコースの含量を増加させる方法としては、 α 1, 6-フコース転移酵素遺伝子を導入した宿主細胞を用いて抗体を発現させることで、フコースが結合している抗体を取得できる。フコースが結合している抗体は、フコースが結合していない抗体よりも低いADCC活性を有する。

[0263] また、抗体のFc領域のアミノ酸残基を改変することでADCC活性またはCDC活性を増加または低下させることができる。例えば、米国特許出願公開第2007/0148165号明細書に記載のFc領域のアミノ酸配列

を用いることで、抗体のCDC活性を増加させることができる。

[0264] また、米国特許第6, 737, 056号明細書、米国特許第7, 297, 775号明細書または米国特許第7, 317, 091号明細書に記載のアミノ酸改変を行うことで、ADCC活性またはCDC活性を、増加させることも低下させることもできる。

[0265] 更に、上述の方法を組み合わせ、一つの抗体に使用することにより、抗体のエフェクター活性が制御された抗体を取得することができる。

[0266] 5. 本発明の抗CD33モノクローナル抗体またはその断片を用いた疾患の治療方法

本発明のモノクローナル抗体またはその断片は、CD33陽性細胞が関与する疾患の治療に用いることができる。

[0267] 本発明のモノクローナル抗体またはその断片を含有する治療剤は、有効成分としての該抗体もしくは該断片のみを含むものであってもよいが、通常は薬理学的に許容される1以上の担体と一緒に混合し、製剤学の技術分野において公知の方法により製造した医薬製剤として提供される。

[0268] 投与経路としては、例えば、経口投与、または口腔内、気道内、直腸内、皮下、筋肉内または静脈内などの非経口投与が挙げられる。投与形態としては、例えば、噴霧剤、カプセル剤、錠剤、散剤、顆粒剤、シロップ剤、乳剤、座剤、注射剤、軟膏、またはテープ剤などが挙げられる。

[0269] 経口投与に適当な製剤は、乳剤、シロップ剤、カプセル剤、錠剤、散剤、または顆粒剤などである。

[0270] 乳剤またはシロップ剤のような液体調製物は、水、ショ糖、ソルビトール若しくは果糖などの糖類、ポリエチレングリコール若しくはプロピレングリコールなどのグリコール類、ごま油、オリーブ油若しくは大豆油などの油類、p-ヒドロキシ安息香酸エステル類などの防腐剤、またはストロベリーフレーバー若しくはペパーミントなどのフレーバー類などを添加剤として用いて製造する。

[0271] カプセル剤、錠剤、散剤または顆粒剤などは、乳糖、ブドウ糖、ショ糖若

しくはマンニトールなどの賦形剤、デンプン若しくはアルギン酸ナトリウムなどの崩壊剤、ステアリン酸マグネシウム若しくはタルクなどの滑沢剤、ポリビニルアルコール、ヒドロキシプロピルセルロース若しくはゼラチンなどの結合剤、脂肪酸エステルなどの界面活性剤またはグリセリンなどの可塑剤などを添加剤として用いて製造する。

[0272] 非経口投与に適当な製剤としては、例えば、注射剤、座剤または噴霧剤などが挙げられる。

[0273] 注射剤は、塩溶液、ブドウ糖溶液、またはその両者の混合物からなる担体などを用いて製造する。

[0274] 座剤はカカオ脂、水素化脂肪またはカルボン酸などの担体を用いて製造する。

[0275] 噴霧剤は受容者の口腔および気道粘膜を刺激せず、かつ本発明のモノクローナル抗体またはその断片を微細な粒子として分散させ、吸収を容易にさせる担体などを用いて製造する。担体としては、例えば乳糖またはグリセリンなどを用いる。また、エアロゾルまたはドライパウダーとして製造することもできる。

[0276] さらに、上記非経口剤においても、経口投与に適当な製剤で添加剤として例示した成分を添加することもできる。

[0277] 6. 本発明の抗CD33モノクローナル抗体またはその断片を用いた疾患の診断方法

本発明のモノクローナル抗体またはその断片を用いて、CD33またはCD33が発現した細胞を検出または測定することにより、CD33に関連する疾患を診断することができる。

[0278] CD33に関連する疾患の一つである癌の診断は、例えば、以下のようにCD33を検出または測定して行うことができる。

[0279] 患者体内の癌細胞に発現しているCD33をフローサイトメーターなどの免疫学的手法を用いて検出することにより診断を行うことができる。

[0280] 免疫学的手法とは、標識を施した抗原または抗体を用いて、抗体量または

抗原量を検出または測定する方法である。例えば、放射性物質標識免疫抗体法、酵素免疫測定法、蛍光免疫測定法、発光免疫測定法、ウェスタンブロット法または物理化学的手法などが挙げられる。

[0281] 放射性物質標識免疫抗体法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体またはその断片を反応させ、さらに放射線標識を施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合を反応させた後、シンチレーションカウンターなどで測定する。

[0282] 酵素免疫測定法は、例えば、抗原または抗原を発現した細胞などに、本発明の抗体またはその断片を反応させ、さらに標識を施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片を反応させた後、発色色素を吸光光度計で測定する。例えば、サンドイッチELISA法などを用いる。

[0283] 酵素免疫測定法で用いる標識体としては、公知〔酵素免疫測定法，医学書院（1987）〕の酵素標識を用いることができる。例えば、アルカリフォスファターゼ標識、ペルオキシダーゼ標識、ルシフェラーゼ標識、またはビオチン標識などを用いる。

[0284] サンドイッチELISA法は、固相に抗体を結合させた後、検出または測定対象である抗原をトラップさせ、トラップされた抗原に第2の抗体を反応させる方法である。該ELISA法では、検出または測定したい抗原を認識する抗体またはその断片であって、抗原認識部位の異なる2種類の抗体を準備し、そのうち、第1の抗体またはその断片を予めプレート（例えば、96ウェルプレート）に吸着させ、次に第2の抗体またはその断片をFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素、またはビオチンなどで標識しておく。

[0285] 前記の抗体が吸着したプレートに、生体内から分離された、細胞またはその破碎液、組織またはその破碎液、細胞培養上清、血清、胸水、腹水、または眼液などを反応させた後、標識したモノクローナル抗体またはその断片を反応させ、標識物質に応じた検出反応を行う。濃度既知の抗原を段階的に希釈して作製した検量線より、被験サンプル中の抗原濃度を算出する。

- [0286] サンドイッチELISA法に用いる抗体としては、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体のいずれを用いてもよく、Fab、Fab'、またはF(ab)₂などの抗体フラグメントを用いてもよい。サンドイッチELISA法で用いる2種類の抗体の組み合わせとしては、異なるエピトープを認識するモノクローナル抗体またはその断片の組み合わせでもよいし、ポリクローナル抗体とモノクローナル抗体またはその断片との組み合わせでもよい。
- [0287] 蛍光免疫測定法は、文献[Monoclonal Antibodies—Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)]などに記載された方法で測定する。蛍光免疫測定法で用いる標識体としては、公知[蛍光抗体法、ソフトサイエンス社 (1983)]の蛍光標識を用いることができる。例えば、FITC、またはRITCなどを用いる。
- [0288] 発光免疫測定法は文献[生物発光と化学発光 臨床検査42, 廣川書店 (1998)]などに記載された方法で測定する。発光免疫測定法で用いる標識体としては、公知の発光体標識が挙げられ、例えば、アクリジニウムエステルまたはロフィンなどが挙げられる。
- [0289] ウェスタンブロット法は、抗原または抗原を発現した細胞などをSDS (ドデシル硫酸ナトリウム)—PAGE [Antibodies—A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988)]で分画した後、該ゲルをポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜またはニトロセルロース膜にブロッティングし、該膜に抗原を認識する抗体またはその断片を反応させ、さらにFITCなどの蛍光物質、ペルオキシダーゼなどの酵素標識、またはビオチン標識などを施した抗マウスIgG抗体またはその結合断片を反応させた後、該標識を可視化することによって測定する。一例を以下に示す。
- [0290] 配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを発現している細

胞または組織を溶解し、還元条件下でレーンあたりのタンパク量として0.1～30 μ gをSDS-PAGE法により泳動する。泳動されたタンパク質をPVDF膜にトランスファーし1～10%BSAを含むPBS（以下、BSA-PBSと表記することがある）に室温で30分間反応させブロッキング操作を行う。ここで本発明のモノクローナル抗体を反応させ、0.05～0.1%のTween-20を含むPBS（以下、Tween-PBSと表記することがある）で洗浄し、ペルオキシダーゼ標識したヤギ抗マウスIgGを室温で2時間反応させる。

[0291] Tween-PBSで洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents（アマシャム社製）などを用いてモノクローナル抗体が結合したバンドを検出することにより、配列番号3で示されるアミノ酸配列を含むポリペプチドを検出する。ウェスタンブロッティングでの検出に用いられる抗体としては、天然型の立体構造を保持していないポリペプチドに結合できる抗体が用いられる。

[0292] 物理化学的手法は、例えば、抗原であるCD33と本発明のモノクローナル抗体またはその断片とを結合させることにより凝集体を形成させて、この凝集体を検出することにより行う。この他に物理化学的手法としては、例えば、毛細管法、一次元免疫拡散法、免疫比濁法またはラテックス免疫比濁法〔臨床検査法提要，金原出版（1998）〕などが挙げられる。

[0293] ラテックス免疫比濁法は、抗体または抗原を感作させた粒径0.1～1 μ m程度のポリスチレンラテックスなどの担体を用い、対応する抗原または抗体により抗原抗体反応を起こさせると、反応液中の散乱光は増加し、透過光は減少する。この変化を吸光度または積分球濁度として検出することにより被験サンプル中の抗原濃度などを測定する。

[0294] 一方、CD33が発現している細胞の検出または測定は、公知の免疫学的検出法を用いることができるが、好ましくは免疫沈降法、免疫細胞染色法、免疫組織染色法または蛍光抗体染色法などを用いる。

[0295] 免疫沈降法は、CD33を発現した細胞などを本発明のモノクローナル抗

体またはその断片と反応させた後、プロテインGーセファロースなどのイムノグロブリンに特異的な結合能を有する担体を加えて抗原抗体複合体を沈降させる。または以下のような方法によっても行なうことができる。

[0296] ELISA用96ウェルプレートに上述した本発明のモノクローナル抗体またはその断片を固相化した後、BSA-PBSによりブロッキングする。抗体が、例えばハイブリドーマ培養上清などの精製されていない状態である場合には、抗マウスイムノグロブリン、抗ラットイムノグロブリン、プロテイン-Aまたはプロテイン-GなどをあらかじめELISA用96ウェルプレートに固相化し、BSA-PBSでブロッキングした後、ハイブリドーマ培養上清を分注して結合させる。次に、BSA-PBSを捨てPBSでよく洗浄した後、CD33を発現している細胞や組織の溶解液を反応させる。よく洗浄した後のプレートより免疫沈降物をSDS-PAGE用サンプルバッファーで抽出し、上記のウェスタンブロッティングにより検出する。

[0297] 免疫細胞染色法または免疫組織染色法は、抗原を発現した細胞または組織などを、場合によっては抗体の通過性を良くするため界面活性剤またはメタノールなどで処理した後、本発明のモノクローナル抗体と反応させ、さらにFITCなどの蛍光標識、ペルオキシダーゼなどの酵素標識またはビオチン標識などを施した抗イムノグロブリン抗体またはその結合断片と反応させた後、該標識を可視化し、顕微鏡にて顕鏡する方法である。

[0298] また、蛍光標識の抗体と細胞を反応させ、フローサイトメーターにて解析する蛍光抗体染色法 [Monoclonal Antibodies-Principles and practice, Third edition, Academic Press (1996)、単クローン抗体実験マニュアル、講談社サイエンティフィック (1987)] により検出を行うことができる。特に、CD33の細胞外領域に結合する、本発明のモノクローナル抗体またはその断片は、蛍光抗体染色法により天然型の立体構造を保持して発現している細胞の検出ができる。

[0299] また、蛍光抗体染色法のうち、FMAT8100HTSシステム（アプラ

イドバイオシステム社製）などを用いた場合には、形成された抗体－抗原複合体と、抗体－抗原複合体の形成に関与していない遊離の抗体または抗原とを分離することなく、抗原量または抗体量を測定できる。

[0300] 以下、本発明を実施例により具体的に説明するが、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

実施例

[0301] [実施例 1]

CD33 トランスフェクタントの作製

(1) CD33 発現ベクターの作製

ベクター pCMV / SPORT 6 にヒト CD33 遺伝子を組み込んだベクター (Open Biosystems 社製、Clone No. 5217182、以下 pCMV / hCD33 と表記することがある) から以下のようにしてヒト CD33 遺伝子配列が組み込まれたベクターを作製した。

[0302] pCMV / hCD33 を鋳型とし、配列番号 1、2 で表される塩基配列を有したプライマーを用いて通常の PCR 法によりヒト CD33 遺伝子を増幅した。PCR 産物を PCR Purification Kit (QIAGEN 社製) により精製し、SacI および HindIII で制限酵素処理した。ベクター pBluescript II sk (－) (ストラタジーン社製) (以下、pBS と表記することがある) も同様に SacI および HindIII で制限酵素処理を行い、これら 2 種類の断片を Ligation high (TOYOBO 社製) を用いて添付の説明書に従って連結した。

[0303] 得られた組換えプラスミド DNA 溶液を用いて大腸菌 DH5 α 株 (TOYOBO 社製) を形質転換した。形質転換株のクローンよりプラスミド DNA を調製して制限酵素処理により切り出された断片の大きさをアガロースゲル電気泳動にて比較することにより確認し、ヒト CD33 遺伝子が挿入されたプラスミド pBS / hCD33 を取得した。

[0304] こうして得られたヒト CD33 遺伝子が組み込まれた pBS / hCD33、および動物細胞発現ベクター pKANTEX93 (国際公開第 97 / 10

354号)をB s i W IおよびS p e Iで制限酵素処理した。その反応液をアガロースゲル電気泳動により分画し、h C D 3 3のB s i W I－S p e I断片およびp K A N T E X 9 3のB s i W I－S p e I断片をそれぞれ回収した。

[0305] これら2種類の断片をL i g a t i o n h i g hを用いて添付の説明書に従って連結した。得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌D H 5 α 株を形質転換した。形質転換株のクローンよりプラスミドDNAを調製して制限酵素処理により切り出された断片の大きさをアガロースゲル電気泳動にて比較することにより確認した。

[0306] さらに該プラスミドに関して、B i g D y e T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g F S R e a d y R e a c t i o n K i t (アプライドバイオシステムズ社製)を用いて、添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーA B I P R I S M 3 7 0 0により塩基配列を解析した。

[0307] その結果、ヒトC D 3 3遺伝子をコードするc D N Aがクローニングされたベクターp K A N T E X / h C D 3 3を取得した。ベクター構築の概略図を図1 Aに示した。ヒトC D 3 3のアミノ酸配列を配列番号3、C D 3 3の塩基配列を配列番号4に示す。

[0308] カニクイザルC D 3 3遺伝子を組み込んだ発現ベクターp K A N T E X / c y n o C D 3 3は、カニクイザル末梢血単核球(P e r i p h e r a l b l o o d m o n o n u c l e a r c e l l : 以下、P B M Cと表記することがある)から抽出したm R N Aから配列番号115、116で表される塩基配列を有したプライマーを用いて通常のP C R法によりヒトC D 3 3遺伝子を増幅したものから、上記と同様の方法により作製した。ベクター構築の概略図を図1 Bに示す。上記の解析で確認した塩基配列を配列番号118に、該塩基配列から予想されるカニクイザルC D 3 3のアミノ酸配列を配列番号117に示す。

[0309] チンパンジーC D 3 3遺伝子は、N C B IデータベースにX M _ 5 1 2 8

50. 2で登録されたチンパンジーCD33遺伝子の塩基配列を元に、配列番号119で表される塩基配列を設計し、該塩基配列がクローニングベクターpUC53に組み込まれたプラスミドをGenScript社の遺伝子合成受託サービスを利用して購入した。

[0310] 前記プラスミドを用いて、チンパンジーCD33遺伝子組み込んだ発現ベクターpKANTEX/chimpCD33を、上記と同様の方法により作製した。ベクター構築の概略図を図1Cに示す。チンパンジーCD33のアミノ酸配列を配列番号120、チンパンジーCD33の塩基配列を配列番号121に示す。

[0311] (2) CD33のCHO/DG44細胞での発現

上記(1)で作製したCD33発現ベクターpKANTEX/hCD33、pKANTEX/cynoCD33、pKANTEX/chimpCD33を、エレクトロポレーション法[Cytotechnology, 3, 133(1990)]により、以下のようにしてCHO/DG44細胞[Somatic Cell and Molecular Genetics, 12, 555(1986)]へ導入した。

[0312] 細胞は、10%ウシ胎児血清(ライフテクノロジーズ社製)およびGentamicin(ナカライテスク社製、50 μ g/mL)を添加したIMDM培地(インビトロジェン社製)(以下、A3倍地と表記することがある)に、1 $\times$ HT supplement(インビトロジェン社製)を添加した培地で継代したものをを用いた。

[0313] CHO/DG44細胞を137nmol/L塩化カリウム、2.7nmol/L塩化ナトリウム、8.1mmol/Lリン酸一水素二ナトリウム、1.5nmol/Lリン酸二水素一ナトリウムおよび4mmol/L塩化マグネシウムを含む緩衝液(以下、K-PBSと表記することがある)に懸濁して8 $\times$ 10⁶細胞/mLとし、得られた細胞懸濁液200 μ L(1.6 $\times$ 10⁶個の細胞)を各発現ベクター(8 μ g)と混和した。

[0314] この混和液をキュベット(電極間距離2mm)に移し、GenePuls

erll (バイオラッド社製) を用いてパルス電圧 0.35 kV、電気容量 250 μ F の条件で遺伝子導入を行った。キュベットを氷上で静置後、キュベット中の細胞懸濁液を、A3 培地を含む細胞培養用容器に懸濁し、37°C、5%炭酸ガス培養器中で培養した。

[0315] その後、G418 (インビトロジェン社製、0.5 mg/mL) を添加した培地で培養し、G418 に耐性を有する形質転換細胞株を取得した。更にメソトレキセートを培地に添加し、段階的に濃度を上昇させることにより、メソトレキセート耐性を有するクローンを選抜した。

[0316] さらに実施例 1 (3) の方法に従い、これらの細胞を蛍光免疫染色し、フローサイトメーター (ベックマン・コールター社製) により蛍光強度を測定することで、CD33 を高発現するクローンを選択し、ヒト CD33 発現細胞株、カニクイザル CD33 発現細胞株およびチンパンジー CD33 発現細胞株を取得した。

[0317] (3) フローサイトメトリー (FCM) による細胞上での CD33 発現量の比較

1~5 $\times 10^5$ 細胞の CD33 発現細胞に、ヒト IgG (シグマ社製) を 1 mg/mL 加えブロッキングをし、マウス抗 CD33 抗体 P67.6 (Santa Cruz Biosystems 社製) または WM-53 (Ance ll 社製) を 0.02% EDTA および 0.05% アジ化ナトリウムを含む 1% 牛血清アルブミン (BSA) - PBS (以下、FCM バッファーと表記することがある) で希釈し、全量を 100 μ L とした。

[0318] これらの細胞懸濁液を氷上で 60 分間反応させた後、ダルベッコリン酸バッファー (Phosphate buffered saline: 以下、PBS と表記することがある) で 2 回洗浄を行った。該細胞に、FCM バッファーで希釈調製した Alexa-488 標識ヤギ抗マウス IgG (H+L) (インビトロジェン社製) を 30 μ L 添加し、氷上で 40 分間反応させた。PBS で 3 回洗浄を行った後、FCM バッファーに懸濁し、フローサイトメーターにより蛍光強度を測定した。

[0319] [実施例2]

ヒスチジントグ付加可溶型ヒトCD33 (hCD33-His) の作製

(1) hCD33-His 発現ベクターの作製

実施例1 (1) にて取得したヒトCD33 遺伝子が挿入されたプラスミド pBS/hCD33 を鋳型とし、配列番号1、5 で表される塩基配列を有したプライマーを用いて通常のPCR法により6×ヒスチジン配列 (以下、His 配列と表記することがある) をコードする遺伝子配列 (以下、his 配列と表記することがある) を3' 末端側に付加したhCD33 遺伝子 (以下、hCD33-his と表記することがある) を増幅した。

[0320] PCR産物をPCR Purification Kitにより精製し、BsiWIおよびSpeIで制限酵素処理した。ベクターpKANTEX93を同様にBsiWIおよびSpeIで制限酵素処理した。その反応液をアガロースゲル電気泳動により分画し、hCD33-hisのBsiWI-SpeI断片およびpKANTEX93のBsiWI-SpeI断片をそれぞれ回収した。これら2種類の断片をLigation highを用いて添付の説明書に従って連結した。

[0321] 得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5α株を形質転換した。形質転換株のクローンよりプラスミドDNAを調製して制限酵素処理により確認した。さらに該プラスミドを、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kitを用いて、添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。

[0322] その結果、hCD33-hisをコードするcDNAがクローニングされたベクターpKANTEX/hCD33-hisを取得した。ベクター構築の概略図を図2に示す。hCD33-Hisのアミノ酸配列を配列番号6、hCD33-hisの塩基配列を配列番号7に示す。

[0323] (2) hCD33-HisのCHO/DG44細胞での産生

下記の方法により、ヒトCD33細胞外領域のC末端に連続した6つのヒ

スチジン配列であるH i s配列を付加したh C D 3 3-H i sを取得した。
上記（１）で作製したh C D 3 3-H i s発現ベクターp K A N T E X / h
C D 3 3-h i sを、エレクトロポレーション法により、以下のようにして
C H O / D G 4 4細胞へ導入した。

[0324] 細胞は、A 3培地に、1×H T s u p p l e m e n tを添加した培地で
継代したものを用いた。C H O / D G 4 4細胞をK-P B Sに懸濁して 8×10^6 細胞/mLとし、得られた細胞懸濁液200 μ L（ 1.6×10^6 個の
細胞）を発現ベクターp K A N T E X / h C D 3 3-h i s（8 μ g）と混
和した。

[0325] この混和液をキュベット（電極間距離2 mm）に移し、G e n e P u l s
e r I Iを用いてパルス電圧0.35 kV、電気容量250 μ Fの条件で遺
伝子導入を行った。キュベットを氷上で静置後、キュベット中の細胞懸濁液
を、A 3培地を含む細胞培養用容器に懸濁し、37℃、5%炭酸ガス培養器
中で培養した。

[0326] その後、G 4 1 8を添加した培地で培養し、G 4 1 8に耐性を有する形質
転換細胞株を取得した。更にメソトレキセートを培地に添加し、段階的に濃
度を上昇させることにより、メソトレキセート耐性を有するクローンを選抜
した。さらに下記（３）の方法に従い、これらの細胞の培養上清中h C D 3
3-H i sの濃度を比較することによりh C D 3 3-H i sを高産生するク
ローンを選択し、h C D 3 3-H i s産生細胞株を取得した。

[0327] （３）E L I S Aを用いた培養上清中h C D 3 3-H i s濃度の比較

アッセイには96ウェルのE L I S A用プレート（グライナー社）を用い
た。P B Sにて2マイクログラム/mLに希釈したP 6 7. 6を50 μ L/
ウェルで分注し、4℃で一晩静置して吸着させたものを用いた。該プレート
をP B Sで洗浄後、1% B S A-P B Sを100 μ L/ウェル加え、室温で
1時間静置して残っている活性基をブロックした。

[0328] その後、1% B S A-P B Sを捨て、該プレートにh C D 3 3-H i s
を含む細胞培養上清を適宜希釈して50 μ L/ウェル分注し、1時間静置し

た。該プレートを0.05%ポリオキシエチレン(20)ソルビタンモノラウレート(ICI社商標Tween 20相当品:和光純薬工業社製)/PBS(以下、Tween/PBSと表記することがある)で洗浄後、2次抗体としてペルオキシダーゼ標識マウス抗Penta-His抗体(QIAGEN社製)を50 μ L/ウェル加えて1時間室温で静置した。

[0329] 該プレートをTween/PBSで洗浄し、ABTS[2,2-アジノビス(3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸)アンモニウム]基質液[1mmol/L ABTS/0.1mol/L クエン酸バッファー(pH4.2)、0.1% H_2O_2]を50 μ L/ウェル添加して発色させ、5%SDS(Sodium Lauryl Sulfate)溶液を50 μ L/ウェル添加して反応を止め、サンプル波長415nm、リファレンス波長490nmにおける吸光度(OD415-OD490)をプレートリーダー(Emax microplate reader、Molecular Devices社)を用いて測定した。

[0330] [実施例3]

抗CD33モノクローナル抗体の作製

(1) 免疫原の調製

R&Dシステム社製リコンビナントヒトSiglec-3(CD33)/Fc Chimera(カタログ番号 1137-SL)(以下、リコンビナントヒトCD33-Fcと表記することがある)凍結乾燥品、実施例1に記載した方法で取得したヒトCD33発現細胞株またはCD33陽性であるヒト急性単球性白血病細胞株THP-1をPBSにて溶解し、免疫原として用いた。

[0331] (2) 動物の免疫と抗体産生細胞の調製

上記(1)で調製したリコンビナントヒトCD33-Fc 20 μ g、水酸化アルミニウムアジュバント[Antibodies-A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, p99、1988]2mgを百日咳ワクチン(千葉県血清

研究所製) 1×10^9 細胞とともにSDラット(日本SLC社)に投与した。投与2週間後より、該CD33 $20 \mu\text{g}$ と百日咳ワクチン 1×10^9 細胞のみを1週間に1回、計3回投与した。

[0332] または、上記(1)で調製したヒトCD33発現細胞株 1×10^7 細胞を百日咳ワクチン 1×10^9 細胞とともに1週間に1回、計4回SDラット(日本SLC社)に投与した。または、上記(1)で調製したTHP-1 1×10^7 細胞を百日咳ワクチン 1×10^9 細胞とともに1週間に1回、計4回Balb/cマウス(日本SLC社)、BXSbマウス(日本SLC社)に投与した。

[0333] 該ラットまたは、マウスの眼底静脈より部分採血し、その血清抗体価を以下に示す酵素免疫測定法で確認し、十分な抗体価を示したラットまたはマウスから最終免疫3日後に脾臓を摘出した。脾臓をMEM(Minimum Essential Medium)培地(日水製薬社製)中で細断し、すりつぶして遠心分離(1200 rpm 、5分間)した。

[0334] 得られた沈殿画分にトリス塩化アンモニウム緩衝液($\text{pH } 7.6$)を添加し、 37°C で1分間処理することにより赤血球を除去した。得られた沈殿画分(細胞画分)をMEM培地で3回洗浄し、細胞融合に用いた。

[0335] (3) 酵素免疫測定法(バインディングELISA)

アッセイには96ウェルのELISA用プレート(グライナー社)を用いた。リコンビナントヒトCD33-Fc、または抗ラットイムノグロブリン抗体(DAKO社)、または抗マウスイムノグロブリン抗体(DAKO社)を $50 \mu\text{L}$ /ウェルで分注し、 4°C で一晩静置して吸着させたものを用いた。該プレートをPBSで洗浄後、1%牛血清アルブミン(BSA)-PBSを $100 \mu\text{L}$ /ウェル加え、室温で1時間静置して残っている活性基をブロックした。

[0336] その後、1% BSA-PBSを捨て、該プレートに一次抗体として被免疫ラットまたはマウス血清を適宜希釈して $50 \mu\text{L}$ /ウェル分注し、1時間静置した。該プレートをTween-PBSで洗浄後、2次抗体としてペル

オキシダーゼ標識ヤギ抗ラット IgG (H+L 鎖) 抗体 (ZYMED 社製) または、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗マウス IgG (γ) 抗体 (KPL 社製) を $50\mu\text{L}$ /ウェル加えて 1 時間室温で静置した。

[0337] 該プレートを Tween-PBS で洗浄し、ABTS [2, 2-アジノビス (3-エチルベンゾチアゾール-6-スルホン酸) アンモニウム] 基質液 [1mmol/L ABTS/ 0.1mol/L クエン酸バッファー (pH 4.2)、 $0.1\%\text{H}_2\text{O}_2$] を $50\mu\text{L}$ /ウェル添加して発色させ、 $5\%\text{SDS}$ (Sodium Lauryl Sulfate) 溶液を $50\mu\text{L}$ /ウェル添加して反応を止め、サンプル波長 415nm 、リファレンス波長 490nm における吸光度 ($\text{OD}_{415}-\text{OD}_{490}$) をプレートリーダー (Emax microplate reader、Molecular Devices 社製) を用いて測定した。

[0338] (4) マウス骨髓腫細胞の調製

8-アザグアニン耐性マウス骨髓腫細胞株 P3X63Ag8U.1 (P3-U1: ATCC より購入) を 10% ウシ胎児血清添加 RPMI 1640 (インビトロジェン社製) で培養し、細胞融合時に 2×10^7 個以上の細胞を確保し、細胞融合の親株として供した。

[0339] (5) ハイブリドーマの作製

上記 (2) で得られたマウス脾細胞と上記 (4) で得られた骨髓腫細胞とを $10:1$ になるよう混合し、遠心分離 (1200rpm 、5 分間) した。得られた沈澱画分の細胞群をよくほぐした後、攪拌しながら、 37°C で、ポリエチレングリコール-1000 (PEG-1000) 1g 、MEM 培地 1mL 、およびジメチルスルホキシド (DMSO) 0.35mL の混液を 1×10^8 個のマウス脾細胞あたり 0.5mL 加え、該懸濁液に 1 分間毎に MEM 培地 1mL を数回加えた後、MEM 培地を加えて全量が 50mL になるようにした。

[0340] 該懸濁液を遠心分離 (900rpm 、5 分間) し、得られた沈澱画分の細胞をゆるやかにほぐした後、HAT 培地 [10% ウシ胎児血清添加 RPMI

1640培地にHAT Media Supplement（インビトロジェン社製）を加えた培地] 100mL中にゆるやかに懸濁した。該懸濁液を96ウェル培養用プレートに200 μ L／ウェルずつ分注し、5%CO₂インキュベーター中、37℃で10～14日間培養した。

[0341] 培養後、培養上清を下記（6）に記載のFMAT法で測定し、ヒトCD33発現細胞株には反応し、CHO／DG44細胞には反応しないウェルを選択した。そこに含まれる細胞から限界希釈法によるクローニングを2回繰り返し、抗CD33モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ株KM4071、KM4072、KM4073、KM4074、およびKM4075を確立した（表1）。なお、例えば、「KM4071」と表記した場合、ハイブリドーマまたは当該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体を指すものとする（他のハイブリドーマについても同様である）。

[0342] [表1]

モノクローナル抗体（免疫動物/サブクラス）	
KM4071	（マウス/IgG1）
KM4072	（マウス/IgG2a）
KM4073	（ラット/IgG2a）
KM4074	（ラット/IgG2a）
KM4075	（ラット/IgG1）

[0343] （6）FMAT法による培養上清の測定

実施例1に記載した方法で作製したヒトCD33発現細胞株を、96ウェルFMAT用プレート（アプライドバイオシステム社製）に1×10⁴細胞／50 μ L／ウェルまき、37℃の5%CO₂インキュベーター内で一晩培養した。該プレートにハイブリドーマの培養上清を10 μ L／ウェル添加し、すぐに0.05%アジ化ナトリウム、1%BSA－PBSで希釈したAlexa－647標識ヤギ抗ラットIgG（H＋L）抗体（インビトロジェン社製）を50 μ L／ウェル加え、遮光して室温で3時間静置した。その後、レーザー光 633nm He／Neで励起される650nm～685nmの波長を8200 Cellular Detection System（アプライドバイオシステム社製）で測定した。以下、この測定法をFMAT法とする。

[0344] [実施例4]

ヒトCD33に対するラットまたはマウス抗CD33モノクローナル抗体の活性評価

(1) FCMにおけるヒトCD33陽性セルラインとの反応性

1～5×10⁵細胞のTHP-1に、ヒトIgG（シグマ社製）を1mg/mL加えブロッキングをし、KM4071～KM4075およびP67.6 [Bioconjugate Chem, 13, 47 (2002)] をFCMバッファーで適宜希釈し、全量を100μLとした。これらの細胞懸濁液を氷上で60分間反応させた後、PBSで2回洗浄を行った。

[0345] 前記細胞に、FCMバッファーで希釈調製したAlexa-488標識ヤギ抗ラットIgG（H+L）抗体（インビトロジェン社製）またはAlexa-488標識ヤギ抗マウスIgG（H+L）を30μL添加し、氷上で40分間反応させた。PBSで3回洗浄を行った後、FCMバッファーに懸濁してフローサイトメーター（ベックマン・コールター社製）用いて、蛍光強度を測定した。

[0346] 図3に、実施例3で得られた抗CD33モノクローナル抗体を3μg/mLから4倍希釈で段階的に希釈したものを反応させた場合の平均蛍光強度（以下、MFIと表記することがある）を示す。図3に示すように、KM4071～KM4075およびp67.6はいずれも濃度依存的にCD33陽性細胞株へ結合することが確認された。

[0347] (2) ELISAにおけるリコンビナントヒトCD33-Fcとの結合活性
実施例3(3)に記載の方法に従って行った。図4に、実施例3で得られたKM4071～KM4075、およびP67.6を、2μg/mLから5倍希釈で段階的に希釈したものを1次抗体に用いた結果を示す。

[0348] (3) BiacoreにおけるリコンビナントヒトCD33-Fcとの結合活性

KM4071～KM4075およびP67.6のリコンビナントヒトCD33-Fcに対する結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモ

ン共鳴法（SPR法）を用いて結合活性測定を行った。以下の操作は全てBiacore T-100（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を用いて行った。

[0349] Mouse Antibody Capture Kit（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）を用い、添付のプロトコルに従い、抗マウスIgG抗体をアミンカップリング法によりCM5センサーチップ（GEヘルスケアバイオサイエンス社製）に固層化した。抗マウスIgG抗体を固層化したチップに測定サンプル（KM4071～KM4075およびP67.6を添加し、約200RU（レゾナンス ユニット）になるようにキャプチャーさせた。

[0350] その後10μg/mLから2倍希釈で5段階に希釈したリコンビナントヒトCD33-Fcを30μL/minの速度でチップ上に流し、各濃度におけるセンサーグラムを取得した。装置添付の解析ソフトを用い、1:1バインディングモデルを用いて解析し、各抗体のヒトCD33に対する結合速度定数 k_a 及び解離速度定数 k_d を算出した。

[0351] その結果得られた各抗体の k_a 、 k_d および解離定数 K_D を表2に示す。

[0352] [表2]

抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
KM4071	1.32E+06	2.13E-04	1.61E-10
KM4072	3.29E+05	2.03E-03	6.17E-09
KM4073	3.22E+06	3.64E-04	1.13E-10
KM4074	2.89E+05	1.14E-03	3.95E-09
KM4075	2.27E+05	1.86E-04	8.21E-10
P67.6	2.61E+05	1.22E-03	4.67E-09

[0353] 表2に示すように、KM4071、4073、4074および4075はP67.6よりもCD33-Fcに高いアフィニティを示した。

[0354] [実施例5]

抗CD33モノクローナル抗体の可変領域をコードするcDNAの単離、解析

(1) 抗CD33モノクローナル抗体産生ハイブリドーマ細胞からのmRNAの調製

実施例3に記載のKM4071～KM4075より、RNAeasy Mini kit (QIAGEN社製) およびOligotex™-dT30<Super>mRNA Purification Kit (Takara社製) を用いて、添付の使用説明書に従い、ハイブリドーマ $5 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ 細胞よりmRNAを調製した。

[0355] (2) 抗CD33モノクローナル抗体のH鎖およびL鎖可変領域の遺伝子クローニング

上記(1)で取得したモノクローナル抗体のmRNA 0.5 μ gから、SMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech社製) を用いて、添付の使用説明書に従ってcDNAを取得した。

[0356] そのcDNAを鋳型として、キット添付のユニバーサルプライマーAmixと、ラットIgG1に特異的なプライマー(配列番号8)、またはラットIgG2aに特異的なプライマー(配列番号9)、またはマウスIgG1に特異的なプライマー(配列番号10)、またはマウスIgG2aに特異的なプライマー(配列番号11)を用いてPCR反応を行い、各抗体の重鎖可変部(以下、VHと表記することがある)のcDNA断片を増幅した。

[0357] また抗体の各サブクラス特異的プライマーの代わりにラットIg(κ)特異的プライマー(配列番号12)または、マウスIg(κ)特異的なプライマー(配列番号13)を用いてPCRを行い、各抗体の軽鎖可変部(以下、VLと表記することがある)のcDNA断片を増幅した。PCRは、94℃で5分間加熱後、94℃で15秒間、72℃で3分間からなる反応サイクルを5回、94℃で15秒間、70℃で30秒間、72℃で3分間からなる反応サイクルを5回、94℃で15秒間、68℃で30秒間、72℃で3分間からなる反応サイクルを30回それぞれ行った後、72℃で10分間反応させた。PCRはPTC-200 DNA Engine (BioRad社製

）を用いて行った。

[0358] 得られたPCR産物は、クローニングして塩基配列を決定するため、アガロースゲル電気泳動で分離し、H鎖、L鎖をGel Extraction Kit (QIAGEN社製)を用いて抽出した。得られた抽出断片にTarget Clone Plus (TOYOBO社製)を用い、添付の説明書に従ってdA付加反応後、pTA2ベクター (TOYOBO社製)に各抗体のVHまたはVLを組み込んだ。

[0359] こうして得られたベクターを用いて、Competent Quick (TOYOBO社製)の付属の取扱説明書に従って大腸菌DH5 α 株を形質転換した。得られた形質転換体より自動プラスミド抽出機 (クラボウ社製)を用いてプラスミドを抽出し、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ社製)を用い添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700によりクローニングしたPCR産物の塩基配列を解析した。

[0360] その結果、cDNAの5'末端に開始コドンと推定されるATG配列が存在する、完全長のH鎖cDNAを含むプラスミドおよびL鎖cDNAを含むプラスミドが取得された。

[0361] (3) 抗CD33モノクローナル抗体V領域の遺伝子配列の解析

上記(2)で得られたプラスミドに含まれていた、ハイブリドーマKM4071~KM4075のVHの全塩基配列を配列番号14~18に、該配列から推定された、シグナル配列を含んだVHの全アミノ酸配列を配列番号19~23に、VLの全塩基配列を配列番号24~28におよび該配列から推定された、シグナル配列を含んだVLの全アミノ酸配列を配列番号29~33にそれぞれ示す。

[0362] また、配列番号14~18に示される塩基配列からシグナル配列を除いた塩基配列を配列番号122~126に、配列番号24~28に示される塩基配列からシグナル配列を除いた塩基配列を配列番号127~131に、配列

番号 19～23 に示されるアミノ酸配列からシグナル配列を除いたアミノ酸配列を配列番号 132～136 に、配列番号 29～33 に示されるアミノ酸配列からシグナル配列を除いたアミノ酸配列を配列番号 137～141 にそれぞれ示す。

[0363] 既知のラットおよびマウス抗体の配列データ [SEQUENCES of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)] との比較から、単離した各々の cDNA は分泌シグナル配列を含む KM4071～KM4075 をコードする完全長 cDNA であり、KM4071 の H 鎖については配列番号 19 に示されるアミノ酸配列の 1 から 19 番目のアミノ酸配列が、KM4071 の L 鎖については配列番号 29 に示されるアミノ酸配列の 1 から 19 番目のアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、KM4072 の H 鎖については配列番号 20 に示されるアミノ酸配列の 1 から 18 番目のアミノ酸配列が、KM4072 の L 鎖については配列番号 30 に示されるアミノ酸配列の 1 から 22 番目のアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、KM4073 の H 鎖については配列番号 21 に示されるアミノ酸配列の 1 から 18 番目のアミノ酸配列が、KM4073 の L 鎖については配列番号 31 に示されるアミノ酸配列の 1 から 20 番目のアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、KM4074 の H 鎖については配列番号 22 に示されるアミノ酸配列の 1 から 20 番目のアミノ酸配列が、KM4074 の L 鎖については配列番号 32 に示されるアミノ酸配列の 1 から 19 番目のアミノ酸配列が分泌シグナル配列であり、KM4075 の H 鎖については配列番号 23 に示されるアミノ酸配列の 1 から 20 番目のアミノ酸配列が、KM4075 の L 鎖については配列番号 33 に示されるアミノ酸配列の 1 から 19 番目のアミノ酸配列が分泌シグナル配列であることが明らかとなった。

[0364] 各モノクローナル抗体の V_H および V_L の CDR を、既知の抗体のアミノ酸配列と比較することにより同定した。

- [0365] KM4071のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号34、35および36に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号37、38および39にそれぞれ示す。
- [0366] KM4072のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号40、41および42に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号43、44および45にそれぞれ示す。
- [0367] KM4073のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号46、47および48に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号49、50および51にそれぞれ示す。
- [0368] KM4074のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号52、53および54に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号55、56および57にそれぞれ示す。
- [0369] KM4075のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号58、59および60に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列を配列番号61、62および63にそれぞれ示す。

[0370] [実施例6]

抗CD33キメラ抗体の作製

ELISA、FCMなどの免疫染色を用いた評価方法において、由来する種の異なる抗体、または同じ種であっても抗体のサブクラスが異なる抗体間の活性は検出抗体の反応性が異なるために比較することが出来ない。そこで、実施例3において確立したKM4071～KM4075の定常領域をヒト定常領域配列に置換したキメラ抗体を以下の方法に従い作製した。このように、定常領域をヒト由来の配列に揃えることにより、定常領域に依存する各種活性を測定、比較することも可能となる。

[0371] (1) 抗CD33キメラ抗体発現ベクターの構築

今回作製するキメラ抗体とは、ヒトIgG1とヒトIgG3の混合配列からなる強い補体依存性細胞傷害活性（以下、CDC活性と表記することがある）を含む定常領域（以下、当該定常領域を含む抗体を113F型抗体と表

記することがある）と、実施例 5（2）で得られたモノクローナル抗体の可変領域を含むキメラ抗体である。

[0372] 方法としては、抗 CD20 抗体の可変部が入った高 CDC 型キメラ抗体発現ベクター PKTX93/113F（米国特許出願公開第 2007/0148165 号明細書に記載）と、実施例 5（2）で得られた各モノクローナル抗体の VH または VL を pTA2 ベクターに組み込んだプラスミドを用いて、抗 CD33 キメラ抗体発現ベクターを以下のようにして構築した。

[0373] 各モノクローナル抗体の VH または VL を実施例 5（2）において作成した VH または VL を組み込んだ pTA2 ベクターを鋳型として 100 ng 使用し、10×KOD Plus 緩衝液 5 μ L、2 mmol/L dNTP 5 μ L、25 mmol/L の塩化マグネシウムを 2 μ L、DMSO を 2.5 μ L、KOD plus polymerase（TOYOBO 社製）を 1 μ L、各モノクローナル抗体の VH および VL に特異的な 10 μ mol/L のプライマーそれぞれ 1 μ L を含む総量 50 μ L からなる溶液を、94℃で 2 分間加熱後、94℃で 15 秒間、60.6℃で 30 秒間、68℃で 1 分間の反応を 30 サイクル行った。

[0374] KM4071 の VH のプライマーの塩基配列は配列番号 64 および 65、VL のプライマーの塩基配列は配列番号 66 および 67、KM4072 の VH のプライマーの塩基配列は配列番号 68 および 69、VL のプライマーの塩基配列は配列番号 70 および 71、KM4073 の VH のプライマーの塩基配列は配列番号 72 および 73、VL のプライマーの塩基配列は配列番号 74 および 75、KM4074 の VH のプライマーの塩基配列は配列番号 76 および 77、VL のプライマーの塩基配列は配列番号 78 および 79、KM4075 の VH のプライマーの塩基配列は配列番号 80 および 81、VL のプライマーの塩基配列は配列番号 82 および 83 に示す。

[0375] この反応により、ベクター pKANTE93（国際公開第 97/10354 号に記載）に挿入するための制限酵素認識配列が付加された各抗体の VH または VL をコードする遺伝子配列を合成した。それぞれの PCR 反応産

物をPCR Purification Kit (QIAGEN社製)を用いて精製した。

[0376] こうして得られた各抗体のVHにApaI (New England Biolabs社製) およびNotI (New England Biolabs社製) で制限酵素処理を行い、VHのNotI-ApaI断片を取得した。

[0377] また、各抗体のVLにBsiWI (New England Biolabs社製) およびEcoRI (New England Biolabs社製) で制限酵素処理を行い、VLのEcoRI-BsiWI断片を取得した。ベクターPKTX93/113Fも、同様にNotIおよびApaI、またはEcoRIおよびBsiWIで制限酵素処理をした。

[0378] 得られた各モノクローナル抗体のVHまたはVL断片を、同様に制限酵素処理したベクターとLigation high (TOYOBO社製)を用いて添付の説明書に従って連結し、得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌DH5 α 株 (TOYOBO社製) を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製して制限酵素処理により確認し、目的のVHのApaI-NotI断片またはVLのEcoRI-BsiWI断片が挿入されたプラスミドを取得した。

[0379] 該プラスミドに関して、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ社製)を用いて、添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700により塩基配列を解析した。

[0380] その結果、KM4071~KM4075のVHをコードするcDNAがクローニングされたベクターと、KM4071~KM4075のVLをコードするcDNAがクローニングされたベクターを取得した。こうして得られた、各抗体のVHまたはVLが組み込まれたPKTX93/113FベクターにEcoRIおよびNotIを加えて制限酵素処理を行い、VLのEcoRI-NotI断片と、VHが組み込まれたPKTX93/113Fベクター

のN o t I - E c o R I断片を取得した。

[0381] これら2種類の断片をL i g a t i o n h i g h (T O Y O B O社製)を用いて連結し、得られた組換えプラスミドDNA溶液を用いて大腸菌D H 5 α 株 (T O Y O B O社製)を形質転換した。形質転換株のクローンより各プラスミドDNAを調製して制限酵素処理により確認し、目的のV LのE c o R I - N o t I断片が挿入されたプラスミドを取得した。

[0382] 該プラスミドに関して、B i g D y e T e r m i n a t o r C y c l e S e q u e n c i n g F S R e a d y R e a c t i o n K i t (P E バイオシステムズ社製)を用いて、添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーA B I P R I S M 3 7 0 0により塩基配列を解析した。その結果、K M 4 0 7 1 ~ K M 4 0 7 5のV HおよびV Lをコードするc D N Aがクローニングされた、抗C D 3 3キメラ抗体発現ベクターを取得した。ベクター構築の概略図を図5に示す。

[0383] (2) 抗C D 3 3キメラ抗体の動物細胞での発現

上記(1)で得られた抗C D 3 3キメラ抗体発現ベクターを用いて抗C D 3 3キメラ抗体の動物細胞での発現を、常法 [A n t i b o d y E n g i n e e r i n g , A P r a c t i c a l G u i d e , W . H . F r e e m a n a n d C o m p a n y (1 9 9 2)] により行い、抗C D 3 3キメラ抗体を産生する形質転換株K M 4 0 5 1 ~ K M 4 0 5 5を取得した(表3)。

[0384] 発現させる動物細胞株としては $\alpha 1$, 6-フコシルトランスフェラーゼ (F U T 8) の遺伝子をダブルノックアウトしたC H O / D G 4 4細胞株(以下、F U T 8ノックアウトC H O細胞またはC H O / M s 7 0 4と表記することがある)を用いた。この宿主細胞株で発現させた抗体のN-結合型複合型糖鎖のコア部分には、フコースが付加されないことが知られている(国際公開第2 0 0 2 / 3 1 1 4 0号)。

[0385] また、フコースが付加されていないヒトI g G 1抗体は、付加されている場合に比べ抗体依存性細胞傷害活性(以下、A D C C活性と表記することが

ある)が高いことが知れている。以下、フコースが付加されていない抗体を高ADCC型抗体と表記することがある。

[0386] [表3]

マウス・ラットモノクローナル抗体	キメラ抗体
KM4071	KM4051
KM4072	KM4052
KM4073	KM4053
KM4074	KM4054
KM4075	KM4055

[0387] (3) 精製キメラ抗体の取得

上記(2)で得られたKM4051～KM4055を、通常の培養法で培養した後、細胞懸濁液を回収し、3000rpm、4℃の条件で20分間の遠心分離を行って培養上清を回収した後、0.22μm孔径MillexGVフィルター(Millipore社製)を通して濾過滅菌した。得られた培養上清よりProtein A High-capacityレジン(Millipore社製)カラムを用いて、添付の説明書に従い、KM4051～KM4055を精製した。

[0388] (4) 抗CD33キメラ抗体のフコース含量測定

国際公開第2002/31140号に記載の方法に従い、各キメラ抗体のFcに結合するN結合型糖鎖の還元末端のN-アセチルグルコサミンの6位にフコースの1位がα結合していない糖鎖の割合を調べた。結果を表4に示す。

[0389] [表4]

抗CD33キメラ抗体のフコース含量	
KM4051	0%
KM4052	0%
KM4053	0%
KM4054	0%
KM4055	0%
HM195-1	98%
HM195-P	0%
HM195-113F	0%

[0390] 表4に示すように、上記(3)で得られたキメラ抗体にはフコースが付加

していないことが確認された。

[0391] [実施例 7]

抗CD33キメラ抗体の活性評価

以下の(1)から(6)では、実施例6で得られたKM4051～KM4055、および下記実施例8で作製した抗CD33抗体HM195のIgG1型抗体(以下、HM195-1と表記することがある)、HM195の高ADCC型抗体(以下、HM195-Pと表記することがある)、HM195の113F型であり、かつ高ADCC型である抗体(以下、HM195-113Fと表記することがある)の活性評価を行った。

[0392] (1) FCMにおけるヒトCD33陽性細胞株との反応性

1～5×10⁵細胞のTHP-1に、希釈したマウス血清(CEDARLANE LABORATORIES社製)を加えブロッキングをし、KM4051～KM4055およびHM195-113Fを上記のFCMバッファーで適宜希釈したものを添加し、全量を100μLとした。これらの細胞懸濁液を氷上で60分間反応させ、PBSで3回洗浄した。

[0393] 前記細胞にFCMバッファーで希釈調製したFITC標識ヤギ抗ヒトIgG(Fc)抗体(Acris Antibodies社製)を30μL添加し、氷上で40分間反応させた。PBSで3回洗浄後、FCMバッファーに懸濁してフローサイトメーター(ベックマン・コールター社製)用いて、蛍光強度を測定した。

[0394] 図6に、実施例6で得られたKM4051～KM4055を2μg/mLから各濃度4倍希釈で段階的に希釈したものを反応させた場合のMFIを示す。KM4051～KM4055およびHM195-113Fはいずれも濃度依存的にTHP-1へ結合することが確認された。

[0395] (2) バインディングELISA法によるリコンビナントヒトCD33-Fcへの結合活性評価

実施例3(3)に記載の方法に従って行った。プレートにはリコンビナントヒトCD33-Fcまたは、ヤギ抗ヒトIgG(H+L)抗体(Amer

ican Qual ex社製)を吸着させた。1次抗体には実施例6で得られたKM4051~KM4055、および実施例8で得られたHM195-113Fを、 $2\mu\text{g/mL}$ から5倍希釈で段階的に希釈したものを用いた。

[0396] 2次抗体には、ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒトIgG(H+L鎖)抗体(American Qual ex社製)またはペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト κ 鎖(Southern Biotech社製)を用いた。リコンビナントヒトCD33-Fcおよびヤギ抗ヒトIgG(H+L)抗体の結果を、それぞれ図7(A)および(B)に示す。

[0397] 図7に示すように、KM4051~KM4055、HM195-113Fは、いずれもリコンビナントヒトCD33-Fcに反応性を示した。

[0398] (3) BiacoreにおけるリコンビナントヒトCD33-Fcとの結合活性

KM4051~KM4055およびHM195-113FのhCD33-Hisに対する結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモン共鳴法(SPR法)を用いて結合活性測定を行った。

[0399] 以下の操作は全てBiacore T-100(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用いて行った。Human Antibody Capture Kit(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)を用い、添付のプロトコールに従い、抗ヒトIgG抗体をアミンカップリング法によりCM5センサーチップ(GEヘルスケアバイオサイエンス社製)に固層化した。

[0400] 抗ヒトIgG抗体を固層化したチップに測定サンプル(KM4051~KM4055およびHM195-113Fを添加し、約300RU(レゾナンス ユニット)になるようにキャプチャーさせた。その後 $1.25\mu\text{g/mL}$ から5段階に希釈したhCD33-Hisを $30\mu\text{L/min}$ の速度でチップ上に流し、各濃度におけるセンサーグラムを取得した。装置添付の解析ソフトを用い、1:1バインディングモデルを用いて解析し、各抗体のヒトCD33に対する結合速度定数 k_a 及び解離速度定数 k_d を算出した。

[0401] その結果得られた各抗体の k_a 、 k_d および解離定数 K_D を表5に示す。

[0402] [表5]

キメラ抗体	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
KM4051	1.97E+06	7.11E-04	3.61E-10
KM4052	1.60E+06	6.47E-04	4.05E-10
KM4053	2.91E+06	4.23E-04	1.47E-10
KM4054	1.22E+06	1.96E-03	1.61E-09
KM4055	1.23E+06	3.74E-04	3.05E-10
HM195-113F	1.03E+06	4.29E-03	4.17E-09

[0403] 表5に示すように、いずれのキメラ抗体もHM195-113Fを上回る高いアフィニティーを示した。

[0404] (4) 抗CD33キメラ抗体のヒト血液癌細胞株に対するADCC活性の評価

KM4051～KM4055、HM195-1およびHM195-113FのADCC活性を、以下に示す方法に従って測定した。

[0405] (4) - 1 標的細胞溶液の調製

CD33陽性であるヒト急性前骨髄球性白血病細胞株NB-4をPBSで洗浄後、5%ウシ胎児血清(dFBS)を含むフェノールレッド不含有RPMI1640培地(以下、ADCC用培地と記することがある)で洗浄し、同培地で至適濃度に調製して標的細胞溶液とした。

[0406] (4) - 2 エフェクター細胞溶液の調製

PBMCは、健常人末梢血から以下に示した方法により分離した。ヘパリンナトリウム注N「シミズ」(清水製薬社製)を0.5mL含ませたシリンジで健常人末梢血50mLを採血した。採取した末梢血に同量の生理食塩水(大塚製薬製)を加えて希釈し、良く攪拌した。15mLチューブ(Greiner社製)に4.7mLずつ分注したLymphoprep(Axis-Shield社製)の上に、10mLの希釈末梢血を静かに重層し、2000rpm、ブレーキオフ、室温の条件で20分間遠心して単核球層を分離した。こうして得られた単核球画分を、ADCC用培地を用いて2回洗浄し、同培地により至適濃度に調製してエフェクター細胞溶液とした。

[0407] (4) - 3 ADCC活性の測定

CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega社製)を用い、付属の説明書に従い以下の手順で測定した。

[0408] 96ウェルU底プレート (FALCON社製) の各ウェルに適当濃度に希釈した抗体液を50 μ L分注しておき、(4) - 1で調製した標的細胞溶液を50 μ L、(4) - 2で調製したエフェクター細胞溶液を50 μ L添加して全量を150 μ Lとし、37℃で4時間反応させた。ADCC活性は次式により求めた。

[0409] (式)

$$\text{ADCC活性 (\%)} = \{ ([\text{検体の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}] - [\text{エフェクター細胞自然遊離の吸光度}]) / ([\text{標的細胞全遊離の吸光度}] - [\text{標的細胞自然遊離の吸光度}]) \} \times 100$$

[0410] 結果を図8に示す。標的細胞は 1.0×10^4 細胞/ウェル、エフェクター細胞は 2×10^5 細胞/ウェルとした (エフェクター細胞 (E) : 標的細胞 (T) = 20 : 1とした)。抗体濃度は、1 μ g/mLから段階的に10倍希釈した。

[0411] 図8に示すように、KM4051~KM4055、およびHM195-1、HM195-113Fは、NB-4に対して抗体濃度依存的なADCC活性を示した。また、KM4051~KM4055はHM195-113Fよりも強いADCC活性を示した。

[0412] (5) 抗CD33キメラ抗体のCD33トランスフェクタントに対するCD33活性の評価

KM4051~KM4055のCD33活性を、以下に示す方法に従って測定した。

[0413] CD33トランスフェクタントをPBSで洗浄後、10%ウシ胎児血清 (FBS) を含むRPMI 1640培地 (和光純薬工業社製) で洗浄し、同培地で至適濃度に調製して標的細胞溶液とした。1ウェル当たり 5×10^4 個と

なるよう、標的細胞溶液を96well平底プレート（住友ベークライト社製）に加え、更に、適当な濃度に調製した抗CD33キメラ抗体液、及び、終濃度4倍希釈となるように調製したヒト補体（SIGMA社製）を添加し、1well当たり100μLとなるように調製した。

[0414] また、CDCが惹起されない場合の対照として抗体を含まない反応ウェル（0%Lysisウェル）、CDCが惹起された場合の対照として細胞を含まない反応ウェル（100%Lysisウェル）をそれぞれ用意した。37℃インキュベーターにおいて3時間反応を行った。

[0415] 反応終了後、各反応ウェルに10μLのWST-1試薬（ROCHE社製）を加え、37℃で3時間程度反応させ、各ウェルにおけるOD450を測定し、各ウェルの吸光度より以下の式を用いてCDC活性（細胞傷害活性 [%]）を算出した。その結果を図9に示す。

[0416] (式)

$$\text{CDC活性（細胞傷害活性 [%]）} = 100 \times \{1 - (\text{反応ウェルの吸光度} - 100\% \text{Lysisウェルの吸光度}) / (0\% \text{Lysisウェルの吸光度} - 100\% \text{Lysisウェルの吸光度})\}$$

[0417] その結果、図9に示すように、KM4051～KM4055はいずれのクローンもCDC活性を示した。

[0418] (6) 抗CD33キメラ抗体のCD33発現細胞株における細胞膜上での抗体結合量

THP-1の細胞膜上での抗CD33キメラ抗体およびHM195-113Fの経時的な抗体結合量を以下の方法に従って測定した。

[0419] $1 \sim 5 \times 10^5$ 細胞のTHP-1に、希釈したマウス血清（CEDARLANE LABORATORIES社製）を加えブロッキングをし、KM4051～KM4055および実施例8に示すHM195-113Fを10%FCS-RPMIで適宜希釈したものを添加し、全量を100μLとした。

[0420] これらの細胞懸濁液を氷上で40分間反応後、37℃で30、60および120分間培養した。その後、冷PBSで3回洗浄し、該細胞に上記FCM

バッファーで希釈調製したFITC標識ヤギ抗ヒトIgG (Fc) 抗体 (Acris Antibodies社製) を30 μ L添加し、氷上で40分間反応させた。PBSで3回洗浄後、FCMバッファーに懸濁してフローサイトメーター (ベックマン・コールター社製) 用いて、蛍光強度を測定した。

[0421] 得られた結果を図10に示す [図10の (A) および (B) は、それぞれ抗体結合量および抗体残存率を示す]。図10に示すように、KM4051~KM4055およびHM195-113Fは時間依存的に細胞表面上での結合量が減少した。KM4051~KM4055はいずれのクローンも各時間においてHM195-113Fに比べて、細胞表面上に結合した抗体の量および残存率ともに上回っていた。

[0422] [実施例8]

HM195のIgG1型抗体および113F型抗体の作製

(1) HM195-1およびHM195-113F発現ベクターの作製

米国特許第7022500号明細書に記載の配列情報に基づき、ヒトCD33を特異的に認識するヒト抗体HM195のVHおよびVLをコードする遺伝子を、実施例6(1)に記載の方法により構築し、ベクターpKANTE93およびベクターPKTX93/113Fに組み込んだ。ベクター構築の概略図を図11に示す。

[0423] (2) HM195-1およびHM195-113Fの動物細胞での発現

上記(1)で取得したベクターを用いて、実施例6(2)に記載の方法により行った。

HM195-1を発現させる動物細胞としてはCHO/DG44細胞およびCHO/Ms704細胞を用いて、それぞれフコース付加した通常抗体およびフコース付加していない抗体を発現させた。HM195-113Fを発現させる動物細胞としては、CHO/Ms704細胞を用いた。

[0424] (3) HM195-1、HM195-P、およびHM195-113F精製抗体の取得

上記(2)で作製した動物細胞株を用いて、実施例6(3)に記載の方法

により行った。

[0425] [実施例 9]

可変領域に N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を有さない抗 CD 3 3 キメラ抗体の作製

可変領域に N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を有さない抗 CD 3 3 キメラ抗体（以下、改変型抗 CD 3 3 キメラ抗体と表記することがある）は、実施例 3 で KM 4 0 7 4 を基にして以下のように作製した。該抗体は配列番号 5 3 で示される V H の C D R 2 のアミノ酸配列中に、N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を有していた。

[0426] (1) V 領域に N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列を有さない遺伝子組換え抗体のアミノ酸配列の設計

KM 4 0 7 4 の V H に含まれる N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列は、配列番号 2 2 で示されるアミノ酸配列の 7 1 番目の A s n、7 2 番目の S e r および 7 3 番目の S e r からなる配列である。配列番号 2 2 で示されるアミノ酸配列において、C D R 2 は配列番号 5 3 で示されるアミノ酸配列を有する。配列番号 5 3 で示されるアミノ酸配列において、N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列は、3 番目の A s n、4 番目の S e r および 5 番目の S e r からなる配列である。

[0427] N 結合型糖鎖が結合するコンセンサス配列は、配列番号 5 3 で示されるアミノ酸配列において、4 番目のアミノ酸が任意であることから、3 番目の A s n と 5 番目の S e r を改変候補残基とした。既存の抗体配列 [S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t, U S D e p t. H e a l t h a n d H u m a n S e r v i c e s (1991)] との比較やアミノ酸の性質および側鎖構造を勘案し、抗体の結合活性に影響を与えないと考えられるアミノ酸改変として、3 番目の A s n を T y r、S e r、または G l n のいずれかに置換するアミノ酸改変、または 5 番目の S e r を A l a または G l y のいずれかに置換するアミノ酸改変を選択した。

[0428] 具体的には、3番目のA s nをT y rに置換したv e r. 1、3番目のA s nをS e rに置換したv e r. 2、3番目のA s nをG l nに置換したv e r. 3、5番目のS e rをA l aに置換したv e r. 4、および5番目のS e rをG l yに置換したv e r. 5の5種類の改変型C D 3 3キメラ抗体のV Hを設計した。V e r. 1～v e r. 5の各V Hのアミノ酸配列は、それぞれ配列番号1 0 3、1 0 4、1 0 5、9 3、および1 0 6で示される。また、各V e r. のV HのC D R 2のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号9 9、1 0 0、1 0 1、9 6および1 0 2に示す。以下、v e r. 1を有する抗体を、単にv e r. 1と表記することがある。

[0429] このようにして、抗体のV Hが配列番号1 0 3、1 0 4、1 0 5、9 3、1 0 6のいずれか1つで表されるアミノ酸配列であり、かつ抗体のV Lが配列番号9 5（配列番号3 2で表されるアミノ酸配列からシグナル配列を除いたもの）で表されるアミノ酸配列である改変型C D 3 3キメラ抗体を設計した。

[0430] (2) 改変型C D 3 3キメラ抗体の発現ベクターの作製

実施例6で作製した、K M 4 0 7 4と同一のV領域を有するK M 4 0 5 4発現ベクターを鋳型として、アミノ酸改変を導入した。アミノ酸改変を導入にはそれぞれ、

V e r. 1の作製には、配列番号1 0 7および1 0 8で示される塩基配列を有するプライマーを、

V e r. 2の作製には、配列番号1 0 9および1 1 0で示される塩基配列を有するプライマーを、

V e r. 3の作製には、配列番号1 1 1および1 1 2で示される塩基配列を有するプライマーを、

V e r. 4の作製には、配列番号9 7および9 8で示される塩基配列を有するプライマーを、

V e r. 5の作製には、配列番号1 1 3および1 1 4で示される塩基配列を有するプライマーを用い、Q u i c k C h a n g e S i t e - D i r e c

ted Mutagenesis Kit (Stratagene社製)を用いて、添付の使用説明書に従い、目的のアミノ酸置換を実施したプラスミドDNAを取得した。

[0431] 得られたベクターは、BigDye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (PEバイオシステムズ社製)を用い添付の説明書に従って反応後、同社のシーケンサーABI PRISM3700によりクローニングしたPCR産物の塩基配列を解析し、目的の改変が施された、改変型抗体発現ベクターが得られたことを確認した。

[0432] (3) 改変型CD33キメラ抗体の動物細胞での発現

上記(2)で得られた改変型抗体発現ベクターを用い、実施例6-(2)と同様の手法により形質転換株を取得した。

[0433] (4) 精製された改変型CD33キメラ抗体の取得

上記(3)で得られた各形質転換株を用い、実施例6-(3)と同様の手法により、精製された改変型CD33キメラ抗体を取得した。

[0434] [実施例10]

改変型CD33キメラ抗体の活性評価

実施例6で得られたKM4054、および実施例9で作製した改変型CD33キメラ抗体の活性評価を行った。

[0435] (1) BiacoreにおけるhCD33-Hisとの結合活性

KM4054および実施例9で作製した改変型CD33キメラ抗体の、hCD33-Hisに対する結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモン共鳴法(SPR法)を用いて結合活性測定を実施例7-(3)と同様の手法により行った。

[0436] その結果得られた各抗体の k_a 、 k_d および解離定数 K_D を表6に示す。

[0437]

[表6]

改変型抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/S)	KD (M)
KM4 0 5 4	7.78E+05	1.13E-03	1.45E-09
Ver. 1	7.80E+05	3.15E-03	4.04E-09
Ver. 2	8.10E+05	1.11E-03	1.37E-09
Ver. 3	7.19E+05	1.54E-03	2.14E-09
Ver. 4	8.89E+05	8.07E-04	9.08E-10
Ver. 5	9.00E+05	9.50E-04	1.06E-09

[0438] 表6に示すように、改変型CD33キメラ抗体ver. 1～5は、KM4 0 5 4と同等のアフィニティを有しており、このうちver. 4を KM4 0 8 4と命名した。

[0439] KM4 0 8 4のVHのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号52、96および54に、VLのCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸配列は、それぞれ配列番号55、56および57に示す。

[0440] また、配列番号93で表されるKM4 0 8 4のVHのアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を配列番号92に、配列番号95で表されるKM4 0 8 4のVLのアミノ酸配列をコードするDNAの塩基配列を配列番号94に示す。

[0441] [実施例11]

抗CD33ヒト化抗体の作製

(1) 抗CD33ヒト化抗体のVHおよびVLのアミノ酸配列の設計

抗CD33ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。初めに、KM4 0 8 4のVHのCDR1～3のアミノ酸配列（配列番号52、96、54）を移植するために、ヒト抗体のVHのフレームワーク領域（以下、FRと表記することがある）のアミノ酸配列を選択した。

[0442] カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVHをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ（HSG I～III）に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dep. Health and Human Services (1991)]

。そこで、ヒト抗体のVHのサブグループI～IIIの共通配列のFRのアミノ酸配列とKM4084VHのFRのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

[0443] 相同性を検索した結果、HSGI、HSGII、およびHSGIIIの相同性はそれぞれ50.6%、67.1%、54.1%であった。従って、KM4084VHのFRのアミノ酸配列はサブグループIIと最も高い相同性を有していた。

[0444] 以上の結果から、ヒト抗体のVHのサブグループIIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に、KM4084VHのCDR1～3のアミノ酸配列（配列番号52、96、54）を移植した。このようにして、KM4084ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列HVO（配列番号84）を設計した。

[0445] 次に、KM4084ヒト化抗体のVLのアミノ酸配列を以下のようにして設計した。KM4084のVLのCDR1～3のアミノ酸配列（配列番号55～57）を移植するために、ヒト抗体のVLのFRのアミノ酸配列を選択した。カバットらは、既知の様々なヒト抗体のVLをそのアミノ酸配列の相同性からサブグループ（HSGI～IV）に分類し、それらのサブグループ毎に共通配列を報告している [Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services (1991)]。そこで、ヒト抗体のVLのサブグループI～IVの共通配列のFRのアミノ酸配列とKM4084VLのFRのアミノ酸配列との相同性検索を実施した。

[0446] 相同性を検索した結果、HSGI、HSGII、HSGIII、およびHSGIVの相同性はそれぞれ60.0%、77.5%、65.0%、65.0%であった。従って、KM4084VLのFRのアミノ酸配列はサブグループIIと最も高い相同性を有していた。

[0447] 以上の結果から、ヒト抗体のVLのサブグループIIの共通配列のFRのアミノ酸配列の適切な位置に、KM4084VLのCDR1～3のアミノ酸

配列（配列番号 55～57）を移植した。しかし、KM4084VLのアミノ酸配列（配列番号 95）中の 4 番目の Leu、および 109 番目の Leu は、カバットらがあげるヒト抗体 FR のアミノ酸配列の相当する部位において、最も使用される頻度が高いアミノ酸残基ではないが、比較的高い頻度で使用されるアミノ酸残基であるため、上記の KM4084 のアミノ酸配列で認められるアミノ酸残基を用いることとした。このようにして、KM4084 ヒト化抗体の VL のアミノ酸配列 LVO（配列番号 85）を設計した。

[0448] 上記で設計した KM4084 ヒト化抗体の VH のアミノ酸配列 HVO および VL のアミノ酸配列 LVO は、選択したヒト抗体の FR のアミノ酸配列に KM4084 の CDR のアミノ酸配列のみを移植した配列である。しかし、一般に、ヒト化抗体を作製する場合には、単なるヒト抗体の FR へのマウス抗体の CDR のアミノ酸配列の移植のみでは結合活性が低下してしまうことが多い。

[0449] このため、結合活性の低下を回避するため、CDR のアミノ酸配列の移植とともに、ヒト抗体とマウス抗体で異なっている FR のアミノ酸残基のうち、結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基を改変することが行われている。そこで、結合活性に影響を与えると考えられる FR のアミノ酸残基を以下のようにして同定した。

[0450] まず、上記で設計した KM4084 ヒト化抗体の VH のアミノ酸配列 HVO および VL のアミノ酸配列 LVO よりなる抗体 V 領域（以下、HVOLVO と表記することがある）の三次元構造をコンピューターモデリングの手法を用いて構築した。三次元構造座標作製および三次元構造の表示には、Discovery Studio（アクセルリス社製）を添付の使用説明書に従い、用いた。

[0451] また、KM4084 の V 領域の三次元構造のコンピューターモデルも同様にして構築した。更に、HVOLVO の VH および VL の FR のアミノ酸配列の中で、KM4084 と異なっているアミノ酸残基を選択し、KM4084 のアミノ酸残基へ改変したアミノ酸配列を作製し、同様に三次元構造モデ

ルを構築した。これら作製したKM4084、HVOLVOおよび改変体のV領域の三次元構造を比較し、抗体の結合活性に影響を与えると予測されるアミノ酸残基を同定した。

[0452] その結果、HVOLVOのFRのアミノ酸残基の中で抗原結合部位の三次元構造を変化させ、抗体の結合活性に影響を与えると考えられるアミノ酸残基として、HV0では25番目のSer、27番目のGly、28番目のSer、29番目のVal、30番目のSer、40番目のGln、45番目のGly、46番目のLeu、49番目のIle、72番目のVal、93番目のVal、95番目のTyr、97番目のAla、および106番目のThrを、LV0では2番目のIle、8番目のPro、11番目のLeu、15番目のPro、および90番目のValをそれぞれ選択した。

[0453] これらの選択したアミノ酸残基のうち、少なくとも1つ以上のアミノ酸配列をKM4084の同じ部位に存在するアミノ酸残基へ改変し、様々な改変を有するヒト化抗体のVHおよびVLを設計した。具体的には、VHについては、配列番号84のアミノ酸配列25番目のSerをThrに、27番目のGlyをTyrに、28番目のSerをThrに、29番目のValをIleに、30番目のSerをThrに、40番目のGlnをLysに、45番目のGlyをArgに、46番目のLeuをMetに、49番目のIleをMetに、72番目のValをArgに、93番目のValをThrに、95番目のTyrをPheに、97番目のAlaをThrに、および106番目のThrをValに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。

[0454] また、VLについては、配列番号85のアミノ酸配列の2番目のIleをValに、8番目のProをLeuに、11番目のLeuをGlnに、15番目のProをLeuに、および90番目のValがLeuに置換するアミノ酸改変のうち、少なくとも1つの改変を導入した。

[0455] HVOLVOのFRに存在する、少なくとも1つのアミノ酸残基を改変した抗CD33ヒト化抗体の抗体V領域として、HVOLVO、HV7LVO

、HV14LVOをそれぞれ設計した。H鎖可変領域HV7およびHV14のアミノ酸配列を、それぞれ配列番号86、87に示した。

[0456] (2) 抗CD33ヒト化抗体の作製

抗CD33ヒト化抗体の可変領域のアミノ酸配列をコードするDNAは、KM4084VHおよびKM4084VLのアミノ酸配列をコードするDNA（配列番号92、94）で用いられているコドンを利用し、アミノ酸改変を行う場合は、哺乳動物細胞において高頻度で使用されるコドンを用いて作製した。

[0457] 抗CD33ヒト化抗体のHVOおよびLVOのアミノ酸配列をコードするDNA配列を配列番号88、89にそれぞれ示し、またアミノ酸改変を行った可変領域HV7、およびHV14のアミノ酸配列をコードするDNA配列を、配列番号90、および91にそれぞれ示した。

[0458] 実施例6と同様にして、各可変領域をコードするDNAを作製し、抗体発現ベクターpKANTEX93に挿入して、抗CD33ヒト化抗体発現ベクターを作製した。すなわち、実施例6(2)および(3)の方法に従って、作製した抗CD33ヒト化抗体発現ベクターを動物細胞に導入し高ADCC型抗体としてヒト化抗体を発現させ、CHとしてhIgG1を有する抗CD33ヒト化抗体HVOLVO、HV7LVO、およびHV14LVOを作製した。

[0459] (3) BiacoreにおけるhCD33-Hisとの結合活性

上記(2)で取得した各抗CD33ヒト化抗体の、hCD33-Hisに対する結合活性を反応速度論的に解析するため、表面プラズモン共鳴法（SPR法）を用いて結合活性測定を実施例7-(3)と同様の手法により行った。

[0460] その結果得られた各抗体の k_a 、 k_d および解離定数 K_D を表7に示す。

[0461] [表7]

ヒト化抗体	K_a (1/Ms)	K_d (1/S)	K_D (M)
HVOLVO	N.D	N.D	N.D
HV7LVO	1.01E+06	1.11E-03	1.10E-9
HV14LVO	0.96E+06	0.98E-03	1.02E-09

N.D; Not determined

[0462] 表7に示すように、作製した抗CD33ヒト化抗体のうち、HV0LV0に結合活性は認められなかった。一方で、HV7LV0、およびHV14LV0はいずれも、hCD33-Hisに対し、高いアフィニティーを有していた。また、そのアフィニティーはKM4054と同等以上であった。よって、高い結合活性を有する抗CD33ヒト化抗体が作製された。

[0463] [実施例12]

抗CD33ヒト化抗体の活性評価

以下の(1)から(4)では、実施例11で作製したKM4084のHV7LV0の高ADCC型抗体であるKM8084および実施例8で作製したHM195-1、HM195-Pの活性評価を行った。陰性対照抗体として、ジニトロフェノール(DNP)に対する高ADCC型抗体(anti-DNP)を用いた。また、抗体非添加サンプルを-Abと示した。

[0464] (1) ヒト血液癌細胞株に対するADCC活性の評価

実施例7(4)に記載の方法に従って行った。標的細胞として、THP-1、NB-4、ヒト赤白血病細胞株TF-1、ヒト急性巨核球性白血病細胞株CMK11-5を用いた。標的細胞は 1.0×10^4 細胞/ウェル、エフェクター細胞は 2.5×10^5 細胞/ウェルとした(エフェクター細胞(E):標的細胞(T)=25:1とした)。抗体濃度は、 $0.5 \mu\text{g/mL}$ から段階的に4倍希釈した。結果を図12に示す。

[0465] 図12に示すように、KM8084、HM195-1およびHM195-Pは、各細胞株に対して抗体濃度依存的なADCC活性を示した。また、KM8084はHM195-Pよりも強いADCC活性を示した。

[0466] (2) CD33発現細胞株における細胞膜上での抗体結合量

実施例7(6)方法に従って行った。細胞としてTHP-1を用いた。1次抗体としてKM8084およびHM195-Pを用いた。

[0467] 得られた結果を図13に示す[図13の(A)および(B)は、それぞれ抗体結合量および抗体残存率を示す]。図13に示すように、KM8084およびHM195-Pは時間依存的に細胞表面上での結合量が減少した。ま

た、KM8084は各時間においてHM195-Pに比べて、細胞表面上に結合した抗体の量および残存率ともに上回っていた。

[0468] (3) ヒト末梢血中における細胞除去活性

KM8084、HM195-1およびHM195-Pの末梢血中におけるNB-4およびTF-1に対する細胞除去活性を以下の方法により測定した。

[0469] PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kit (シグマ社製) に添付の説明書に従い、NB-4およびTF-1を蛍光標識し、RPMI 1640 (インビトロジェン社製) にて希釈調製した。

[0470] 24 ウェルプレート (NUNC社製) にヘパリンナトリウム注 N (清水製薬社製) を1%含む、健常人末梢血を500 μ L/ウェルにて分注した。RPMI 1640にて希釈調製した各抗体を50 μ L、蛍光標識した細胞溶液を50 μ L添加し全量を600 μ Lとし、5%CO₂インキュベーター中37℃にて、16時間、振とうして攪拌しながら反応させた。

[0471] 反応後、内部標準粒子であるFlow Beas (FB) としてFlow-Count (ベックマン・コールター社製) を100 μ L/ウェル加え、混和後、各ウェルから400 μ Lを15 mL遠心チューブ (NUNC社製) にそれぞれ移した。該チューブを400 $\times$ g、5分間遠心後、上清を取り除き、各チューブにACK Lysing Buffer (Lonza社製) を1 mL添加し、37℃、10分間、振とう、反応させた。

[0472] 該チューブを1%BSA-PBSにて2回洗浄し、500 μ Lの1%BSA-PBSに懸濁し、フローサイトメーター (ベックマン・コールター社製) 用いて、FB数、蛍光標識した細胞数を測定した。得られた結果より、FB 1000個あたりの蛍光標識した細胞数を算出した。

[0473] 得られた結果を図14に示す。図14に示すように、HM195-1に対して、同抗体の高ADCC型抗体であるHM195-Pは10倍程度の高い活性を示した。また、KM8084はHM195-1に対して100倍以上

、HM195-Pに対して数10倍以上強い細胞除去活性を示した。

[0474] ヒト末梢血中に白血病細胞を添加した本評価系は、急性骨髄性白血病（AML）患者血中の環境をモデル化した系であり、実施例12（1）のADCC評価系に比べて、より臨床における薬効を反映していると考えられる。このため、KM8084は急性骨髄性白血病などの血液癌や骨髄細胞の病変に伴う骨髄異形性症候群に対して、HM195を上回る効果を示すことが示唆される。

[0475] （4）ヒト、カニクイザルおよびチンパンジーCD33に対する反応性

実施例7（1）に記載の方法に従って行った。細胞には実施例1にて作製したヒトCD33発現細胞株、カニクイザルCD33発現細胞株およびチンパンジーCD33発現細胞株を用いた。1次抗体にはKM8084、HM195-1およびHM195-Pを段階的に希釈したものを用いた。2次抗体にはFITC標識ヤギ抗ヒトIgG（Fc）抗体（Acris Antibodies社製）を用いた。

[0476] 図15に、KM8084、HM195-1およびHM195-Pを50 μg/mLから各濃度10倍希釈で段階的に希釈したものを反応させた場合のMFIを示す。図15に示すように、KM8084、HM195-1およびHM195-Pはいずれも濃度依存的にヒトCD33発現細胞株へ反応し、反応性の強さに差は無かった。一方、カニクイザルCD33発現細胞株およびチンパンジーCD33発現細胞株に対して、KM8084は濃度依存的に反応したが、HM195-1およびHM195-Pはほとんど反応しなかった。

[0477] 各配列番号の配列は以下の通りである。

配列番号1：ヒトCD33発現ベクター作製のプライマーの塩基配列

配列番号2：ヒトCD33発現ベクター作製のプライマーの塩基配列

配列番号3：ヒトCD33のアミノ酸配列

配列番号4：ヒトCD33遺伝子の塩基配列

配列番号5：hCD33-His発現ベクター作製のプライマーの塩基配列

配列番号 6 : h C D 3 3 - H i s のアミノ酸配列

配列番号 7 : h C D 3 3 - h i s 遺伝子の塩基配列

配列番号 8 : ラット I g G 1 特異的プライマーの塩基配列

配列番号 9 : ラット I g G 2 a 特異的プライマーの塩基配列

配列番号 10 : マウス I g G 1 特異的プライマーの塩基配列

配列番号 11 : マウス I g G 2 a 特異的プライマーの塩基配列

配列番号 12 : ラット I g (κ) 特異的プライマーの塩基配列

配列番号 13 : マウス I g (κ) 特異的プライマーの塩基配列

配列番号 14 : K M 4 0 7 1 V H の塩基配列

配列番号 15 : K M 4 0 7 2 V H の塩基配列

配列番号 16 : K M 4 0 7 3 V H の塩基配列

配列番号 17 : K M 4 0 7 4 V H の塩基配列

配列番号 18 : K M 4 0 7 5 V H の塩基配列

配列番号 19 : K M 4 0 7 1 V H のアミノ酸配列

配列番号 20 : K M 4 0 7 2 V H のアミノ酸配列

配列番号 21 : K M 4 0 7 3 V H のアミノ酸配列

配列番号 22 : K M 4 0 7 4 V H のアミノ酸配列

配列番号 23 : K M 4 0 7 5 V H のアミノ酸配列

配列番号 24 : K M 4 0 7 1 V L の塩基配列

配列番号 25 : K M 4 0 7 2 V L の塩基配列

配列番号 26 : K M 4 0 7 3 V L の塩基配列

配列番号 27 : K M 4 0 7 4 V L の塩基配列

配列番号 28 : K M 4 0 7 5 V L の塩基配列

配列番号 29 : K M 4 0 7 1 V L のアミノ酸配列

配列番号 30 : K M 4 0 7 2 V L のアミノ酸配列

配列番号 31 : K M 4 0 7 3 V L のアミノ酸配列

配列番号 32 : K M 4 0 7 4 V L のアミノ酸配列

配列番号 33 : K M 4 0 7 5 V L のアミノ酸配列

配列番号 34 : KM4071 VH CDR1のアミノ酸配列

配列番号 35 : KM4071 VH CDR2のアミノ酸配列

配列番号 36 : KM4071 VH CDR3のアミノ酸配列

配列番号 37 : KM4071 VL CDR1のアミノ酸配列

配列番号 38 : KM4071 VL CDR2のアミノ酸配列

配列番号 39 : KM4071 VL CDR3のアミノ酸配列

配列番号 40 : KM4072 VH CDR1のアミノ酸配列

配列番号 41 : KM4072 VH CDR2のアミノ酸配列

配列番号 42 : KM4072 VH CDR3のアミノ酸配列

配列番号 43 : KM4072 VL CDR1のアミノ酸配列

配列番号 44 : KM4072 VL CDR2のアミノ酸配列

配列番号 45 : KM4072 VL CDR3のアミノ酸配列

配列番号 46 : KM4073 VH CDR1のアミノ酸配列

配列番号 47 : KM4073 VH CDR2のアミノ酸配列

配列番号 48 : KM4073 VH CDR3のアミノ酸配列

配列番号 49 : KM4073 VL CDR1のアミノ酸配列

配列番号 50 : KM4073 VL CDR2のアミノ酸配列

配列番号 51 : KM4073 VL CDR3のアミノ酸配列

配列番号 52 : KM4074およびKM4084 VH CDR1のアミノ酸配列

配列番号 53 : KM4074 VH CDR2のアミノ酸配列

配列番号 54 : KM4074およびKM4084 VH CDR3のアミノ酸配列

配列番号 55 : KM4074およびKM4084 VL CDR1のアミノ酸配列

配列番号 56 : KM4074およびKM4084 VL CDR2のアミノ酸配列

配列番号 57 : KM4074およびKM4084 VL CDR3のアミノ酸配列

酸配列

配列番号 58 : KM4075 VH CDR1のアミノ酸配列
配列番号 59 : KM4075 VH CDR2のアミノ酸配列
配列番号 60 : KM4075 VH CDR3のアミノ酸配列
配列番号 61 : KM4075 VL CDR1のアミノ酸配列
配列番号 62 : KM4075 VL CDR2のアミノ酸配列
配列番号 63 : KM4075 VL CDR3のアミノ酸配列
配列番号 64 : KM4071 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 65 : KM4071 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 66 : KM4071 VLのキメラ化プライマー
配列番号 67 : KM4071 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 68 : KM4072 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 69 : KM4072 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 70 : KM4072 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 71 : KM4072 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 72 : KM4073 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 73 : KM4073 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 74 : KM4073 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 75 : KM4073 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 76 : KM4074 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 77 : KM4074 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 78 : KM4074 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 79 : KM4074 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 80 : KM4075 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 81 : KM4075 VHのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 82 : KM4075 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 83 : KM4075 VLのキメラ化プライマーの塩基配列
配列番号 84 : KM4084 ヒト化抗体のVHのアミノ酸配列 HVO

- 配列番号 85 : KM4084 ヒト化抗体の VL のアミノ酸配列 LV0
- 配列番号 86 : KM4084 ヒト化抗体の VH のアミノ酸配列 HV7
- 配列番号 87 : KM4084 ヒト化抗体の VH のアミノ酸配列 HV14
- 配列番号 88 : KM4084 ヒト化抗体 HV0 の塩基配列
- 配列番号 89 : KM4084 ヒト化抗体 LV0 の塩基配列
- 配列番号 90 : KM4084 ヒト化抗体 HV7 の塩基配列
- 配列番号 91 : KM4084 ヒト化抗体 HV14 の塩基配列
- 配列番号 92 : Ver. 4 VH の塩基配列 / KM4084 VH の塩基配列
- 配列番号 93 : Ver. 4 VH のアミノ酸配列 / KM4084 VH のアミノ酸配列
- 配列番号 94 : KM4084 VL の塩基配列
- 配列番号 95 : KM4084 VL のアミノ酸配列
- 配列番号 96 : N結合型糖鎖結合コンセンサス配列を有さないアミノ酸改変抗体 Ver. 4 CDR2 配列 / KM4084 VH CDR2 のアミノ酸配列
- 配列番号 97 : VH CDR2 アミノ酸改変抗体 ver. 4 作製用プライマー（センス鎖）の塩基配列
- 配列番号 98 : VH CDR2 アミノ酸改変抗体 ver. 4 作製用プライマー（アンチセンス鎖）の塩基配列
- 配列番号 99 : N結合型糖鎖結合コンセンサス配列を有さないアミノ酸改変抗体 Ver. 1 CDR2 のアミノ酸配列
- 配列番号 100 : N結合型糖鎖結合コンセンサス配列を有さないアミノ酸改変抗体 Ver. 2 CDR2 のアミノ酸配列
- 配列番号 101 : N結合型糖鎖結合コンセンサス配列を有さないアミノ酸改変抗体 Ver. 3 CDR2 のアミノ酸配列
- 配列番号 102 : N結合型糖鎖結合コンセンサス配列を有さないアミノ酸改変抗体 Ver. 5 CDR2 のアミノ酸配列

配列番号 103 : V e r . 1 V H のアミノ酸配列

配列番号 104 : V e r . 2 V H のアミノ酸配列

配列番号 105 : V e r . 3 V H のアミノ酸配列

配列番号 106 : V e r . 5 V H のアミノ酸配列

配列番号 107 : V H C D R 2 アミノ酸改変抗体 v e r . 1 作製用プライマー（センス鎖）の塩基配列

配列番号 108 : V H C D R 2 アミノ酸改変抗体 v e r . 1 作製用プライマー（アンチセンス鎖）の塩基配列

配列番号 109 : V H C D R 2 アミノ酸改変抗体 v e r . 2 作製用プライマー（センス鎖）の塩基配列

配列番号 110 : V H C D R 2 アミノ酸改変抗体 v e r . 2 作製用プライマー（アンチセンス鎖）の塩基配列

配列番号 111 : V H C D R 2 アミノ酸改変抗体 v e r . 3 作製用プライマー（センス鎖）の塩基配列

配列番号 112 : V H C D R 2 アミノ酸改変抗体 v e r . 3 作製用プライマー（アンチセンス鎖）の塩基配列

配列番号 113 : V H C D R 2 アミノ酸改変抗体 v e r . 5 作製用プライマー（センス鎖）の塩基配列

配列番号 114 : V H C D R 2 アミノ酸改変抗体 v e r . 5 作製用プライマー（アンチセンス鎖）の塩基配列

配列番号 115 : カニクイザル C D 3 3 発現ベクター作製のプライマーの塩基配列

配列番号 116 : カニクイザル C D 3 3 発現ベクター作製のプライマーの塩基配列

配列番号 117 : カニクイザル C D 3 3 のアミノ酸配列

配列番号 118 : カニクイザル C D 3 3 の塩基配列

配列番号 119 : チンパンジー C D 3 3 全合成遺伝子の塩基配列

配列番号 120 : チンパンジー C D 3 3 のアミノ酸配列

配列番号 1 2 1 : チンパンジー C D 3 3 の塩基配列

配列番号 1 2 2 : K M 4 0 7 1 V H の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 2 3 : K M 4 0 7 2 V H の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 2 4 : K M 4 0 7 3 V H の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 2 5 : K M 4 0 7 4 V H の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 2 6 : K M 4 0 7 5 V H の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 2 7 : K M 4 0 7 1 V L の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 2 8 : K M 4 0 7 2 V L の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 2 9 : K M 4 0 7 3 V L の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 0 : K M 4 0 7 4 V L の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 1 : K M 4 0 7 5 V L の塩基配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 2 : K M 4 0 7 1 V H のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 3 : K M 4 0 7 2 V H のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 4 : K M 4 0 7 3 V H のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 5 : K M 4 0 7 4 V H のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 6 : K M 4 0 7 5 V H のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 7 : K M 4 0 7 1 V L のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 8 : K M 4 0 7 2 V L のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 3 9 : K M 4 0 7 3 V L のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 4 0 : K M 4 0 7 4 V L のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

配列番号 1 4 1 : K M 4 0 7 5 V L のアミノ酸配列 (シグナル配列なし)

[0478] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお、本出願は、2010年12月3日付けで出願された米国仮出願(61/419342号)に基づいており、その全体が引用により援用される。

請求の範囲

[請求項1]

(i) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号99で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(ii) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号100で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(iii) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号101で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、または

(iv) 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号102で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号57で

示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項2] 配列番号52で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号96で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号54で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号55で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号56で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号57で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を有する軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項3] 配列番号86で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号85で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項2に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項4] 配列番号87で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号85で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項2に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項5] (i) 配列番号34で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号35で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号36で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号37で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号38で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号39で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒトCD33に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(ii) 配列番号40で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号41で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号42で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む重鎖可変領域、並びに配列番号43で示されるアミノ酸配列を含むCDR1、配列番号44で示されるアミノ酸配列を含むCDR2、および配列番号45で示されるアミノ酸配列を含むCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト

C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(i i i) 配列番号 4 6 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 4 7 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 4 8 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 4 9 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 5 0 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 5 1 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、

(i v) 配列番号 5 2 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 5 3 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 5 4 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 5 5 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 5 6 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 5 7 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片、または

(v) 配列番号 5 8 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 5 9 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 6 0 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む重鎖可変領域、並びに配列番号 6 1 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 1、配列番号 6 2 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 2、および配列番号 6 3 で示されるアミノ酸配列を含む C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む、ヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項6]

(i) 配列番号 1 3 2 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 3 7 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体、

(i i) 配列番号 1 3 3 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 3 8 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体、

(i i i) 配列番号 1 3 4 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 3 9 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体、

(i v) 配列番号 1 3 5 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 4 0 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体、または

(v) 配列番号 1 3 6 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 4 1 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体が結合するヒト C D 3 3 上のエピトープに結合する、ヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項7]

(i) 配列番号 1 3 2 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 3 7 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体、

(i i) 配列番号 1 3 3 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 3 8 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体、

(i i i) 配列番号 1 3 4 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 3 9 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体、

(i v) 配列番号 1 3 5 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 4 0 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体、または

(v) 配列番号 1 3 6 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 1 4 1 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含むヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗体と競合してヒト C D 3 3 に結合するモノクローナル抗または該抗体の断片。

[請求項8]

ヒト C D 3 3 に対する解離定数 K_D が 4.0×10^{-9} M 以下である

、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項9] ヒト C D 3 3 に対する解離定数 K_D が $2.0 \times 10^{-9} M$ 以下である、請求項 8 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項10] 重鎖定常領域を含む請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片であって、重鎖定常領域のクラスがヒト I g G であるモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項11] ヒト I g G のサブクラスがヒト I g G 1 である、請求項 10 に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項12] 重鎖定常領域を含む請求項 1 から 11 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片であって、重鎖定常領域の F c に結合している N 結合複合型糖鎖にフコースが結合していないモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項13] 軽鎖定常領域を含む請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片であって、軽鎖定常領域のクラスがヒト κ であるモノクローナル抗体または該抗体の断片。

[請求項14] F a b、F (a b')₂、F a b'、s c F v、d i a b o d y、d s F v または C D R を含むペプチドである、請求項 1 から 13 のいずれか 1 項に記載の抗体の断片。

[請求項15] 請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片をコードする D N A。

[請求項16] 請求項 15 に記載の D N A を含有する組換えベクター。

[請求項17] (i) 配列番号 89 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードする D N A を含む組換えベクター、

(i i) 配列番号 90 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードする D N A を含む組換えベクター、

(i i i) 配列番号 91 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードする D N A を含む組換えベクター、

(i v) 配列番号 90 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードする DNA および配列番号 89 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードする DNA を含む組換えベクター、

または

(v) 配列番号 91 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードする DNA および配列番号 89 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードする DNA を含む組換えベクター。

[請求項18] 請求項 16 および 17 に記載の組換えベクターから選ばれる少なくとも 1 の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる形質転換体。

[請求項19] 以下の (i) または (i i) の組換えベクターを宿主細胞に導入して得られる請求項 18 に記載の形質転換体。

(i) 配列番号 89 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードする DNA を含む組換えベクターおよび配列番号 90 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードする DNA を含む組換えベクター

(i i) 配列番号 89 で示されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域をコードする DNA を含む組換えベクターおよび配列番号 91 で示されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域をコードする DNA を含む組換えベクター

[請求項20] 請求項 18 または 19 に記載の形質転換体を培地に培養し、培養物中に請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片を生成蓄積させ、該培養物から該モノクローナル抗体または該抗体の断片を採取することを特徴とする、請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片の製造方法。

[請求項21] 請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片を有効成分として含有する医薬組成物。

[請求項22] 請求項 1 から 14 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体また

は該抗体の断片を有効成分として含有する、C D 3 3 陽性細胞が関与する疾患の治療剤。

[請求項23] C D 3 3 陽性細胞が関与する疾患が、癌、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患である、請求項 2 2 に記載の治療剤。

[請求項24] 癌が、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌である、請求項 2 3 に記載の治療剤。

[請求項25] 血液癌が、急性骨髄性白血病、未分化大細胞型リンパ腫、急性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫である、請求項 2 4 に記載の治療剤。

[請求項26] 請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片を哺乳動物に投与する工程を含む、C D 3 3 陽性細胞が関与する疾患を治療する方法。

[請求項27] C D 3 3 陽性細胞が関与する疾患が、癌、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患である、請求項 2 6 に記載の方法。

[請求項28] 癌が、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または膵臓癌である、請求項 2 7 に記載の方法。

[請求項29] 血液癌が、急性骨髄性白血病、未分化大細胞型リンパ腫、急性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫、または非ホジキンリンパ腫である、請求項 2 8 に記載の方法。

[請求項30] C D 3 3 陽性細胞が関与する疾患を治療するための、請求項 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載のモノクローナル抗体または該抗体の断片の使用。

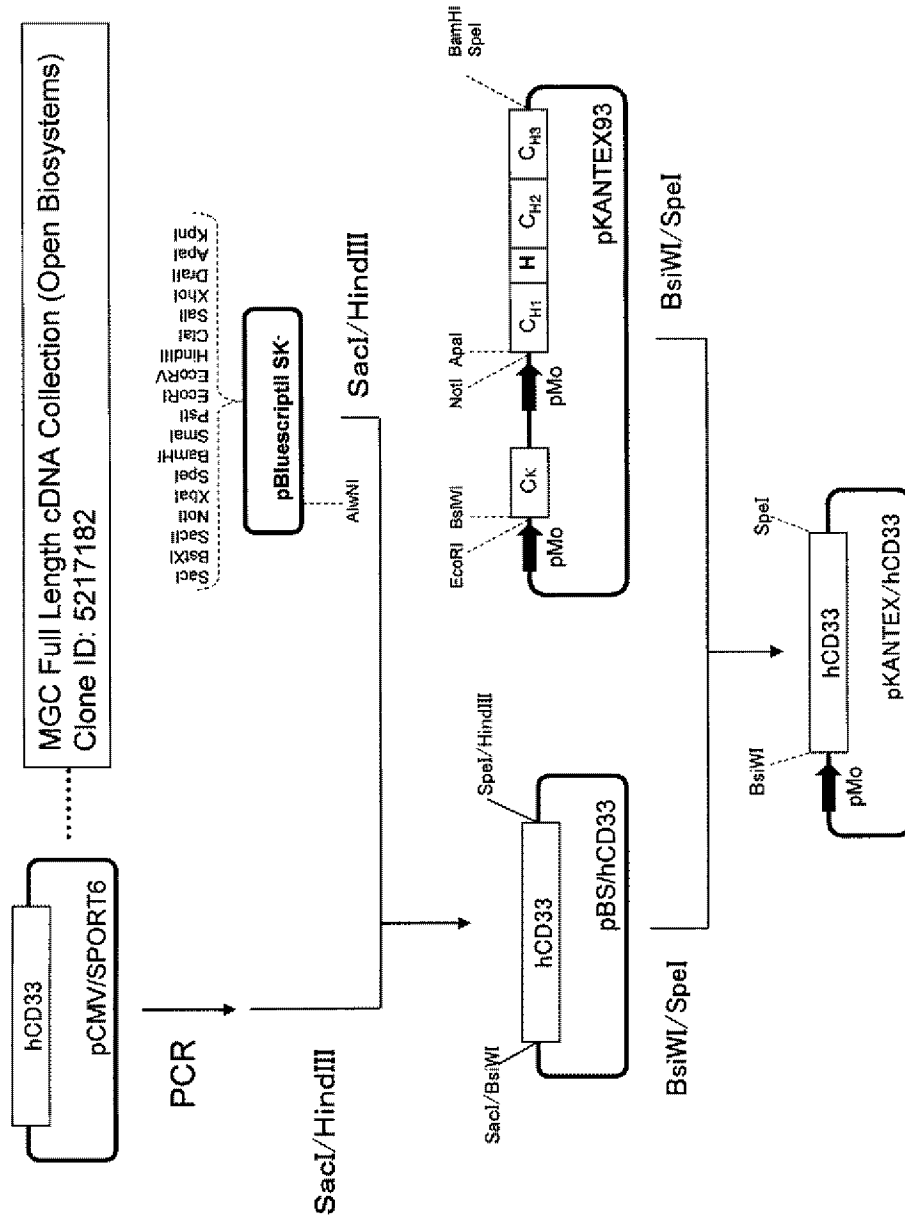
[請求項31] C D 3 3 陽性細胞が関与する疾患が、癌、自己免疫疾患またはアレルギー性疾患である、請求項 3 0 に記載の使用。

[請求項32] 癌が、血液癌、乳癌、子宮癌、大腸癌、食道癌、胃癌、卵巣癌、肺癌、腎臓癌、直腸癌、甲状腺癌、子宮頸癌、小腸癌、前立腺癌または

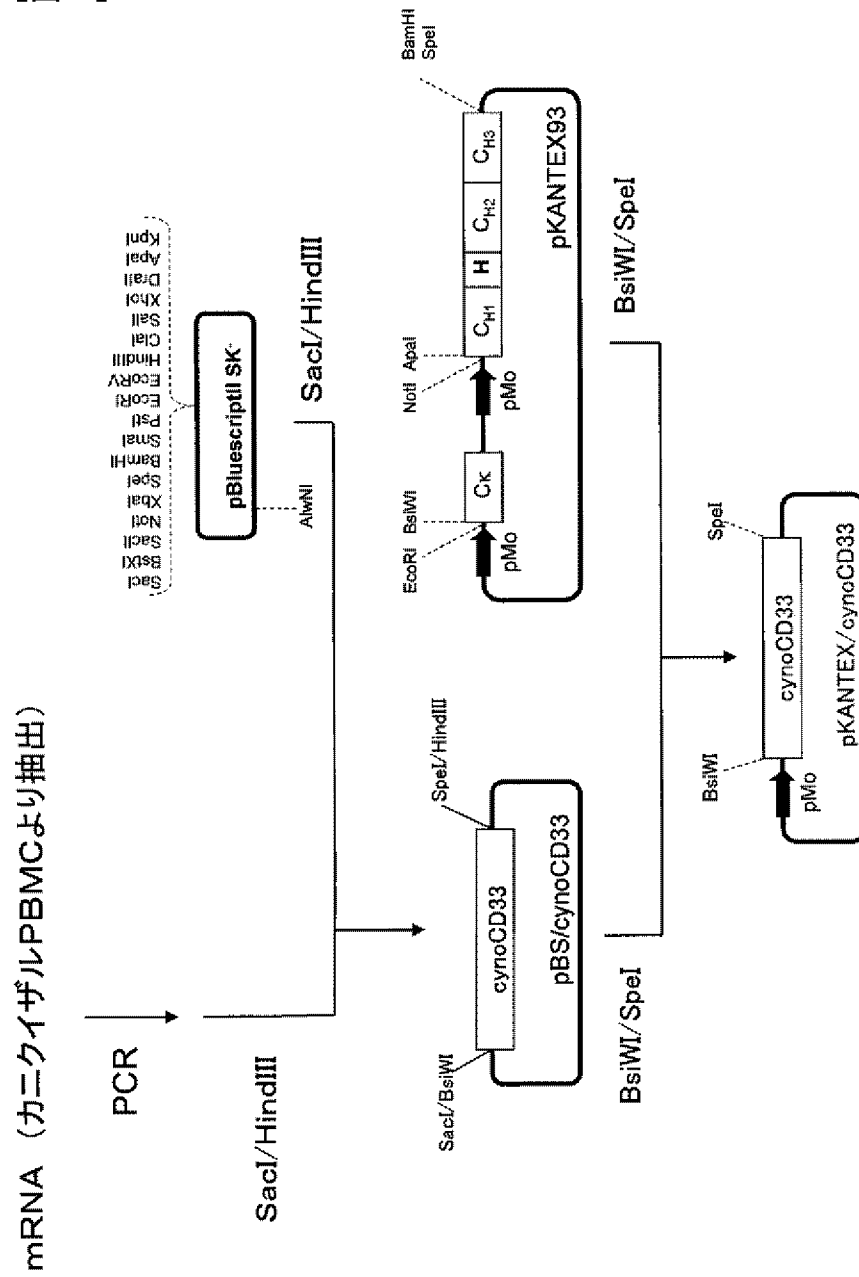
脾臓癌である、請求項 3 1 に記載の使用。

[請求項33] 血液癌が、急性骨髄性白血病、未分化大細胞型リンパ腫、急性リンパ性白血病、骨髄異形成症候群、多発性骨髄腫、ホジキンリンパ腫または非ホジキンリンパ腫である、請求項 3 2 に記載の使用。

[1A]

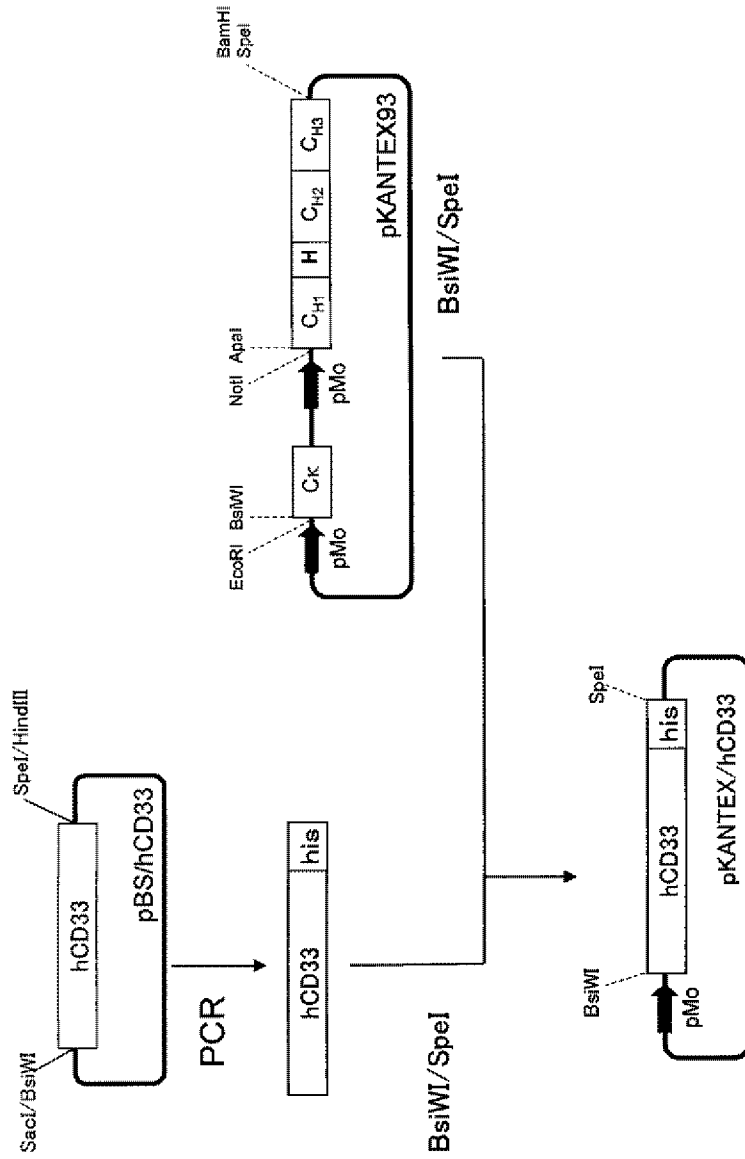


[図1B]

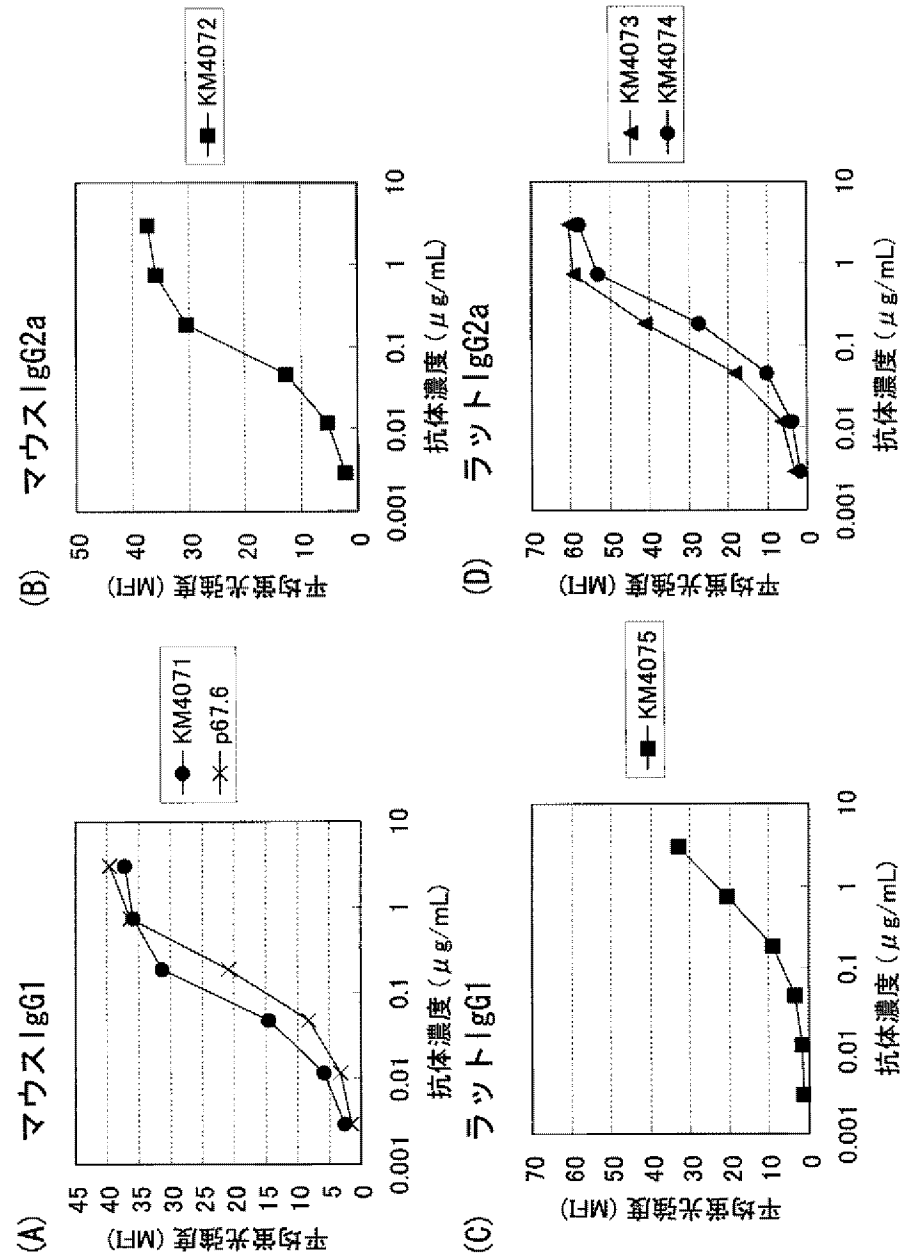


[illegible]

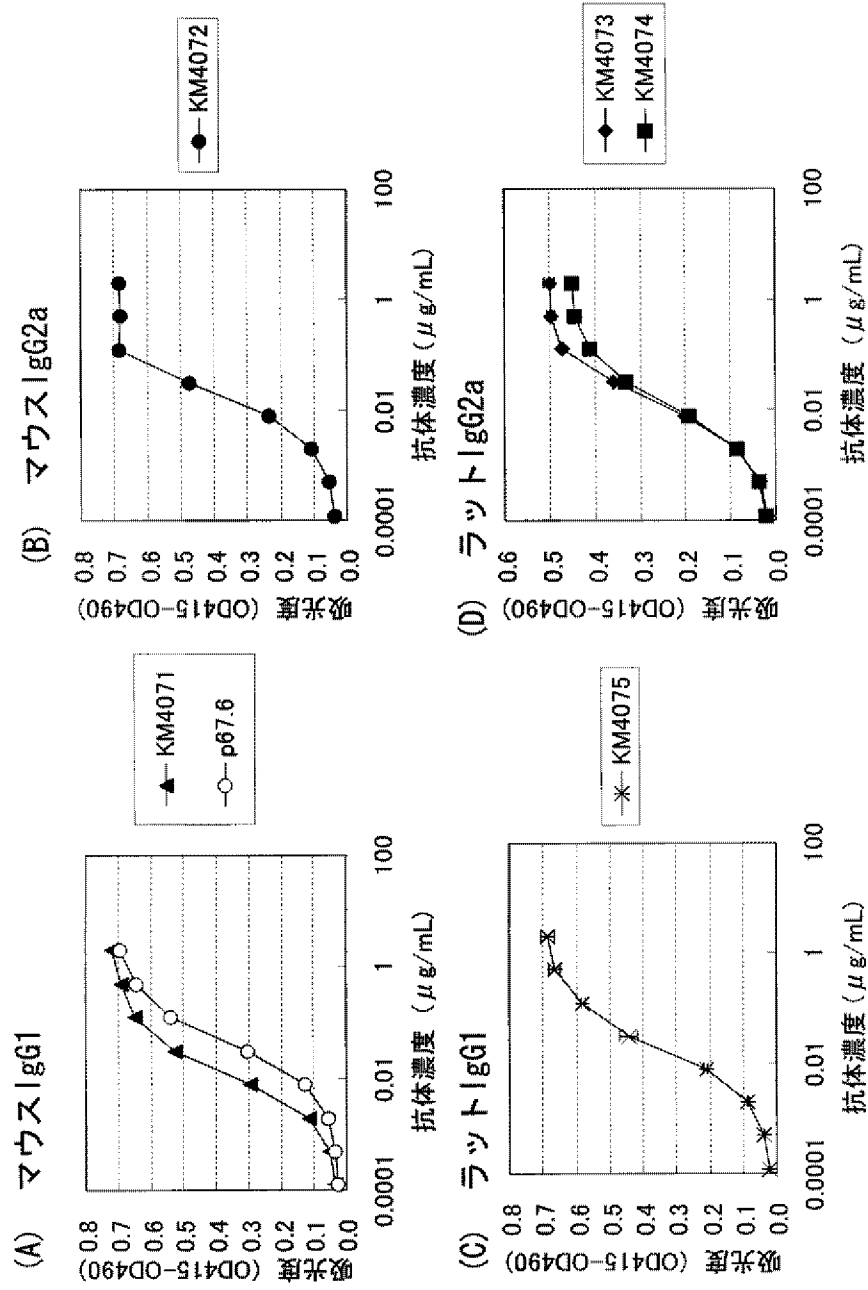
[図2]



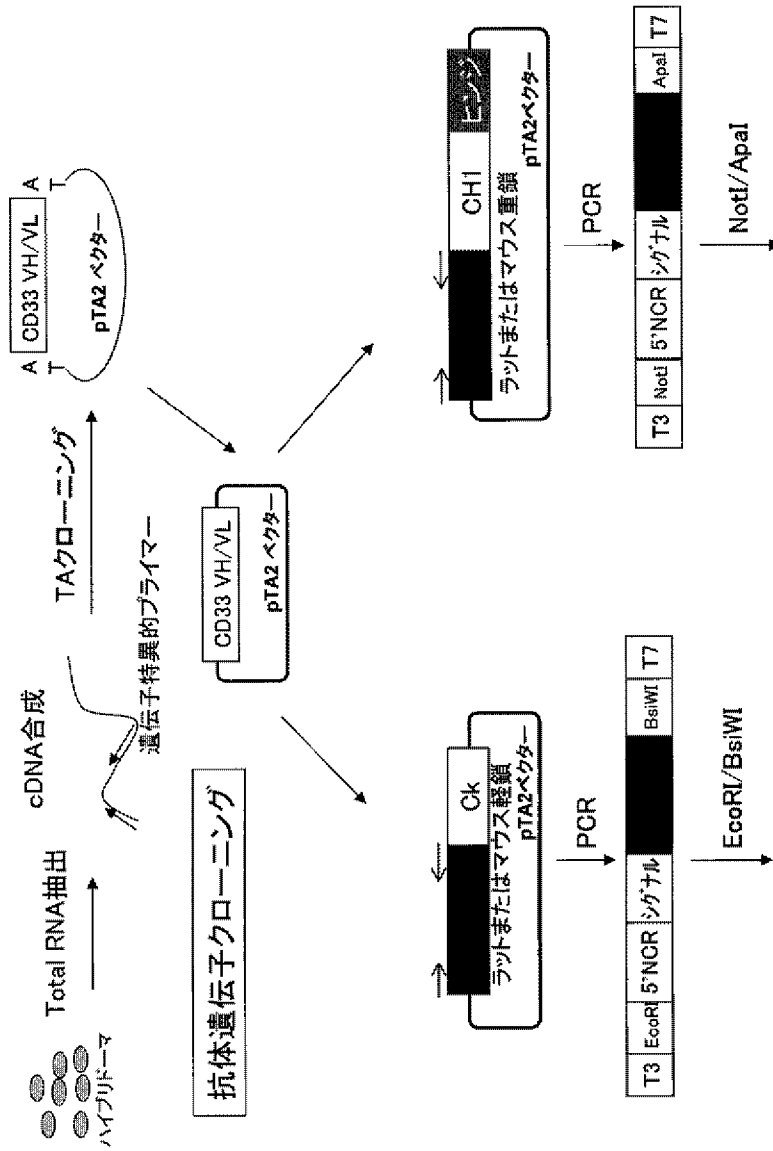
[図3]



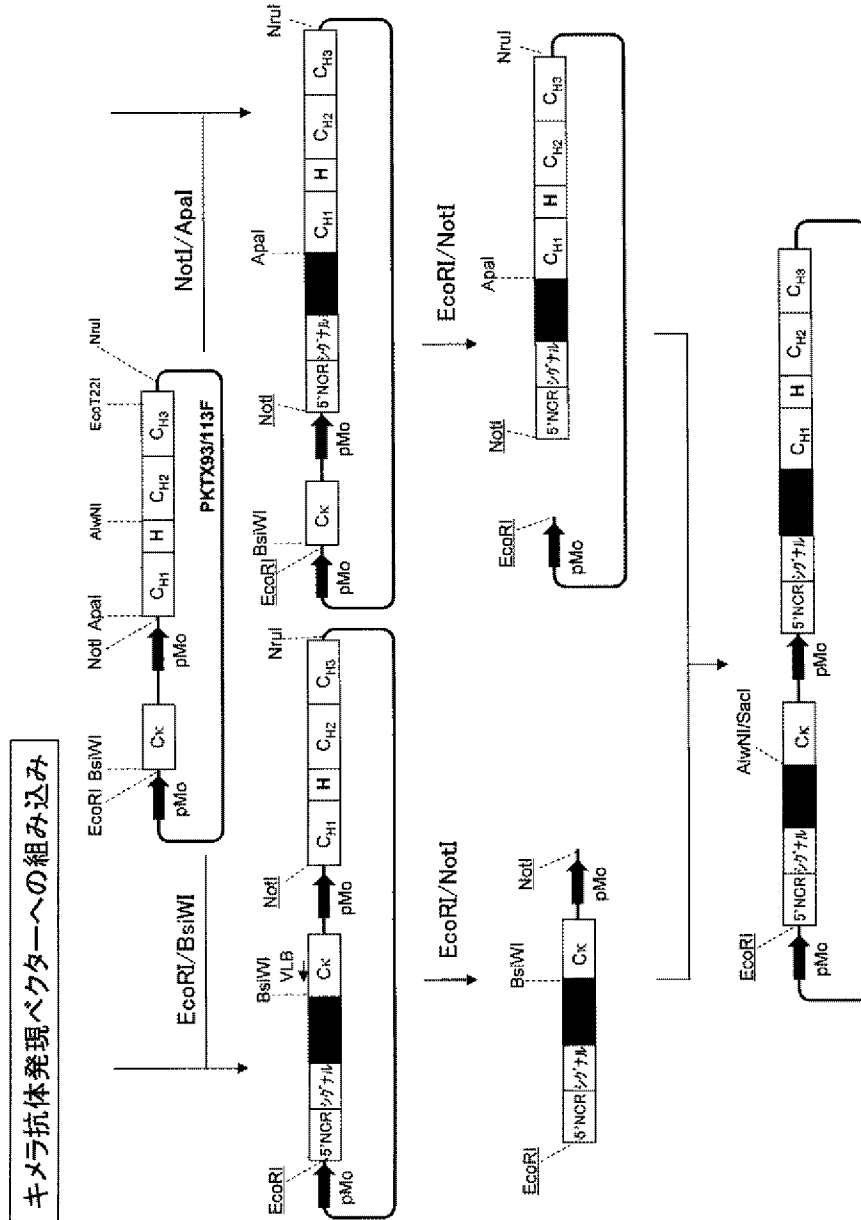
[図4]



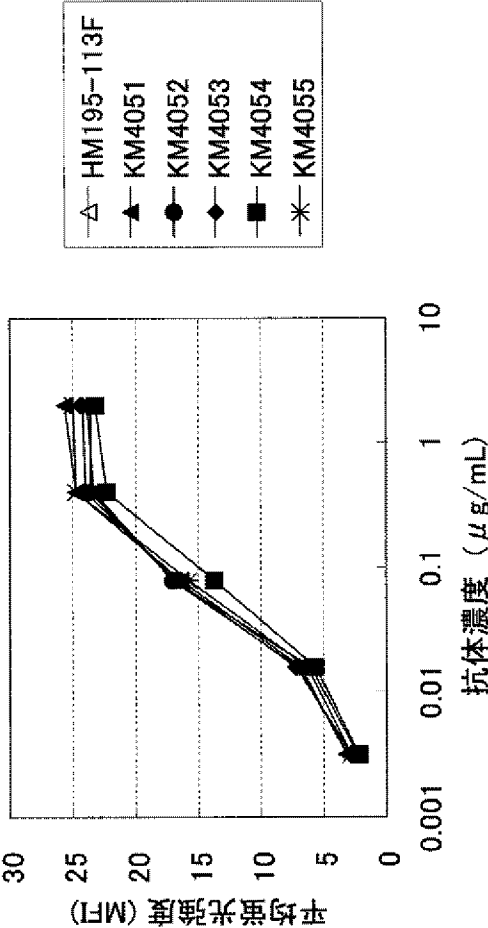
[図5A]



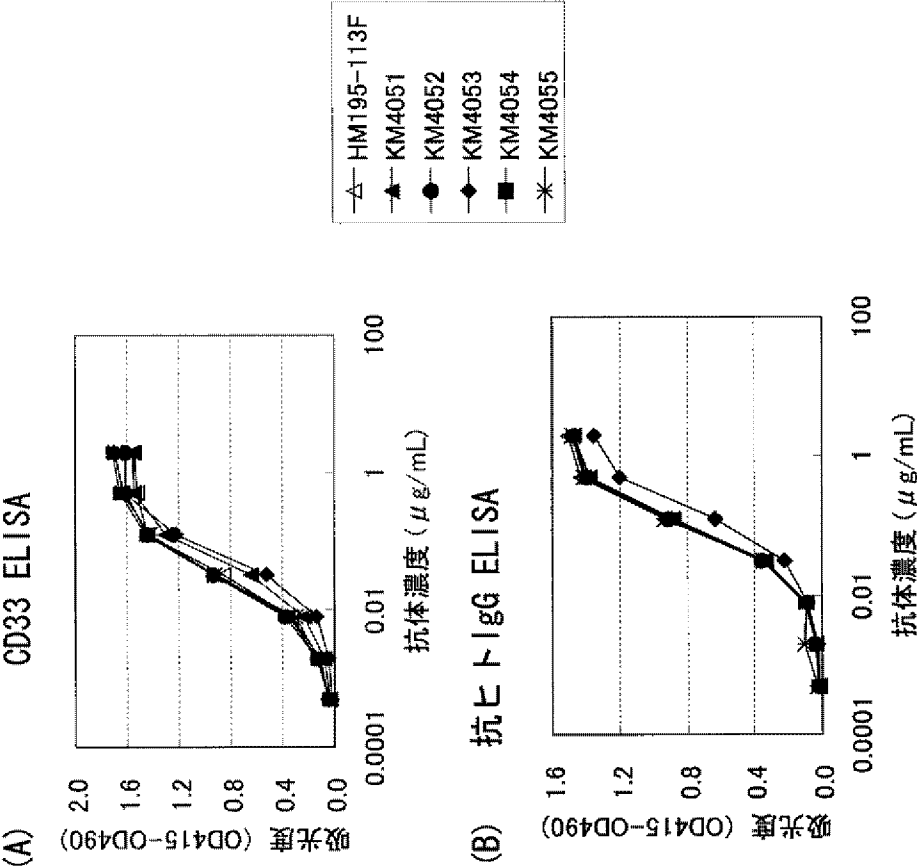
[図5B]



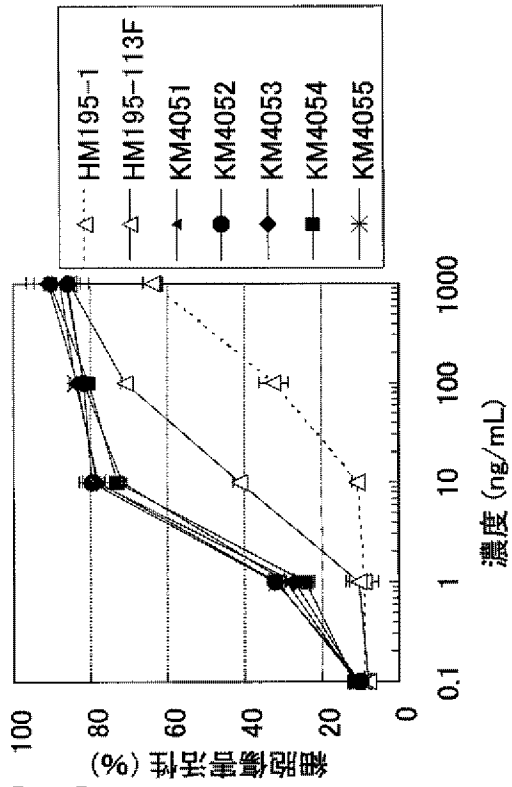
[図6]



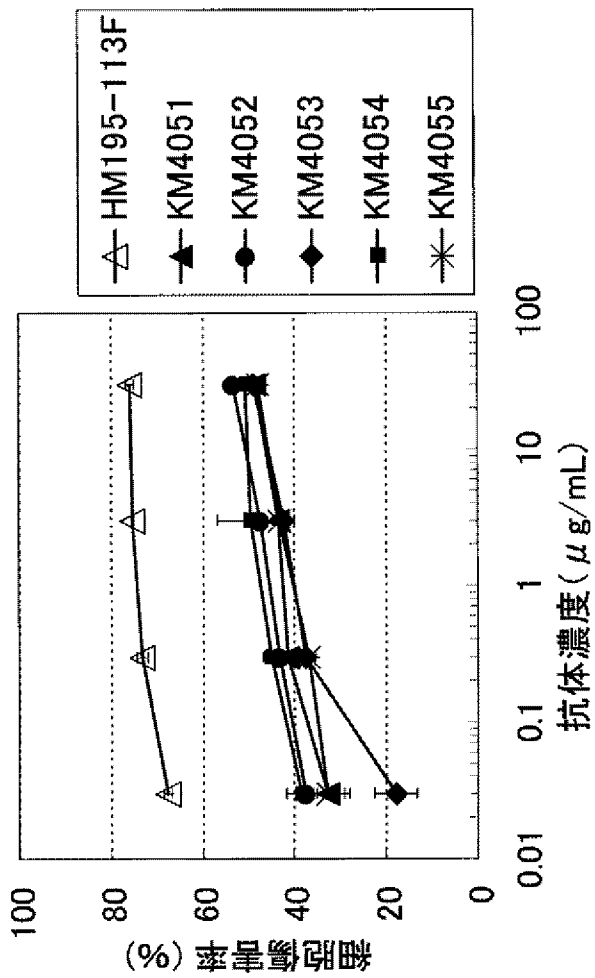
[図7]



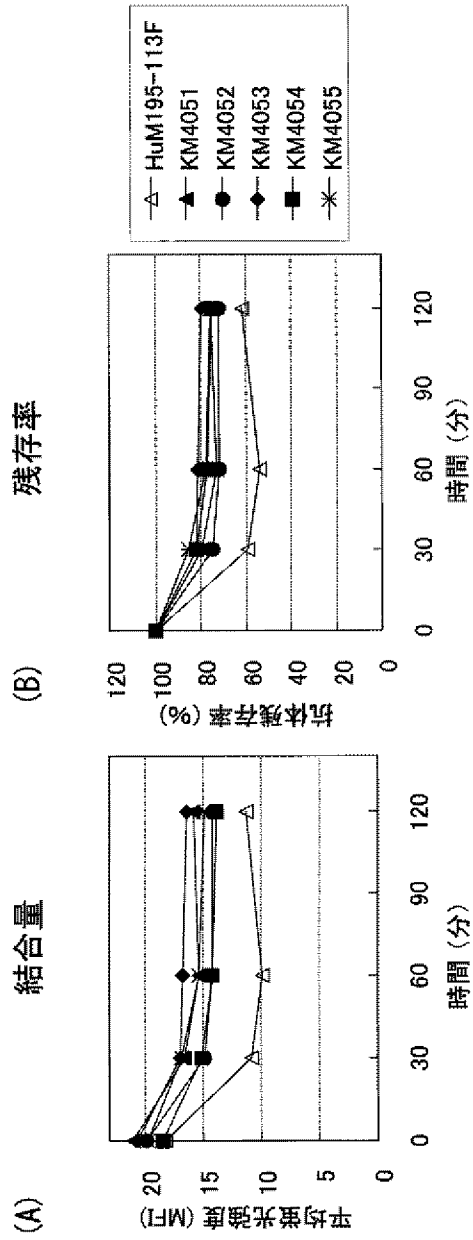
[図8]



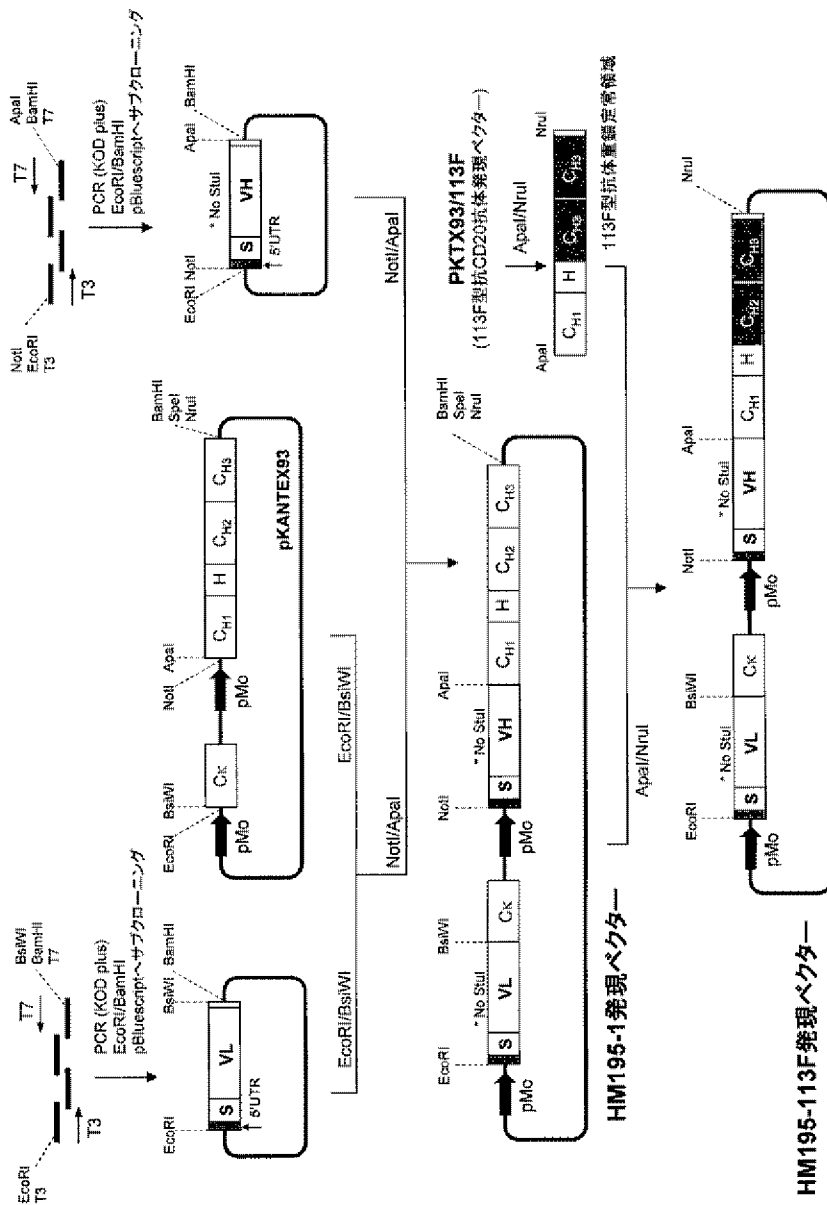
[図9]



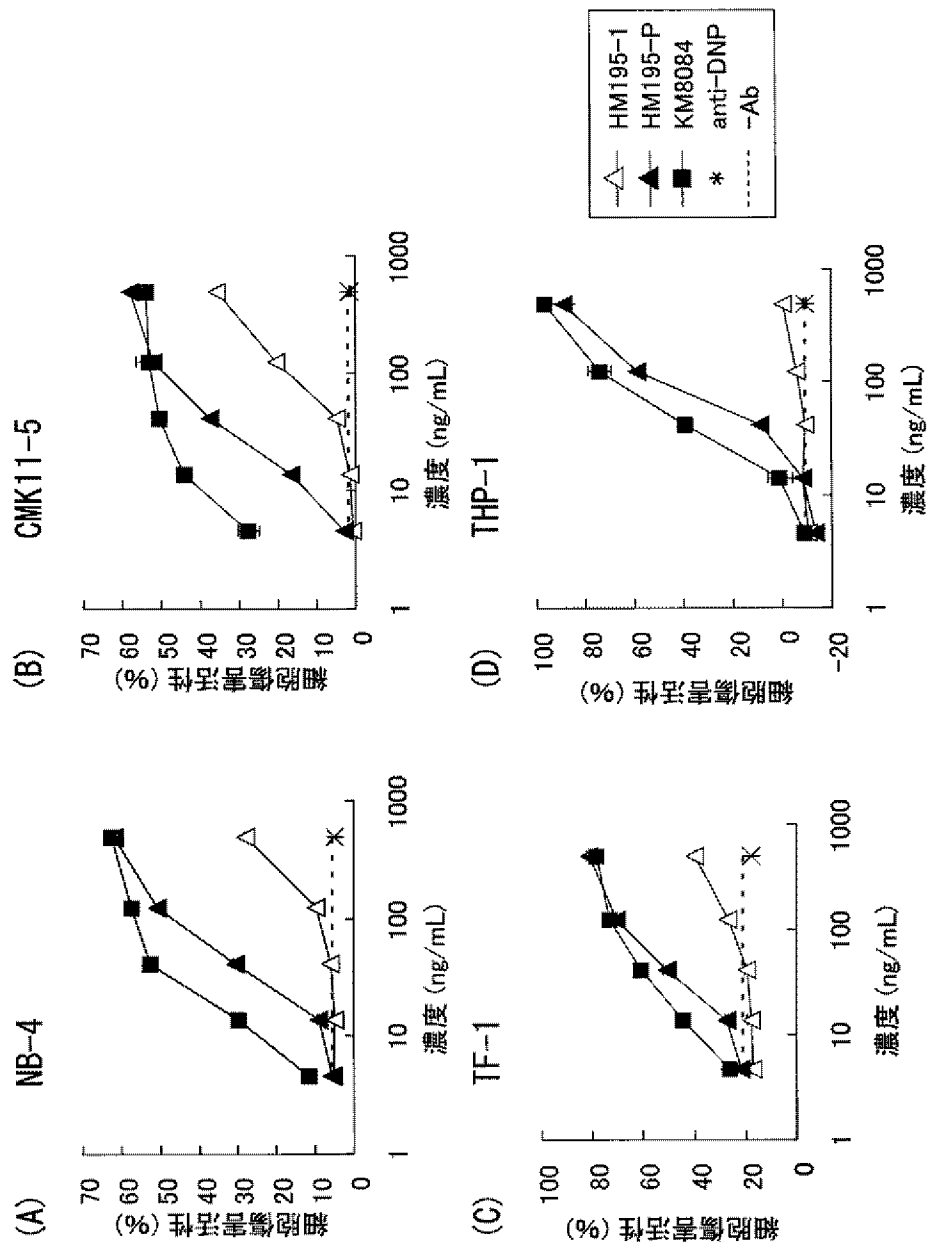
[図10]



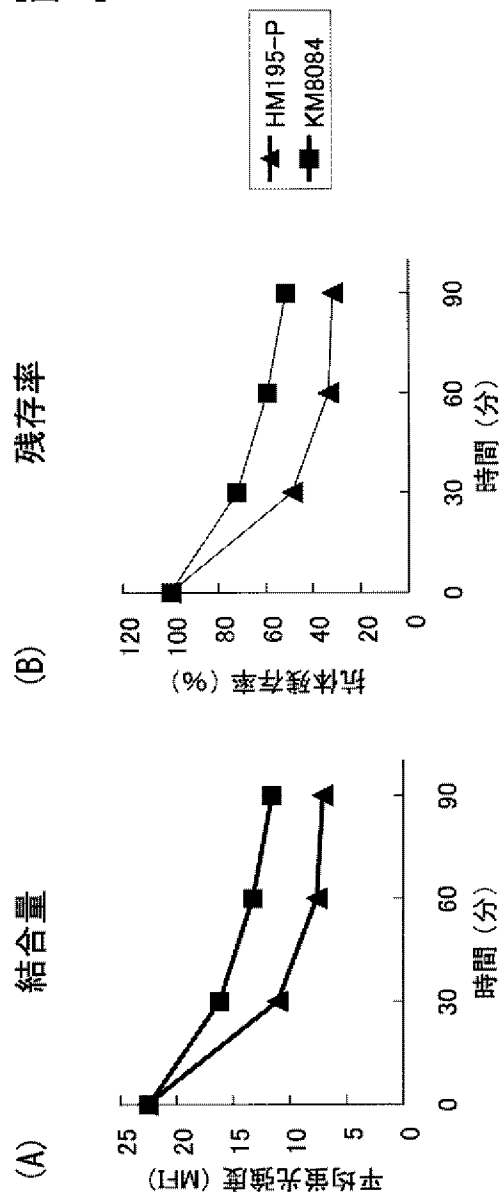
[図11]



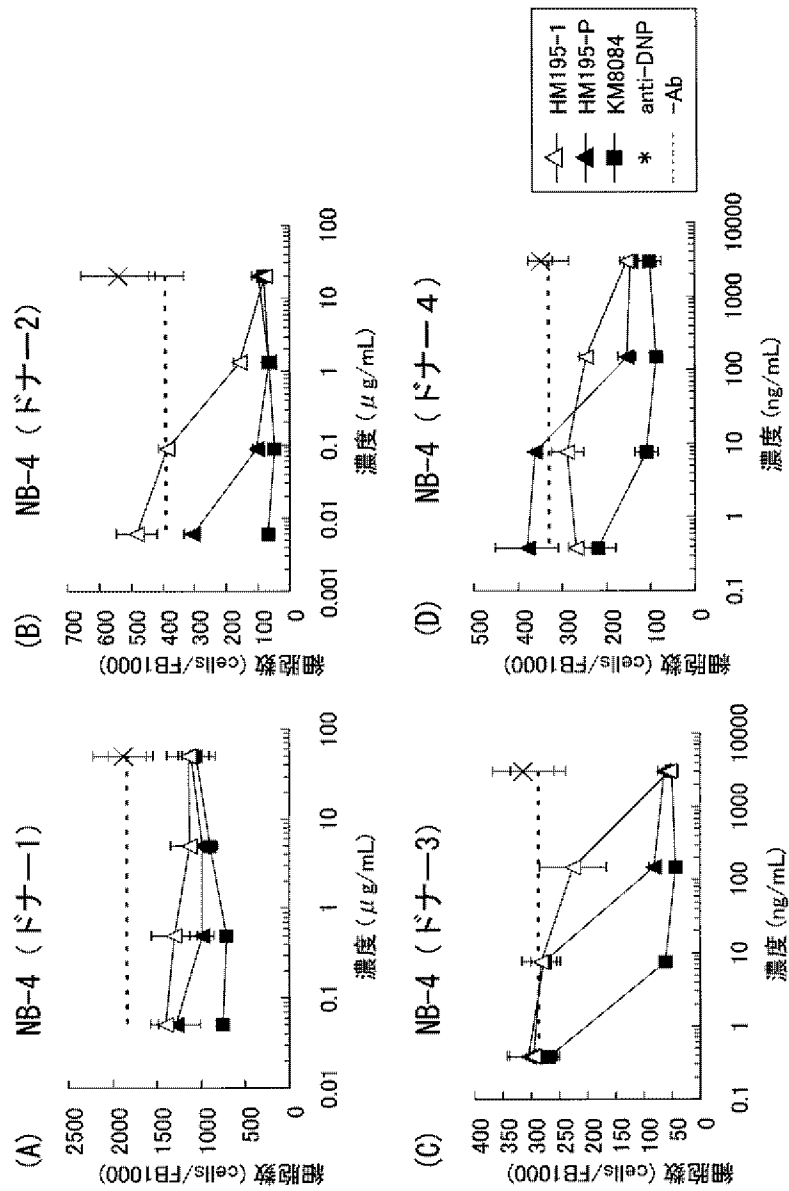
[図12]



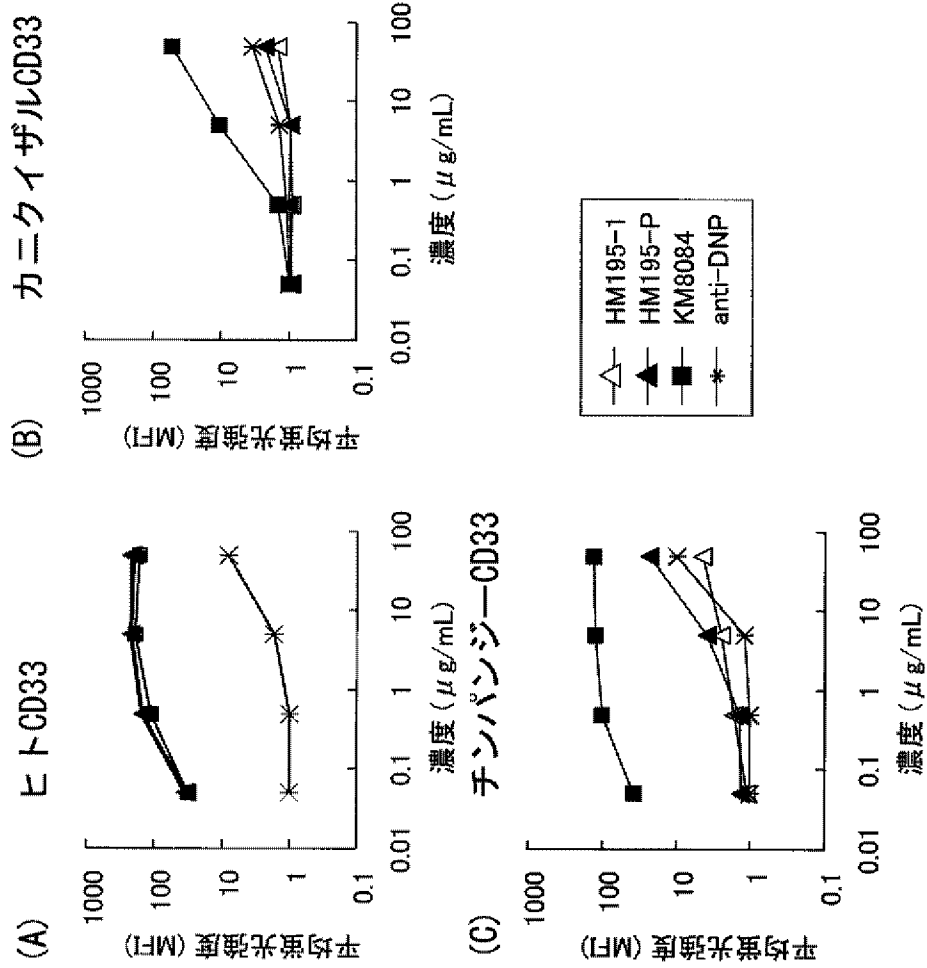
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/00, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N5/10, C12P21/08

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

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

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS (STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 6-503963 A (Protein Design Labs, Inc.), 12 May 1994 (12.05.1994), example III; pages 19 to 21 & US 5530101 A & EP 566647 A1 & WO 1992/011018 A1	1-25
Y	HAMANN, P. R. et al., Gemtuzumab Ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody- calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia, Bioconjugate Chem., 2002, Vol.13, pp.47-58	1-25
Y	JP 2006-505277 A (Immunogen, Inc.), 16 February 2006 (16.02.2006), examples 1 to 3; fig. 17 & WO 2004/043344 A2 & US 2005/0118183 A1 & EP 1578446 A2	1-25



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
16 December, 2011 (16.12.11)

Date of mailing of the international search report
10 January, 2012 (10.01.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077924

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2007-532139 A (Macrogenics, Inc.), 15 November 2007 (15.11.2007), paragraphs [0162] to [0163]; examples; fig. 23 to 24 & WO 2005/115452 A2 & US 2005/0260213 A1 & EP 1747237 A2	1-25
Y	Masamichi KOIKE, "2. Daini Sedai no Kotai Ryoho 1) Ko-Shuyo Koka o Takameru Kufu", Medicine and drug journal, 2003, vol.39, no.1, pages 81 to 84	1-25
Y	WO 2005/035586 A1 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.), 21 April 2005 (21.04.2005), pages 7, 91 & US 2008/0241884 A1 & EP 1688439 A1	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/077924

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 26-33
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The inventions set forth in claims 26 to 33 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter on which this International Searching Authority is not required to carry out a search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet (2)

Claim 1 discloses four kinds of monoclonal antibodies (i) to (iv) wherein CDRs 1 and 3 in the heavy chain variable region respectively comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:52 and 54 and CDRs 1, 2 and 3 in the light chain variable region respectively comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:55, 56 and 57.

Claim 2 discloses a monoclonal antibody wherein CDRs 1 and 3 in the heavy chain variable region respectively comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:52 and 54 and CDRs 1, 2 and 3 in the light chain variable region respectively comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 55, 56 and 57.

Claim 5 discloses five kinds of monoclonal antibodies, i.e., monoclonal antibody (iv) wherein CDRs 1 and 3 in the heavy chain variable region respectively comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:52 and 54 and CDRs 1, 2 and 3 in the light chain variable region respectively comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS: 55, 56 and 57, and monoclonal antibodies (i) to (iii) and (v) having no common structure to each other.

Since there is no important structural element common to the five kinds of monoclonal antibodies, i.e., the monoclonal antibodies claimed in claim 1 and monoclonal antibodies (i) to (iii) and (v) claimed in claim 5 and antibodies against CD33 have been known from the prior art, there is no special technical feature among the five monoclonal antibodies as described above. Thus, the requirement of unity of invention is not fulfilled.

The inventions of claims 1-25 have the following five invention groups.

(Invention group 1) Inventions of claims 1-4, 17 and 19 and parts of inventions of claims 5-16, 18 and 20-25

Inventions relating to "monoclonal antibodies wherein CDRs 1 and 3 in the heavy chain variable region respectively comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:52 and 54 and CDRs 1, 2 and 3 in the light chain variable region respectively comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:55, 56 and 57".

(Invention group 2) Parts of inventions of claims 5-16, 18 and 20-25

Inventions relating to "a monoclonal antibody wherein CDRs 1 to 3 in the heavy chain variable region comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:34 to 36 respectively in this order, and CDRs 1 to 3 in the light chain variable region comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:37 to 39 respectively in this order".

(Invention group 3) Parts of inventions of claims 5-16, 18 and 20-25

Inventions relating to "a monoclonal antibody wherein CDRs 1 to 3 in the heavy chain variable region comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:40 to 42 respectively in this order, and CDRs 1 to 3 in the light chain variable region comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:43 to 45 respectively in this order".

(Invention group 4) Parts of inventions of claims 5-16, 18 and 20-25

Inventions relating to "a monoclonal antibody wherein CDRs 1 to 3 in the heavy chain variable region comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:46 to 48 respectively in this order, and CDRs 1 to 3 in the light chain variable region comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:49 to 51 respectively in this order".

(Invention group 5) Parts of inventions of claims 5-16, 18 and 20-25

Inventions relating to "a monoclonal antibody wherein CDRs 1 to 3 in the heavy chain variable region comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:58 to 60 respectively in this order, and CDRs 1 to 3 in the light chain variable region comprise the amino acid sequences represented by SEQ ID NOS:61 to 63 respectively in this order".

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, A61P37/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61P35/00, A61P37/00, C07K16/28, C12N1/15, C12N1/19, C12N5/10, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN), JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 6-503963 A (プロテイン デザイン ラプス, インコーポレイティド) 1994.05.12, 例 III、p.19-21 & US 5530101 A & EP 566647 A1 & WO 1992/011018 A1	1-25
Y	HAMANN, P. R. et al., Gemtuzumab Ozogamicin, a potent and selective anti-CD33 antibody-calicheamicin conjugate for treatment of acute myeloid leukemia, Bioconjugate Chem., 2002, Vol.13, pp.47-58	1-25

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

1 6 . 1 2 . 2 0 1 1

国際調査報告の発送日

1 0 . 0 1 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

藤井 美穂

4 N

4 4 3 4

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2006-505277 A (イミュノジェン・インコーポレーテッド) 2006.02.16, 実施例1-3、図17 & WO 2004/043344 A2 & US 2005/0118183 A1 & EP 1578446 A2	1-25
Y	JP 2007-532139 A (マクロジェニクス, インコーポレーテッド) 2007.11.15, 【0162】-【0163】、実施例、図23-24 & WO 2005/115452 A2 & US 2005/0260213 A1 & EP 1747237 A2	1-25
Y	小池正道, 2. 第二世代の抗体療法 1) 抗腫瘍効果を高める工夫, 医薬ジャーナル, 2003, Vol. 39, No. 1, pp. 81-84	1-25
Y	WO 2005/035586 A1 (協和醗酵工業株式会社) 2005.04.21, p. 7, p. 91 & US 2008/0241884 A1 & EP 1688439 A1	1-25

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求項 2 6 - 3 3 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求項 2 6 - 3 3に係る発明は、人体の治療方法に関するものであるから、国際調査をすることを要しない。
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
特別ページ参照。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

[第 III 欄の続き]

請求項 1 には、重鎖可変領域の CDR 1、3 がそれぞれ、配列番号 52、54 で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR 1、2、3 がそれぞれ配列番号 55、56、57 で示されるアミノ酸配列を含む、(i) ～ (i v) の 4 種類のモノクローナル抗体が記載されている。

請求項 2 には、重鎖可変領域の CDR 1、3 がそれぞれ、配列番号 52、54 で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR 1、2、3 がそれぞれ配列番号 55、56、57 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体が記載されている。

請求項 5 には、重鎖可変領域の CDR 1、3 がそれぞれ、配列番号 52、54 で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR 1、2、3 がそれぞれ配列番号 55、56、57 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体である (i v)、及び、互いに共通の構造を有しない、(i) ～ (i i i)、(v) の 5 種類のモノクローナル抗体が記載されている。

ここで、請求項 1 に記載のモノクローナル抗体、及び、請求項 5 の (i) ～ (i i i)、(v) に記載のモノクローナル抗体という 5 つのモノクローナル抗体は、重要な構造要素を共通しておらず、CD 33 に対する抗体は先行技術により知られているから、上記 5 つのモノクローナル抗体の間には特別な技術的特徴は存在しない。よって、発明の単一性の要件は満足されない。

そして、請求項 1－25 に係る発明には、以下に示す 5 つの発明が含まれる。

(発明 1) 請求項 1－4、17、19 に係る発明、及び、請求項 5－16、18、20－25 に係る発明の一部

「重鎖可変領域の CDR 1、3 がそれぞれ、配列番号 52、54 で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR 1、2、3 がそれぞれ配列番号 55、56、57 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体」に関する発明。

(発明 2) 請求項 5－16、18、20－25 に係る発明の一部

「重鎖可変領域の CDR 1～3 が順に、配列番号 34～36 で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR 1～3 が順に、配列番号 37～39 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体」に関する発明。

(発明 3) 請求項 5－16、18、20－25 に係る発明の一部

「重鎖可変領域の CDR 1～3 が順に、配列番号 40～42 で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR 1～3 が順に、配列番号 43～45 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体」に関する発明。

(発明 4) 請求項 5－16、18、20－25 に係る発明の一部

「重鎖可変領域の CDR 1～3 が順に、配列番号 46～48 で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR 1～3 が順に、配列番号 49～51 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体」に関する発明。

(発明 5) 請求項 5－16、18、20－25 に係る発明の一部

「重鎖可変領域の CDR 1～3 が順に、配列番号 58～60 で示されるアミノ酸配列を含み、軽鎖可変領域の CDR 1～3 が順に、配列番号 61～63 で示されるアミノ酸配列を含むモノクローナル抗体」に関する発明。