(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2013-519375
(P2013-519375A)
(43)公表日　平成25年5月30日(2013.5.30)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N	15/00	ZNAA	4B024
A61K 39/395	(2006.01)	A61K	39/395	T	4B064
A61K 45/00	(2006.01)	A61K	39/395	L	4B065
A61K 49/00	(2006.01)	A61K	45/00		4C084
A61P 35/00	(2006.01)	A61K	49/00	A	4C085

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 159 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2012-552986 (P2012-552986)
(86)(22)出願日　平成23年2月10日 (2011.2.10)
(85)翻訳文提出日　平成24年10月3日 (2012.10.3)
(86)国際出願番号　PCT/US2011/024312
(87)国際公開番号　WO2011/100403
(87)国際公開日　平成23年8月18日 (2011.8.18)
(31)優先権主張番号　61/406,464
(32)優先日　平成22年10月25日 (2010.10.25)
(33)優先権主張国　米国(US)
(31)優先権主張番号　61/303,249
(32)優先日　平成22年2月10日 (2010.2.10)
(33)優先権主張国　米国(US)

(71)出願人　504039155
イミュノジェン・インコーポレーテッド
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４５１，ウォルサム，ウィンター・ストリート　８３０
(74)代理人　100140109
弁理士　小野　新次郎
(74)代理人　100075270
弁理士　小林　泰
(74)代理人　100096013
弁理士　富田　博行
(74)代理人　100092967
弁理士　星野　修
(74)代理人　100128750
弁理士　廣瀬　しのぶ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】ＣＤ２０抗体およびその使用

(57)【要約】
ＣＤ２０は、Ｂ細胞の表面上で発現されるテトラスパニンファミリーの膜貫通タンパク質であり、末梢血ならびにリンパ系組織由来のＢ細胞上で見いだされる。ＣＤ２０発現は、初期プレＢ細胞段階から形質細胞分化段階まで持続する。一方、造血幹細胞、プロＢ細胞、分化型形質細胞または非リンパ系組織上では見られない。正常なＢ細胞における発現に加えて、ＣＤ２０は、非ホジキン（商標）リンパ腫（ＮＨＬ）およびＢ細胞慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）などのＢ細胞由来の悪性腫瘍で発現される。ＣＤ２０発現細胞は、炎症をはじめとする他の疾患および障害に関与することが知られている。本発明は、優れた物理的および機能的特性を有する抗ＣＤ２０抗体、形態および断片；免疫複合体、組成物、診断試薬、成長を阻害する方法、治療法、改善された抗体および細胞系；ならびにこれをコード化するポリヌクレオチド、ベクターおよび遺伝子構築物を含む。
【選択図】図１

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ＣＤ２０と特異的に結合する抗体またはその断片であって、アポトーシス、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導することができる、抗体またはその断片。
【請求項２】
前記抗体または断片が、ネズミ、非ヒト、ヒト化、キメラ、再表面化またはヒトである、請求項１記載の抗体または断片。
【請求項３】
抗体または断片がモノクローナルまたは単鎖である、請求項１記載の抗体または断片。
【請求項４】
ハイブリドーマ（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０４８６）またはハイブリドーマ（ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０４８７）により産生される、抗体またはその断片。
【請求項５】
ほ乳類、酵母、昆虫、植物または細菌細胞からなる群から選択される真核性または原核性宿主細胞から得られる、請求項１記載の抗体またはその断片。
【請求項６】
前記ほ乳類細胞が、ＣＨＯ、ＮＳ０、ＳＰ２／０、ＰＥＲ．Ｃ６またはＨＥＫ－２９３細胞である、請求項５記載の抗体またはその断片。
【請求項７】
前記酵母細胞が、ピキア・パストリス（Pichia pastoris）またはサッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）細胞である、請求項５記載の抗体またはその断片。
【請求項８】
前記昆虫細胞がＳｆ－９細胞である、請求項５記載の抗体またはその断片。
【請求項９】
前記植物細胞がアオウキクサ属（Lemna）細胞である、請求項５記載の抗体またはその断片。
【請求項１０】
前記細菌細胞が大腸菌（E.coli）細胞である、請求項５記載の抗体またはその断片。
【請求項１１】
抗体または断片が、ＣＤ２０の第３および第４膜貫通ドメイン間に位置するアミノ酸残基を含む少なくとも１つのアミノ酸と特異的に結合する、請求項１記載の抗体または断片。
【請求項１２】
細胞傷害性薬物と結合する請求項１記載の抗体または断片を含む複合体。
【請求項１３】
前記細胞傷害性薬物が、メイタンシノイド、メイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキソイド、ＣＣ－１０６５、ＣＣ－１０６５類似体、ズオカルマイシン、ズオカルマイシン類似体、カリケアマイシン、ドラスタチン、ドラスタチン類似体、アリスタチン（aristatin）、トマイマイシン誘導体およびレプトマイシン誘導体からなる群から選択される、請求項１２記載の複合体、または前記複合体のプロドラッグ。
【請求項１４】
請求項１記載の抗体または断片および薬剤的に許容される担体を含む医薬組成物。
【請求項１５】
請求項１２記載の複合体および薬剤的に許容される担体を含む医薬組成物。
【請求項１６】
請求項１２記載の複合体を含む診断試薬であって、前記抗体または断片が標識されている、診断試薬。
【請求項１７】

前記標識が放射標識、フルオロフォア、発色団、造影剤および金属イオンからなる群から選択される、請求項１６記載の診断試薬。

【請求項１８】

抗体または断片が、配列番号４５のアミノ酸、またはＧＩ２１３３０９８９、ＧｅｎＢａｎｋ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　ＩＤ２３１１０９８９のいずれか１つに対応する配列を含む少なくとも１つのアミノ酸と特異的に結合する、請求項１記載の抗体または断片。

【請求項１９】

前記抗体または断片がＣＤ２０を発現する細胞の死を誘導することができる、請求項１記載の抗体または断片。

【請求項２０】

前記抗体または前記断片が、架橋剤の非存在下でアポトーシスを実質的に誘導する能力を有し、そして脂質ラフト中へのＣＤ２０の再分布を引き起こし、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を実質的に誘導する能力を有するＩＩＩ型抗体である、請求項１記載の抗体または断片。

【請求項２１】

抗体またはその断片がウェスタンブロットにおいて前記ＣＤ２０と特異的に結合する、請求項１記載の抗体または断片。

【請求項２２】

抗体またはその断片がＥＬＩＳＡにおいて前記ＣＤ２０と特異的に結合する、請求項１記載の抗体または断片。

【請求項２３】

抗体またはその断片がフローサイトメトリーアッセイにおいて前記ＣＤ２０と特異的に結合する、請求項１記載の抗体またはその断片。

【請求項２４】

前記抗体または断片が、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、単鎖Ｆｖ、すなわちｓｃＦｖ、ジスルフィド結合Ｆｖ、Ｖ－ＮＡＲドメイン、ＩｇＮａｒ、細胞内抗体、ＩｇＧΔＣＨ２、ミニボディ（minibiody）、Ｆ（ａｂ’）$_3$、四重特異性抗体、三重特異性抗体、二重特異性抗体、単一ドメイン抗体、ＤＶＤ－Ｉｇ、Ｆｃａｂ、ｍＡｂ^2、（ｓｃＦｖ）$_2$、またはｓｃＦｖ－Ｆｃを含む、請求項１記載の抗体または断片。

【請求項２５】

免疫グロブリン重鎖定常領域を含む、請求項１記載の抗体または断片。

【請求項２６】

前記免疫グロブリン重鎖定常領域が、ＩｇＧ１定常領域、ＩｇＧ２定常領域、ＩｇＧ３定常領域およびＩｇＧ４定常領域からなる群から選択される、請求項２５記載の抗体または断片。

【請求項２７】

前記細胞がＢ細胞由来である、請求項１９記載の抗体。

【請求項２８】

前記細胞がガン細胞である、請求項１９記載の抗体。

【請求項２９】

前記ガン細胞が、Ｂ細胞リンパ腫、ＮＨＬ、前駆体Ｂ細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫および成熟Ｂ細胞新生物、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、低悪性度、中悪性度および高悪性度（ＦＬ）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、ＭＡＬＴ型辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、節性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、脾臓型辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞性骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンストレームマクログロブリン血症、および未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ）からなる群から選択される、請求項２８記載の抗体。

【請求項３０】

前記細胞が望まれない免疫応答に影響を及ぼす、請求項１９記載の抗体または断片。
【請求項３１】
前記細胞が炎症に影響を及ぼす、請求項１９記載の抗体または断片。
【請求項３２】
前記抗体または断片が、少なくとも約４８％のＲａｍｏｓリンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が、架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。
【請求項３３】
前記抗体または断片が、少なくとも約４８％のＲａｍｏｓリンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含み；そして前記抗体が約０．０１８μｇ／ｍＬ以下のＥＣ$_{50}$でＲａｍｏｓリンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅がＣＤＣを含む、請求項１記載の抗体。
【請求項３４】
前記抗体または断片が少なくとも約４８％のＲａｍｏｓリンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅は架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含み；そして前記抗体または断片がＲａｍｏｓリンパ腫細胞を約０．０１８μｇ／ｍＬ以下のＥＣ$_{50}$で殺滅することができ、前記殺滅がＣＤＣを含み；そして前記抗体または断片がＣＤ２０を前記細胞の膜の脂質ラフトコンパートメント中に移動させることができる、請求項１記載の抗体。
【請求項３５】
前記抗体または断片が少なくとも約５３％のＲａｊｉリンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。
【請求項３６】
前記抗体または断片が少なくとも約３４％のＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。
【請求項３７】
前記抗体または断片が少なくとも約３４％のＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含み；前記抗体または前記断片がＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞を約０．５８μｇ／ｍＬ以下のＥＣ$_{50}$で殺滅することができ、前記殺滅がＣＤＣを含む、請求項１記載の抗体。
【請求項３８】
前記抗体または断片が少なくとも約１２％のＪｅｋｏ－１リンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。
【請求項３９】
前記抗体または断片が少なくとも約４０％のＧｒａｎｔａ－５１９リンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。
【請求項４０】
前記抗体または断片がＣＤ２０上のエピトープと結合し、前記エピトープが位置１７０および／または１７２でアミノ酸残基プロリンを含まないかまたは必要としない、および／または前記エピトープが位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを含むかまたは必要とする、請求項１記載の抗体。
【請求項４１】
前記抗体または断片がＣＤ２０のエピトープと結合し、前記エピトープが位置１７０および／または１７２でアミノ酸残基プロリンを含まないかまたは必要としない、および／または前記エピトープが位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを含むかまたは必要とし；そして前記抗体または断片が少なくとも約４８％のＲａｍｏｓリンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。
【請求項４２】
前記抗体または断片がＣＤ２０のエピトープと結合し、前記エピトープが位置１７０お

よび／または１７２でアミノ酸残基プロリンを含まないかまたは必要としない、および／または前記エピトープが位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを有するＣＤ２０エピトープを含むかまたは必要とし；そして前記抗体または断片が少なくとも約５３％のＲａｊｉリンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。

【請求項４３】

前記抗体または断片がＣＤ２０上のエピトープと結合し、前記エピトープが位置１７０および／または１７２でアミノ酸残基プロリンを含まないかまたは必要としない、および／または前記エピトープが位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを含むかまたは必要とし；そして前記抗体または断片が少なくとも約３４％のＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。

【請求項４４】

前記抗体または断片がＣＤ２０上のエピトープと結合し、前記エピトープが位置１７０および／または１７２でアミノ酸残基プロリンを含まないかまたは必要としない、および／または前記エピトープが位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを含むかまたは必要とし；そして前記抗体または断片が、少なくとも約１２％のＪｅｋｏ－１リンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。

【請求項４５】

前記抗体または断片がＣＤ２０上のエピトープと結合し、前記エピトープが位置１７０および／または１７２でアミノ酸残基プロリンを含まないかまたは必要としない；および／または前記エピトープが位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを含むかまたは必要とし；そして前記抗体または断片が少なくとも約４０％のＧｒａｎｔａ－５１９リンパ腫細胞を殺滅することができ、前記殺滅が架橋剤の非存在下でのアポトーシスを含む、請求項１記載の抗体。

【請求項４６】

配列番号２５～３０および１７～２２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも１つの相補性決定領域を含む抗体またはその断片。

【請求項４７】

前記抗体または前記断片がＣＤ２０と結合する、請求項４６記載の抗体または断片。

【請求項４８】

少なくとも１つの重鎖および少なくとも１つの軽鎖を含む抗体またはその断片であって、前記重鎖が、配列番号２０～２２または２８～３０のアミノ酸配列を有する３つの連続した相補性決定領域を含み、前記軽鎖が、配列番号１７～１９または２５～２７のアミノ酸配列を有する３つの連続した相補性決定領域を含む、抗体またはその断片。

【請求項４９】

前記重鎖が、配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する、請求項４８記載の抗体または断片。

【請求項５０】

前記重鎖が配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有する、請求項４８記載の抗体または断片。

【請求項５１】

前記重鎖が配列番号４７、３４、３５または３６のアミノ酸配列を有する、請求項４８記載の抗体または断片。

【請求項５２】

前記軽鎖が配列番号４６、３２または３３により表されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列同一性を有する、請求項４８記載の抗体または断片。

【請求項５３】

前記軽鎖が配列番号４６、３２または３３により表される前記アミノ酸配列と少なくと

も９５％の配列同一性を有する、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項５４】
前記軽鎖が配列番号４６、３２または３３のアミノ酸配列を有する、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項５５】
前記重鎖のアミノ酸配列が配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と比較して１～５の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項５６】
前記重鎖のアミノ酸配列が配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と比較して１～３の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項５７】
前記重鎖のアミノ酸配列が、配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と比較して、３の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項５８】
前記重鎖のアミノ酸配列が配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と比較して２の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項５９】
前記重鎖のアミノ酸配列が配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と比較して１の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項６０】
前記軽鎖のアミノ酸配列が配列番号４６、３２または３３により表されるアミノ酸配列と比較して１～５の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項６１】
前記軽鎖のアミノ酸配列が配列番号４６、３２または３３により表されるアミノ酸配列と比較して１～３の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項６２】
前記軽鎖のアミノ酸配列が配列番号４６、３２または３３により表されるアミノ酸配列と比較して３の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項６３】
前記軽鎖のアミノ酸配列が配列番号４６、３２または３３により表されるアミノ酸配列と比較して、２の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項６４】
前記軽鎖のアミノ酸配列が配列番号４６、３２または３３により表されるアミノ酸配列と比較して、１の保存的置換を含む、請求項４８記載の抗体または断片。
【請求項６５】
ＣＤ２０と特異的に結合する改善された抗体または断片であって、以下：
（ａ）配列番号３２～３６、４６、４７、１７～２２、２５～３０および１～７からなる群から選択される少なくとも１つの配列を含む抗体またはその断片をコード化するＤＮＡを提供し；
（ｂ）少なくとも１つのヌクレオチド突然変異、欠失または挿入を前記ＤＮＡに導入して、前記ＤＮＡによりコード化される前記抗体または抗体断片のアミノ酸配列を変更し；
（ｃ）前記抗体または抗体断片を発現し；
（ｄ）前記改善に関して前記発現された抗体または抗体断片をスクリーニングし、それにより前記改善された抗体または抗体断片を調製すること；
によって調製された、抗体または断片。
【請求項６６】
前記改善がＣＤ２０に関する増大した親和性である、請求項６５記載の抗体または断片。
【請求項６７】
前記少なくとも１つのヌクレオチド突然変異、欠失または挿入が、オリゴヌクレオチド

介在性部位特異的突然変異誘発、カセット式突然変異誘発、エラープローンＰＣＲ、ＤＮＡシャッフリング、および大腸菌のミューテーター株の使用からなる群から選択される方法によってなされる、請求項６５記載の抗体または断片。

【請求項６８】

配列番号１～７および１７～３６からなる群から選択される少なくとも１つのメンバーを含むポリペプチドを含む、抗体またはその断片。

【請求項６９】

前記改善が増大したエフェクター機能である、請求項６５記載の抗体または断片。

【請求項７０】

前記改善が増大したＣＤＣ活性である、請求項６５記載の抗体または断片。

【請求項７１】

前記改善が増大したＡＤＣＣ活性である、請求項６５記載の抗体または断片。

【請求項７２】

前記改善が増大したＡＤＣＣ活性、増大したＣＤＣ活性および増大したエフェクター機能である、請求項６５記載の抗体または断片。

【請求項７３】

前記抗体または断片がトランスジェニック発現宿主から得られ、前記宿主が、トランスジェニックヤギ、ニワトリ、ウシ、または卵からなる、請求項１記載の抗体またはその断片。

【請求項７４】

ガン細胞の成長を阻害するための方法であって、前記細胞を請求項１記載の抗体または断片と接触させることを含む、方法。

【請求項７５】

ガン患者を治療する方法であって、有効量のＣＤ２０と特異的に結合する抗体またはその断片もしくは複合体を前記患者に投与することを含み、前記抗体または断片が、アポトーシス、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導することができる、方法。

【請求項７６】

前記患者に治療薬を投与することをさらに含む、請求項７５記載の方法。

【請求項７７】

前記治療薬が細胞傷害性薬物である、請求項７６記載の方法。

【請求項７８】

ガン患者を治療する方法であって、前記患者に有効量の請求項１９記載の複合体を投与することを含む、方法。

【請求項７９】

前記ガンが、Ｂ細胞リンパ腫、ＮＨＬ、前駆体Ｂ細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫および成熟Ｂ細胞新生物、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、低悪性度、中悪性度および高悪性度（ＦＬ）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、ＭＡＬＴ型辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、節性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、脾臓型辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞性骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンストレームマクログロブリン血症、および未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ）からなる群から選択されるガンである、請求項７５記載の治療法。

【請求項８０】

ガンの疑いのある対象者を診断する方法であって：

前記対象者に請求項１６記載の診断試薬を投与し；そして

前記対象者内での前記試薬の分布を検出すること

を含む、方法。

【請求項８１】

前記ガンが、Ｂ細胞リンパ腫、ＮＨＬ、前駆体Ｂ細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫および成熟Ｂ細胞新生物、Ｂ細胞慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、低悪性度、中悪性度および高悪性度（ＦＬ）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、ＭＡＬＴ型辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、節性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、脾臓型辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞性骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンストレームマクログロブリン血症、および未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ）からなる群から選択されるガンである、請求項８０記載の診断法。

【請求項８２】

自己免疫または炎症性疾患を有する患者を治療する方法であって、前記患者に有効量のＣＤ２０と特異的に結合する抗体またはその断片もしくは複合体を投与することを含み、前記抗体または断片が、アポトーシス、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導することができる、方法。

【請求項８３】

前記自己免疫または炎症性疾患が、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、突発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、自己免疫血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、ＩｇＡ腎症、ＩｇＭ多発性ニューロパチー、重症筋無力症、血管炎、真正糖尿病、レーノー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃炎、橋本病、強直性脊椎炎、Ｃ型肝炎関連クリオグロブリン血症性血管炎、慢性限局性脳炎、水疱性類天疱瘡、血友病Ａ、膜性増殖性糸球体腎炎、成人性および若年性皮膚筋炎、成人性多発筋炎、慢性蕁麻疹、原発性胆汁性肝硬変症、視神経脊髄炎、グレーブス甲状腺疾患、水疱性類天疱瘡、膜性増殖性糸球体腎炎、チャーグ・ストラウス症候群、喘息、乾癬性関節炎、皮膚炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、湿疹、アテローム性動脈硬化症、白血球接着不全、若年型糖尿病、ライター疾患、ベーチェット病、溶血性貧血、アトピー性皮膚炎、ウェゲナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性感染性単球増加症、ＨＩＶおよびヘルペス関連疾患、全身性硬化症、シェーグレン症候群および糸球体腎炎、皮膚筋炎、ＡＮＣＡ、無形成性貧血、自己免疫溶血性貧血（ＡＩＨＡ）、第ＶＩＩＩ因子欠乏症、血友病Ａ、自己免疫好中球減少症、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、臓器移植拒絶反応、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）、自己免疫肝炎、リンパ様間質肺炎（ＨＩＶ）、閉塞性細気管支炎（非移植）、ギラン・バレー症候群、大血管炎、巨細胞（高安）動脈炎、中血管炎、川崎病、および結節性多発動脈炎からなる群から選択される自己免疫または炎症性疾患である、請求項８２記載の方法。

【請求項８４】

請求項１、４、１８および４８のいずれか１項に記載の抗体または断片をコード化するポリヌクレオチド。

【請求項８５】

請求項１、４、１８および４８のいずれか１項に記載の抗体または断片の軽鎖または重鎖をコード化するポリヌクレオチド。

【請求項８６】

請求項８５記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項８７】

前記ベクターが、前記抗体または抗体断片を発現することができる発現ベクターである、請求項８６記載のベクター。

【請求項８８】

請求項８７記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項８９】

ＣＤ２０に特異的に結合するための手段であって、アポトーシス、ＡＤＣＣおよびＣＤＣを誘導することができる、手段。

【請求項９０】
ガン患者を治療する方法であって、前記患者に有効量の請求項１記載の抗体または断片を投与することを含み、前記抗体または断片が放射標識された化合物と結合している、方法。
【請求項９１】
前記細胞傷害性薬物に対する抗体または断片の前記結合が、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、感光性基、ペプチダーゼ不安定性基およびエステラーゼ不安定性基からなる群から選択されるリンカーを介する、請求項１２記載の複合体。
【請求項９２】
リンカーが、３－（２－ピリジルジチオ）プロピオン酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＰＤＰ）、４－（２－ピリジルジチオ）ブタン酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＰＤＢ）、４－（２－ピリジルジチオ）２－スルホブタン酸Ｎ－スクシンイミジル（スルホ－ＳＰＤＢ）、４－（２－ピリジルジチオ）ペンタン酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＰＰ）、２－イミノチオランおよびアセチルコハク酸無水物からなる群から選択される、請求項９１記載の複合体。
【請求項９３】
リンカーが、４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボン酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＭＣＣ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロエート）（ＬＣ－ＳＭＣＣ）、κ－マレイミドウンデカン酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、β－マレイミドプロパン酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＢＭＰＳ）、γ－マレイミド酪酸Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミドカプロン酸Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、Ｎ－（α－マレイミドアセトキシ）－スクシンイミドエステル（ＡＭＡＳ）、スクシンイミジル－６－（β－マレイミドプロピオンアミド）ヘキサノエート（ＳＭＰＨ）、４－（ｐ－マレイミドフェニル）－酪酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＭＰＢ）、Ｎ－（ｐ－マレイミドフェニル）イソシアネート（ＰＭＰＩ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（ヨードアセチル）－アミノベンゾエート（ＳＩＡＢ）、ヨード酢酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＩＡ）、ブロモ酢酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＢＡ）、および３－（ブロモアセトアミド）プロピオン酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＢＡＰ）からなる群から選択される、請求項９１記載の複合体。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
ＣＤ２０およびＣＤ２０イソ型（「ＣＤ２０」）は、Ｂ細胞の表面上で発現されるテトラスパニンファミリーの膜貫通タンパク質であると一般的に理解されている（Valentine et al., J. Biol. Chem., 264(19):11282-11287 (1989); Einfeld et al., EMBO J., 7(3):711-717 (1988)）。ＣＤ２０は、大部分の末梢血Ｂ細胞ならびに種々のリンパ系組織由来のＢ細胞により発現される。ＣＤ２０発現は、一般的に、発生の初期プレＢ細胞段階から発生の形質細胞分化段階まで持続する（Tedder et al., J. Immunol., 135(2):973-979 (1985)）。ＣＤ２０は、一般的に、造血幹細胞、プロＢ細胞、分化型形質細胞または非リンパ系組織などにより発現されない。正常なＢ細胞における発現に加えて、ＣＤ２０は、Ｂ細胞由来の悪性腫瘍、例えば非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）およびＢ細胞慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）（Anderson et al., Blood, 63(6): 1424-1433 (1984)）ならびにＢ細胞免疫障害、自己免疫疾患および炎症性疾患に関与するＢ細胞において発現される。
【背景技術】
【０００２】
ＣＤ２０の正確な機能は明かではないが、ＣＤ２０はカルシウム動員に関与し、カルシウムチャンネルとして機能し得る（Tedder et al., J. Cell Biochem., 14D:195 (1990)）。ＣＤ２０は、Ｂ細胞の活性化および分化に関与し得る（Tedder et al., Eur. J. Imm

unol., 16(8):881-887 (1986))。

【０００３】

ＣＤ２０の発現プロフィールおよび既存のＣＤ２０抗体についての情報により、ＣＤ２０は抗体療法の関心対象の標的となっている。一般的に、ＣＤ２０の抗体はそれらの機能的特性に基づいて分類されることが当該技術分野で知られている。例えば、Ｉ型抗体は、ＣＤ２０を脂質ラフトコンパートメント中に分布させるそれらの能力によって特徴づけられ、キメラ化される場合に、補体依存性細胞傷害（「ＣＤＣ」）を媒介できる（Deans JP, J Biol Chem 1998; 273: 344-8; Cragg MS, Blood 2003;101:1045-52;およびCragg MS Blood. 2004;103:2738-2743）。Ｉ型抗体は、典型的には、抗体が架橋しない限り、それ自体では有効なアポトーシス促進活性を有さない。架橋を必要とするＩ型抗体の例は、リツキシマブおよび２Ｆ２である（Cragg et al., Blood, 101(3):1045-1052 (2003);およびTeeling et al., Blood, 104(6):1793-1800 (2004)）。対照的に、ＩＩ型抗体は、ＣＤ２０を脂質ラフト中に分布させることができない。キメラ化される場合、ＩＩ型抗体は限定されたＣＤＣ活性を有する。ＩＩ型抗体は、それらの強力なアポトーシス促進活性により特徴づけられる。Ｂ１およびＧＡ１０１は、ＩＩ型抗体の例である（Cragg MS, Blood 2003;101:1045-52; Cragg MS Blood. 2004;103:2738-2743);およびUmana et al., Blood, 108:72a, Abstract 229 (2006)）。Ｉ型およびＩＩ型抗体は、潜在的に抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を媒介することができる。

【０００４】

Ｂ細胞リンパ腫などの望まれない細胞によるＣＤ２０の発現を考慮すると、この抗原は、有害なＣＤ２０陽性細胞（例えば、リンパ腫細胞）のターゲティングに有用である。本質的には、そのようなターゲティングは次のように一般化される：Ｂ細胞のＣＤ２０表面抗原に対して特異的な抗体を患者に投与する。これらの抗ＣＤ２０抗体は、正常なＢ細胞および望まれない（例えば、悪性および免疫反応性）Ｂ細胞の両方のＣＤ２０抗原に対して特異的に結合し；ＣＤ２０表面抗原に特異的に結合する抗体は、Ｂ細胞の破壊および枯渇に至る可能性がある。

【０００５】

さらに、ＣＤ２０発現腫瘍細胞を破壊する可能性を有する化学薬品または放射性標識を抗ＣＤ２０抗体と結合させ、その薬剤が腫瘍性Ｂ細胞に特異的に「送達される」ようにすることができる。アプローチに関係なく、主な目的は、望まれない細胞を破壊することであり；具体的なアプローチは、用いられる特定の抗ＣＤ２０抗体により決定することができ、したがって、ＣＤ２０抗原のターゲティングに利用可能なアプローチはかなり異なる可能性がある。リツキシマブ（ＲＩＴＵＸＡＮ（登録商標））抗体は、ＣＤ２０に対する遺伝子改変されたキメラネズミ／ヒトモノクローナル抗体である。リツキシマブは、米国特許第５，７３６，１３７号(Anderson et al.)で「Ｃ２Ｂ８」と呼ばれる抗体である。リツキシマブは、再発性または難治性濾胞性リンパ腫の治療について現在承認されている（Leget et al., Curr. Opin. Oncol., 10:548-551 (1998)）。毎週注入すると、リツキシマブは４８％の全体的な奏効率をもたらしたことが報告されている。しかし、多くの患者はリツキシマブ治療に反応せず、そしてリツキシマブを服用している奏効患者は、最終的には再発し、多くの場合、リツキシマブ治療に対する耐性を発現する。例えば、現在利用可能な療法に対する再発および耐性のために、新しいＣＤ２０に対する薬剤および療法の発見が必要である。

【０００６】

利用可能な抗体の制限のために、リツキシマブの特異的な機能的態様を改善すること目標とするＣＤ２０の次世代の抗体療法が開発中である。例えば、ヒトモノクローナル２Ｆ２抗体であるオファツムマブの場合、改善されたインビトロＣＤＣ活性が、特に、低いＣＤ２０抗原密度を有する細胞において報告されている（Teeling et al., J. Immunol., 177(1):362-371 (2006)）。アフツズマブまたはＧＡ１０１は、インビトロでリツキシマブよりもアポトーシス促進活性が若干改善されていることが報告されているが、ＧＡ１０１はＣＤＣ活性を示さない（Umana P, Blood 2006;108:72a, Abstract 229および国際公開

第２００５／０４４８５９号）。加えて、ＧＡ１０１は、改善されたＡＤＣＣ活性を有する糖鎖工学的に作製されたヒト化抗体である（Umana et al., Blood 2006;108:72a, Abstract 229；および国際公開第２００５／０４４８５９号）。様々な開発段階にある他の化合物は、リツキシマブまたは他の公知抗ＣＤ２０抗体のある固有の特性をわずかに改善することが報告されている。しかし、これまで、当該技術分野で公知の問題に対処する独特の物理的および機能的特徴を有する新規分子は利用できなかった。

【０００７】

リツキシマブはまた、米国で、少なくとも１つのＴＮＦ拮抗物質に対する不適切な反応をする、中から重度の活性ＲＡを有する成人患者の徴候および症状を軽減するために、ＭＴＸとの組み合わせで承認されている。多くの研究は、Ｂ細胞および自己抗体が疾患病態生理学に関与すると思われるＲＡをはじめとする種々の非悪性自己免疫または炎症性疾患におけるリツキシマブの使用に取り組んでいる。Edwards et al., Biochem Soc. Trans. 30:824-828 (2002)。抗ＣＤ２０抗体を用いたＣＤ２０のターゲティングは、例えば、ＲＡ（Leandro et al., Ann. Rheum. Dis. 61:883-888 (2002); Edwards et al., Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9): S46 (2002); Stahl et al., Ann. Rheum. Dis., 62 (Suppl. 1): OP004(2003); Emery et al., Arthritis Rheum. 48(9): S439 (2003)）、狼瘡（Eisenberg, Arthritis. Res. Ther. 5:157-159 (2003); Leandro et al. Arthritis Rheum. 46: 2673-2677 (2002); Gorman et al., Lupus, 13: 312-316 (2004)）、免疫性血小板減少性紫斑病（D'Arena et al., Leuk.Lymphoma 44:561-562 (2003); Stasi et al., Blood, 98: 952-957 (2001); Saleh et al., Semin. Oncol., 27 (Supp 12):99-103 (2000); Zaja et al., Haematologica, 87:189-195 (2002); Ratanatharathorn et al., Ann. Int. Med., 133:275-279 (2000)）、赤芽球癆（Auner et al., Br. J. Haematol., 116:725-728 (2002)）；自己免疫性貧血（Zaja et al., supra (erratum appears in Haematologica 87:336 (2002)）、寒冷凝集素病（Layios et al., Leukemia, 15:187-8 (2001); Berentsen et al., Blood, 103: 2925-2928 (2004); Berentsen et al., Br. J. Haematol., 115:79-83 (2001); Bauduer, Br. J. Haematol., 112:1083-1090 (2001); Zaja et al., Br. J. Haematol., 115:232-233 (2001)）、重度のＢ型インスリン抵抗性症候群（Coll et al., N. Engl. J. Med., 350:310-311 (2004)、混合性クリオグロブリン血症（DeVita et al., Arthritis Rheum. 46 Suppl. 9:S206/S469 (2002)）、重症筋無力症（Zaja et al., Neurology, 55:1062-1063 (2000); Wylam et al., J. Pediatr., 143:674-677 (2003)）、ウェゲナー肉芽腫症（Specks et al., Arthritis & Rheumatism 44:2836-2840 (2001)）、難治性尋常性天疱瘡（Dupuy et al., Arch Dermatol., 140:91-96 (2004)）、皮膚筋炎（Levine, Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9):S1299 (2002)）、シェーグレン症候群（Somer et al., Arthritis & Rheumatism, 49:394-398 (2003)）、活性ＩＩ型混合クリオグロブリン血症（Zaja et al., Blood, 101:3827-3834 (2003)）、尋常性天疱瘡（Dupay et al., Arch. Dermatol., 140:91-95 (2004)）、自己免疫性ニューロパチー（Pestronk et al., J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 74:485-489 (2003)）、腫瘍随伴性オプソクローヌス・ミオクローヌス症候群（Pranzatelli et al. Neurology 60 (Suppl. 1) PO5.128:A395 (2003)）、および再発寛解型多発性硬化症（ＲＲＭＳ）の徴候および症状を潜在的に軽減することが報告されている。Cross et al. (abstract) "Preliminary Results from a Phase II Trial of Rituximab in MS" Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, 20-21 (2003)。

【０００８】

ＣＤ２０抗体、ＣＤ２０結合分子、および自己抗原ワクチンに関する特許および特許公報としては、米国特許第５，７７６，４５６号、同第５，７３６，１３７号、同第５，８４３，４３９号、同第６，３９９，０６１号、および同第６，６８２，７３４号、ならびに米国公開特許第２００２／０１９７２５５号、米国公開特許第２００３／００２１７８１号、米国公開特許第２００３／００８２１７２号、米国公開特許第２００３／００９５９６３号、米国公開特許第２００３／０１４７８８５号、米国公開特許第２００５／０１８６２０５号、および国際公開第１９９４／１１０２６号（Anderson et al.）；米国特

許第６，４５５，０４３号、米国公開特許第２００３／００２６８０４号、米国公開特許第２００３／０２０６９０３号、および国際公開第２０００／０９１６０号（Grillo-Lopez, A.）；国際公開第２０００／２７４２８号（Grillo-Lopez and White）；米国公開特許第２００４／０２１３７８４号および国際公開第２０００／２７４３３号（Grillo-Lopez and Leonard）；国際公開第２０００／４４７８８号（Braslawsky et al.）；国際公開第２００１／１０４６２号（Rastetter, W.）；国際公開第２００１／１０４６１号（Rastetter and White）；国際公開第２００１／１０４６０号（White and Grillo-Lopez）；米国公開特許第２００１／００１８０４１号、米国公開特許第２００３／０１８０２９２号、米国公開特許第２００２／００２８１７８号、国際公開第２００１／３４１９４号、および国際公開第２００２／２２２１２号（Hanna and Hariharan）；米国公開特許第２００２／０００６４０４号および国際公開第２００２／０４０２１号（Hanna and Hariharan）；米国公開特許第２００２／００１２６６５号、米国公開特許第２００５／０１８０９７５号、国際公開第２００１／７４３８８号、および米国特許第６，８９６，８８５Ｂ５号（Hanna, N.）；米国公開特許第２００２／００５８０２９号（Hanna, N.）；米国公開特許第２００３／０１０３９７１号（Hariharan and Hanna）；米国公開特許第２００５／０１２３５４０号（Hanna et al.）；米国公開特許第２００２／０００９４４４号および国際公開第２００１／８０８８４号（Grillo-Lopez, A.）；国際公開第２００１／９７８５８号；米国公開特許第２００５／０１１２０６０号、米国公開特許第２００２／００３９５５７号および米国特許第６，８４６，４７６号（White, C.）；米国公開特許第２００２／０１２８４４８号および国際公開第２００２／３４７９０号（Reff, M.）；国際公開第２００２／０６０９５５号（Braslawsky et al.）；国際公開第２００２／０９６９４８号（Braslawsky et al.）；国際公開第２００２／０７９２５５号（Reff and Davies）；米国特許第６，１７１，５８６号および同第６，９９１，７９０号、および国際公開第１９９８／５６４１８号（Lam et al.）；米国公開特許第２００４／０１９１２５６号および国際公開第１９９８／５８９６４号（Raju, S.）；国際公開第１９９９／２２７６４号（Raju, S.）；国際公開第１９９９／５１６４２号、米国特許第６，１９４，５５１号、米国特許第６，２４２，１９５号、米国特許第６，５２８，６２４号および米国特許第６，５３８，１２４号（Idusogie et al.）；米国特許第７，１２２，６３７号、米国公開特許第２００５／０１１８１７４号、米国公開特許第２００５／０２３３３８２号、米国公開特許第２００６／０１９４２９１号、米国公開特許第２００６／０１９４２９０号、米国公開特許第２００６／０１９４９５７号、および国際公開第２０００／４２０７２号（Presta, L.）；国際公開第２０００／６７７９６号（Curd et al.）；国際公開第２００１／０３７３４号（Grillo-Lopez et al.）；米国公開特許第２００２／０００４５８７号、米国公開特許第２００６／００２５５７６号、および国際公開第２００１／７７３４２号（Miller and Presta）；米国公開特許第２００２／０１９７２５６号および国際公開第２００２／０７８７６６号（Grewal, I.）；米国公開特許第２００３／０１５７１０８号および国際公開第２００３／０３５８３５号（Presta, L.）；米国特許第５，６４８，２６７号、同第５，７３３，７７９号、同第６，０１７，７３３号、および同第６，１５９，７３０号、および国際公開第１９９４／１１５２３号（Reff et al.）；米国特許第６，５６５，８２７号、同第６，０９０，３６５号、同第６，２８７，５３７号、同第６，０１５，５４２号、同第５，８４３，３９８号、および同第５，５９５，７２１号（Kaminski et al.）；米国特許第５，５００，３６２号、同第５，６７７，１８０号、同第５，７２１，１０８号、同第６，１２０，７６７号、同第６，６５２，８５２号、および同第６，８９３，６２５号ならびに国際公開第１９８８／０４９３６号（Robinson et al.）；米国特許第６，４１０，３９１号（Zelsacher）；米国特許第６，２２４，８６６号および国際公開第ＷＯ００／２０８６４号（Barbera-Guillem, E.）；国際公開第２００１／１３９４５号（Barbera-Guillem, E.）；国際公開第２０００／６７７９５号（Goldenberg）；米国特許第７，０７４，４０３号（Goldenberg and Hansen）；米国特許第７，１５１，１６４号（Hansen et al.）；米国公開特許第２００３／０１３３９３０号；国際公開第２０００／７４７１８号および米国公開特許第２００５／０

１９１３００Ａ１号（Goldenberg and Hansen）；米国公開特許第２００３／０２１９４３３号および国際公開第２００３／６８８２１号（Hansen et al.）；国際公開第２００４／０５８２９８号（Goldenberg and Hansen）；国際公開第２０００／７６５４２号（Golay et al.）；国際公開第２００１／７２３３３号（Wolin and Rosenblatt）；米国特許第６，３６８，５９６号（Ghetie et al.）；米国特許第６，３０６，３９３号および米国公開特許第２００２／００４１８４７号（Goldenberg, D.）；米国公開特許第２００３／００２６８０１号（Weiner and Hartmann）；国際公開第２００２／１０２３１２号（Engleman, E.）；米国公開特許第２００３／００６８６６４号（Albitar et al.）；国際公開第２００３／００２６０７号（Leung, S.）；国際公開第２００３／０４９６９４号、米国公開特許第２００２／０００９４２７号、および米国公開特許第２００３／０１８５７９６号（Wolin et al.）；国際公開第２００３／０６１６９４号（Sing and Siegall）；米国公開特許第２００３／０２１９８１８号（Bohen et al.）；米国公開特許第２００３／０２１９４３３号および国際公開第２００３／０６８８２１号（Hansen et al.）；米国公開特許第２００３／０２１９８１８号（Bohen et al.）；米国公開特許第２００２／０１３６７１９号（Shenoy et al.）；国際公開第２００４／０３２８２８号および米国公開特許第２００５／０１８０９７２号（Wahl et al.）；および国際公開第２００２／５６９１０号（Hayden-Ledbetter）が挙げられる。米国特許第５，８４９，８９８号および欧州特許第３３０，１９１号（Seed et al.）；欧州特許第３３２，８６５Ａ２号（Meyer and Weiss）；米国特許第４，８６１，５７９号（Meyer et al.）；米国公開特許第２００１／００５６０６６号（Bugelski et al.）；国際公開第１９９５／０３７７０号（Bhat et al.）；米国公開特許第２００３／０２１９４３３Ａ１号（Hansen et al.）；国際公開第２００４／０３５６０７号および米国公開特許第２００４／１６７３１９号（Teeling et al.）；国際公開第２００５／１０３０８１号（Teeling et al.）；米国公開特許第２００６／００３４８３５号、米国公開特許第２００６／００２４３００号、および国際公開第２００４／０５６３１２号（Lowman et al.）；米国公開特許第２００４／００９３６２１号（Shitara et al.）；国際公開第２００４／１０３４０４号（Watkins et al.）；国際公開第２００５／０００９０１号（Tedder et al.）；米国公開特許第２００５／００２５７６４号（Watkins et al.）；米国公開特許第２００６／０２５１６５２号（Watkins et al.）；国際公開第２００５／０１６９６９号（Carr et al.）；米国公開特許第２００５／００６９５４５号（Carr et al.）；国際公開第２００５／０１４６１８号（Chang et al.）；米国公開特許第２００５／００７９１７４号（Barbera-Guillem and Nelson）；米国公開特許第２００５／０１０６１０８号（Leung and Hansen）；米国公開特許第２００５／０１２３５４６号（Umana et al.）；米国公開特許第２００４／００７２２９０号（Umana et al.）；米国公開特許第２００３／０１７５８８４号（Umana et al.）；および国際公開第２００５／０４４８５９号（Umana et al.）；国際公開第２００５／０７０９６３号（Allan et al.）；米国公開特許第２００５／０１８６２１６号（Ledbetter and Hayden-Ledbetter）；米国公開特許第２００５／０２０２５３４号（Hayden-Ledbetter and Ledbetter）；米国公開特許第２００５／１３６０４９号（Ledbetter et al.）；米国公開特許第２００３／１１８５９２号（Ledbetter et al.）；米国公開特許第２００３／１３３９３９号（Ledbetter and Hayden-Ledbetter）；米国公開特許第２００５／０２０２０１２号（Ledbetter and Hayden-Ledbetter）；米国公開特許第２００５／０１７５６１４号（Ledbetter and Hayden-Ledbetter）；米国公開特許第２００５／０１８０９７０号（Ledbetter and Hayden-Ledbetter）；米国公開特許第２００５／０２０２０２８号（Hayden-Ledbetter and Ledbetter）；米国公開特許第２００５／０２０２０２３号（Hayden-Ledbetter and Ledbetter）；国際公開第２００５／０１７１４８号（Ledbetter et al.）；国際公開第２００５／０３７９８９号（Ledbetter et al.）；米国特許第６，１８３，７４４号（Goldenberg）；米国特許第６，８９７，０４４号（Braslawski et al.）；国際公開第２００６／００５４７７号（Krause et al.）；米国公開特許第２００６／００２９５４３号（Krause et al.）；米国公開特許第２００６／００１８９００号（McLCCormick et al.）；米国公開特許第２００６／００５１３４

９号（Goldenberg and Hansen）；国際公開第２００６／０４２２４０号（Iyer and Dunussi-Joannopoulos）；米国公開特許第２００６／０１２１０３２号（Dahiyat et al.）；国際公開第２００６／０６４１２１号（Teillaud et al.）；米国公開特許第２００６／０１５３８３８号（Watkins）、中国特許第１７１８５８７号（Chen et al.）；国際公開第２００６／０８４２６４号（Adams et al.）；米国公開特許第２００６／０１８８４９５号（Barron et al.）；米国公開特許第２００４／０２０２６５８号および国際公開第２００４／０９１６５７号（Benynes, K.）；米国公開特許第２００５／００９５２４３号、米国公開特許第２００５／０１６３７７５号、国際公開第２００５／００３５１号、および国際公開第２００６／０６８８６７号（Chan, A.）；米国公開特許第２００６／０１３５４３０号および国際公開第２００５／００５４６２号（Chan et al.）；米国公開特許第２００５／００３２１３０号および国際公開第２００５／０１７５２９号（Beresini et al.）；米国公開特許第２００５／００５３６０２号および国際公開第２００５／０２３３０２号（Brunetta, P.）；米国公開特許第２００６／０１７９５０１号および国際公開第２００４／０６００５２号（Chan et al.）；国際公開第２００４／０６００５３号（Chan et al.）；米国公開特許第２００５／０１８６２０６号および国際公開第２００５／０６０９９９号（Brunetta, P.）；米国公開特許第２００５／０１９１２９７および国際公開第２００５／０６１５４２号（Brunetta, P.）；米国公開特許第２００６／０００２９３０号および国際公開第２００５／１１５４５３号（Brunetta et al.）；米国公開特許第２００６／００９９６６２号および国際公開第２００５／１０８９８９号（Chuntharapai et al.）；中国特許第１４２０１２９Ａ号（Zhongxin Guojian Pharmaceutical）；米国公開特許第２００５／０２７６８０３号および国際公開第２００５／１１３００３号（Chan et al.）；
米国公開特許第２００５／０２７１６５８号および国際公開第２００５／１１７９７２号（Brunetta et al.）；米国公開特許第２００５／０２５５５２７号および国際公開第２００５／１１４２８号（Yang, J.）；米国公開特許第２００６／００２４２９５号および国際公開第２００５／１２０４３７号（Brunetta, P.）；米国公開特許第２００６／００５１３４５号および国際公開第２００５／１１７９７８号（Frohna, P.）；米国公開特許第２００６／００６２７８７号および国際公開第２００６／０１２５０８号（Hitraya, E.）；米国公開特許第２００６／００６７９３０号および国際公開第２００６／３１３７０号（Lowman et al.）；国際公開第２００６／２９２２４号（Ashkenazi, A.）；米国公開特許第２００６／０１１０３８７号および国際公開第２００６／４１６８０号（Brunetta, P.）；米国公開特許第２００６／０１３４１１１号および国際公開第２００６／０６６０８６号（Agarwal, S.）；国際公開第２００６／０６９４０３号（Ernst and Yansura）；米国公開特許第２００６／０１８８４９５および国際公開第２００６／０７６６５１号（Dummer, W.）；国際公開第２００６／０８４２６４号（Lowman, H.）；国際公開第２００６／０９３９２３号（Quan and Sewell）；国際公開第２００６／１０６９５９号（Numazaki et al.）；国際公開第２００６／１２６０６９号（Morawala）；国際公開第２００６／１３０４５８号（Gazit-Bornstein et al.）；米国公開特許第２００６／０２７５２８４号（Hanna, G.）；米国公開特許第２００７／００１４７８５号（Golay et al.）；米国公開特許第２００７／００１４７２０号（Gazit-Bornstein et al.）；および米国公開特許第２００７／００２０２５９号（Hansen et al.）；米国公開特許第２００７／００２０２６５号（Goldenberg and Hansen）；米国公開特許第２００７／００１４７９７号（Hitraya）；米国公開特許第２００７／０２２４１８９号（Lazar et al.）；および国際公開第２００８／００３３１９号（Parren and Baadsgaard）も参照のこと。

【０００９】

抗ＣＤ２０抗体での治療に関するいくつかの科学出版物としては次のものが挙げられる：Perotta and Abuel, “Response of chronic relapsing ITP of 10 years duration to rituximab” Abstract #3360 Blood, 10(1)(part 1-2):88B (1998); Perotta et al., “Rituxan in the treatment of chronic idiopathic thrombocytopaenic purpura (ITP)”, Blood, 94:49 (abstract) (1999); Matthews, R., “Medical Heretics” New Scien

tist, (7 Apr., 2001); Leandro et al., “Clinical outcome in 22 patients with rheumatoid arthritis treated with B lymphocyte depletion” Ann Rheum Dis., supra; Leandro et al., “Lymphocyte depletion in rheumatoid arthritis: early evidence for safety, efficacy and dose response” Arthritis and Rheumatism, 44(9):S370 (2001); Leandro et al., “An open study of B lymphocyte depletion in systemic lupus erythematosus” Arthritis and Rheumatism, 46:2673-2677 (2002)（ここで、２週間の期間中、各患者に５００ｍｇのＣＤ２０の抗体の注入を２回、７５０ｍｇのシクロホスファミドの注入を２回、そして高用量の経口コルチコステロイドを投与し、この場合、治療された患者のうちの２人はそれぞれ７ヶ月および８ヶ月で再発し、再治療を受けたが、異なるプロトコルであった）；“Successful long-term treatment of systemic lupus erythematosus with rituximab maintenance therapy” Weide et al., Lupus, 12:779-782 (2003),　（ここで、１人の患者は抗ＣＤ２０抗体で治療し（３７５ｍｇ／ｍ^2×４、１週間間隔で繰り返す）、５～６ヶ月ごとにさらに抗体を適用し、次いで３ヶ月ごとに３７５ｍｇ／ｍ^{2}の抗体で維持療法を受け、難治性ＳＬＥの第２の患者は抗ＣＤ２０抗体リツキシマブで治療し、引き続き３ヶ月ごとに維持療法を受けた）；Edwards and Cambridge, “Sustained improvement in rheumatoid arthritis following a protocol designed to deplete B lymphocytes” Rheumatology, 40:205-211 (2001); Cambridge et al., “B lymphocyte depletion in patients with rheumatoid arthritis: serial studies of immunological parameters” Arthritis Rheum., 46 (Suppl. 9): S1350 (2002); Cambridge et al., “Serologic changes following B lymphocyte depletion therapy for rheumatoid arthritis” Arthritis Rheum., 48:2146-2154 (2003); Edwards et al., “B-lymphocite depletion therapy in rheumatoid arthritis and other autoimmune disorders” Biochem Soc. Trans., supra; Edwards et al., “Efficacy and safety of rituximab, a B-cell targeted chimeric monoclonal antibody: A randomized, placebo controlled trial in patients with rheumatoid arthritis, “Arthritis and Rheumatism, 46 (9):S197 (2002); Edwards et al., “Efficacy of B-cell-targeted therapy with rituximab in patients with rheumatoid arthritis” N Engl. J. Med., 350:2572-2582 (2004); Pavelka et al., Ann. Rheum. Dis., 63:(S1):289-290 (2004); Emery et al., Arthritis Rheum. 50 (S9):S659 (2004); Levine and Pestronk, “IgM antibody-related polyneuropathies: B-cell depletion chemotherapy using Rituximab” Neurology, 52:1701-1704 (1999); Uchida et al., “The innate mononuclear phagocyte network depletes B lymphocytes through Fc receptor-dependent mechanisms during anti-CD20antibody immunotherapy” J. Exp. Med., 199:1659-1669 (2004); Gong et al., “Importance of cellular microenvironment and circulatory dynamics in B-cell immunotherapy” J. Immunol., 174:817-826 (2005); Hamaguchi et al., “The peritoneal cavity provides a protective niche for B1 and conventional B lymphocytes during anti-CD20 immunotherapy in mice” J. Immunol., 174:4389-4399 (2005); Cragg et al. “The biology of CD20and its potential as a target for mAb therapy” Curr. Dir. Autoimmun., 8:140-174 (2005); Eisenberg, “Mechanisms of autoimmunity” Immunol. Res., 27:203-218 (2003); DeVita et al., “Efficacy of selective B-cell blockade in the treatment of rheumatoid arthritis” Arthritis & Rheum, 46:2029-2033 (2002); Higashida et al. “Treatment of DMARD-refractory rheumatoid arthritis with rituximab” Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology (Abstract #LB11), New Orleans, La. (October, 2002); Tuscano, “Successful treatment of infliximab-refractory rheumatoid arthritis with rituximab” Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology, New Orleans, La. (October, 2002), published as Tuscano, Arthritis Rheum. 46:3420 (2002); “Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic” Martin and Chan, Immunity, 20:517-527 (2004); Silverman and Weisman, “Rituximab therapy and autoimmune disorders, prospects for anti-B cell therapy”, Arthritis and Rheumatism, 48:1484-1

492 (2003); Kazkaz and Isenberg, “Anti B-cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases” Current Opinion in Pharmacology, 4:398-402 (2004); Virgolini and Vanda, “Rituximab in autoimmune diseases” Biomedicine & Pharmacotherapy, 58: 299-309 (2004); Klemmer et al., “Treatment of antibody mediated autoimmune disorders with an AntiCD20 monoclonal antibody Rituximab” Arthritis And Rheumatism, 48(9) (SEP):S624-S624 (2003); Kneitz et al., “Effective B cell depletion with rituximab in the treatment of autoimmune diseases” Immunobiology, 206:519-527 (2002); Arzoo et al., “Treatment of refractory antibody mediated autoimmune disorders with an anti-CD 20 monoclonal antibody (rituximab)” Annals of the Rheumatic Diseases, 61(10):922-924 (2002) Comment in Ann. Rheum. Dis. 61: 863-866 (2002); “Future strategies in immunotherapy” by Lake and Dionne, in Burger’s Medicinal Chemistry and Drug Discovery (John Wiley & Sons, Inc., 2003) (Chapter 2 “Antibody-Directed Immunotherapy”); Liang and Tedder, Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine, Section: CD20as an Immunotherapy Target (2002); Appendix 4A entitled “Monoclonal Antibodies to HFuman Cell Surface Antigens” by Stockinger et al., eds: Coligan et al., in Current Protocols in Immunology (John Wiley & Sons, Inc., 2003); Penichet and Morrison, “CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering” in Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine Section: Chimeric, Humanized and Human Antibodies(2002)。

【００１０】

さらに、Looney, “B cells as a therapeutic target in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis” Rheumatology, 44 Suppl 2:ii13-ii17 (2005); Chambers and Isenberg, “Anti-B cell therapy (rituximab) in the treatment of autoimmune diseases” Lupus, 14(3):210-214 (2005); Looney et al., “B-cell depletion as a novel treatment for systemic lupus erythematosus: a phase I/II dose-escalating trial of rituximab” Arthritis Rheum., 50:2580-2589 (2004); Looney, “Treating human autoimmune disease by depleting B cells” Ann Rheum. Dis., 61:863-866 (2002); Edelbauer et al., “Rituximab in childhood systemic lupus erythematosus refractory to conventional immunosuppression Case report” Pediatr. Nephrol., 20(6): 811-813 (2005); D’Cruz and Hughes, “The treatment of lupus nephritis” BMJ, 330(7488):377-378 (2005); Looney, “B cell-targeted therapy in diseases other than rheumatoid arthritis” J. Rheumatol. Suppl., 73: 25-28-discussion 29-30 (2005); Sfikakis et al., “Remission of proliferative lupus nephritis following B cell depletion therapy is preceded by down-regulation of the T cell costimulatory molecule CD40ligand: an open-label trial” Arthritis Rheum., 52(2):501-513 (2005); Rastetter et al., “Rituximab: expanding role in therapy for lymphomas and autoimmune diseases” Annu. Rev. Med., 55:477-503 (2004); Silverman, “Anti-CD20 therapy in systemic lupus erythematosus: a step closer to the clinic” Arthritis Rheum., 52(2):371-377 (2005), Erratum in: Arthritis Rheum. 52(4):1342 (2005); Ahn et al., “Long-term remission from life-threatening hypercoagulable state associated with lupus anticoagulant (LA) following rituximab therapy” Am. J. Hematol., 78(2): 127-129 (2005); Tahir et al., “Humanized anti-CD20monoclonal antibody in the treatment of severe resistant systemic lupus erythematosus in a patient with antibodies against rituximab” Rheumatology, 44(4):561-562 (2005), Epub 2005, Jan. 11; Looney et al., “Treatment of SLE with anti CD20 monoclonal antibody ” Curr. Dir. Autoimmun., 8:193-205 (2005); Cragg et al., “The biology of CD20 and its potential as a target for mAb therapy” Curr. Dir. Autoimmun., 8:140-174 (2005); Gottenberg et al., “Tolerance and short term efficacy of rituximab in 43 patients with systemic autoimmune diseases” Ann. Rheum. Dis., 64(6):913-920 (2005) Epub 2004 Nov. 18; Tokunaga et al., “Down-regulation of CD40and CD80 on B c

ells in patients with life-threatening systemic lupus erythematosus after successful treatment with rituximab” Rheumatology 44(2): 176-182 (2005), Epub 2004 Oct. 19を参照のこと。Leandro et al., “B cell repopulation occurs mainly from naive B cells in patient with rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus” Arthritis Rheum., 48 (Suppl 9): S1160 (2003)も参照のこと。

【００１１】

さらに、３７５ｍｇ／ｍ^{2}の抗ＣＤ２０抗体の４回注入および高用量グルココルチコイドを使用してウェゲナー肉芽腫症を治療することを開示する、Specks et al.“Response of Wegener’s granulomatosis to anti-CD20chimeric monoclonal antibody therapy” Arthritis & Rheumatism, 44(12):2836-2840 (2001)も参照のこと。ｃＡＮＣＡが再発した、１１ヶ月後に療法を繰り返したが、療法ではグルココルチコイドを使用しなかった。抗ＣＤ２０抗体の第２コースの８ヶ月後で、患者の疾患は完全寛解の状態にとどまっていた。別の研究では、抗ＣＤ２０抗体を３７５ｍｇ／ｍ^2×４の用量で１ｍｇ／ｋｇ／日の経口プレドニゾンとともに使用し、第４週までに４０ｍｇ／日まで減少させ、続く１６週にかけて全面的に中断した場合に、重度のＡＮＣＡ関連血管炎の寛解が報告された。４人の患者を抗ＣＤ２０抗体単独で再発／増加ＡＮＣＡ力価に関して再治療した。Keogh et al., Kidney Blood Press. Res., 26:293 (2003)は、１１人の難治性ＡＮＣＡ関連血管炎の患者が、毎週４回の３７５ｍｇ／ｍ^{2}用量の抗ＣＤ２０抗体および高用量グルココルチコイドで治療すると寛解になったことを報告した。

【００１２】

難治性ＡＮＣＡ関連血管炎の患者に抗ＣＤ２０抗体を免疫抑制薬、たとえば静脈内シクロホスファミド、ミコフェノール酸モフェチル、アザチオプリン、またはレフルノミドとともに投与した。Eriksson, “Short-term outcome and safety in 5 patients with ANCA-positive vasculitis treated with rituximab” Kidney and Blood Pressure Research, 26:294 (2003)（ここでは、５人のＡＮＣＡ関連血管炎患者を抗ＣＤ２０抗体３７５ｍｇ／ｍ^{2}で週に１回、４週間治療した）；Jayne et al., “B-cell depletion with rituximab for refractory vasculitis” Kidney and Blood Pressure Research, 26:294-295 (2003)（バックグラウンド免疫抑制およびプレドニゾロンとともに３７５ｍｇ／ｍ^{2}の抗ＣＤ２０抗体の週４回注入とシクロホスファミドとを受けた難治性血管炎の患者６人は、脈管活性の変化を経験した）。抗ＣＤ２０抗体を静脈内シクロホスファミドとともに４回の投与量で１用量あたり３７５ｍｇ／ｍ^{2}で難治性全身性血管炎の患者に投与するために使用することについてのさらなる報告は、Smith and Jayne, “A prospective, open label trial of B-cell depletion with rituximab in refractory systemic vasculitis” poster 998 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), American Society of Nephrology, J. Am. Soc. Nephrol., 14:755A (2003)で記載されている。５００ｍｇの抗ＣＤ２０抗体の週２または４回投与で治療されたＡＮＣＡ陽性血管炎患者９人に関する、Eriksson, J. Internal Med., 257:540-548 (2005)；および難治性ＡＮＣＡ関連血管炎患者１１人において、３７５ｍｇ／ｍ^{2}の用量の抗ＣＤ２０抗体で週４回治療または再治療すると、Ｂリンパ球枯渇により寛解が誘発されたことを報告する、Keogh et al., Arthritis and Rheumatism, 52:262-268 (2005)も参照のこと。

【００１３】

ヒト化抗ＣＤ２０抗体の活性に関して、例えば、Vugmeyster et al., “Depletion of B cells by a humanized anti-CD20antibody PRO70769 in Macaca fascicularis,” J. Immunother., 28:212-219 (2005)を参照のこと。ヒトモノクローナル抗体の考察に関しては、Baker et al., “Generation and characterization of Lymphostat-B, a human monoclonal antibody that antagonizes the bioactivities of B lymphocyte stimulator,” Arthritis Rheum., 48:3253-3265 (2003)を参照のこと。若年患者における侵襲性非ホジキンリンパ腫の治療を含む抗ＣＤ２０抗体でのＭＩＮＴ試験を行った。Pfreundschuh et al., Lancet Oncology, 7(5):379-391 (2006)。

【００１４】

抗体薬物複合体（ＡＤＣ）とも呼ばれる抗体細胞傷害性薬物複合体（または「ＡＣＣ」）は、特殊な化学リンカーを介して抗体に共有結合する細胞傷害性薬物からなる免疫複合体の一種であることが知られている。細胞傷害性薬物または細胞増殖阻害剤、すなわち、ガンの治療において腫瘍細胞を殺すかまたは阻害するための薬剤の局所送達のためのＡＣＣの使用（Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drg Del.Rev. 26:151-172；米国特許第４，９７５，２７８号を参照のこと）により、薬物部分の腫瘍への標的化送達、および細胞内蓄積が可能になり、ここで、これらの非複合型医薬の全身投与の結果、正常細胞ならびに除去しようとされる腫瘍細胞に対して許容されない毒性レベルとなる可能性がある(Baldwin et al., (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review,” in Monoclonal Antibodies ’84: Biological And Clinical Applications, A. Pinchera et al. (ed.s), pp. 475-506)。最小の毒性で最大の効果が求められる。ポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体はどちらも場合によってこの点に関して有用であることが報告されている。（Rowland et al., (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87を参照のこと）。この点に関して使用されることが知られている薬物としては、ダウノマイシン、ドキソルビシン、メトトレキサート、およびビンデシンが挙げられる（Rowland et al., Cancer Immunol. Immunother. 21:183-87 (1986)）。抗体毒素複合体で使用される毒素としては、細菌毒素、例えばジフテリア毒素、植物毒素、例えばリシン、小分子毒素、例えばゲルダナマイシンが挙げられる。Kerr et al (1997) Bioconjugate Chem. 8(6):781-784; Mandler et al (2000) Journal of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10: 1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791)、メイタンシノイド（欧州特許第１３９１２１３号； Liu et al., (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:8618-8623）、およびカリケアマイシン（Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342。毒素は、チューブリン結合、ＤＮＡ結合、またはトポイソメラーゼ阻害をはじめとする種々の機序により細胞毒性および／または細胞増殖抑制効果を発揮することができる。Meyer, D. L. and Senter, P. D. “Recent Advances in Antibody Drug Conjugates for Cancer Therapy” in Annual Reports in Medicinal Chemistry, Vol 38 (2003) Chapter 23, 229-237。しかし、多くの細胞傷害性薬物は、大きな抗体またはタンパク質受容体リガンドと結合する場合に不活性または低活性である傾向がある。

【００１５】

抗体－メイタンシノイド複合体は、細胞の表面上で発現された抗原を標的とするモノクローナル抗体およびその抗体と共有結合したメイタンシン由来の化合物（例えば、微小管重合を阻害する強力な有糸分裂阻害剤）から構成される。ChariRV, Acc. Chem. Res. 2008 Jan;41(1):98-107。適切なリンカーがあれば、抗体メイタンシノイド複合体（ＡＭＣ）はインビボで安定であり得、そして標的抗原を発現しない細胞に対して著しく毒性が低く、それにより複合体の治療指数を増大させることができる。細胞表面上の標的抗原と結合すると、ＡＭＣはインターナライズし、リソソーム中で、おそらくはプロテアーゼにより分解して、活性なメイタンシノイド代謝産物を生成し、これは次いで微小管と結合して阻害し、それにより細胞周期停止を誘発し、そして最終的におそらくはアポトーシスにより細胞死を誘発する。Erickson et al, Cancer Res. 2006 Apr 15;66(8):4426-33。メイタンシノイド複合により、ｍＡｂはインビトロおよびインビボの標的化された殺滅活性を改善することができる。

【００１６】

現在では、多くのＡＣＣが臨床試験および前臨床開発で研究されている。理想的には、免疫複合体は、抗体療法と同様にして、患者に容易に投与することができる。トラスツズマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１（Ｔ－ＤＭ１）と呼ばれる１つのＡＣＣは、特に、トラスツズマブおよび化学療法が失敗に終わったＨＥＲ２を過剰発現する転移性乳ガン患者で有効であり、同時に良好な低毒性プロフィールも示すことが報告されている。Vogel CL, ASCO 200

9 Abstract #1017を参照のこと。

【００１７】

抗体メイタンシノイド複合体、例えば非切断性リンカーＳＭＣＣを用いて合成されたトラスツズマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１の血漿クリアランスは、抗体単独のクリアランスに対して非常に遅い。米国公開特許第２００５／０１６９９３３号。これは、ｈｕＣ２４２－ＳＰＰ－ＤＭ１などの比較的不安定なジスルフィド結合で調製された複合体の血漿クリアランスとは際だって対照的である。例えば、ＳＭＣＣ複合体のクリアランスに関する半減期は約３２０時間であり、一方、ＳＰＰ複合体の半減期は、約４０～５０時間の範囲である。しかし、各種類の複合体の抗体成分のクリアランスは同じであり、このことは、測定された複合体クリアランス速度の差が抗体複合体からのメイタンシノイドの損失によるものであり得ることを示唆する（すなわち、ＳＰＰ－ＤＭ１複合体の場合）。非切断性ＳＭＣＣ結合は、おそらくＳＰＰ－ＤＭ１複合体よりもインビボではるかに高い耐性メイタンシノイド－リンカー切断活性を有する。さらに、ＳＰＰ－ＤＭ１複合体と比較して、ＳＭＣＣリンカー複合体に関する減少したクリアランス速度は、曲線下面積（ＡｕＣ）により測定される動物の全体的メイタンシノイド暴露の５倍近い増加をもたらす。この増大した暴露は、薬効に対して実質的な影響を及ぼす可能性がある。

【００１８】

ＳＭＣＣなどの非切断性リンカーを用いて調製されたメイタンシノイド複合体は、切断性ジスルフィドリンカーで調製された複合体と比較して、マウスにおいて予想外の増大した耐容性を示すことが報告されている。米国公開特許第２００５／０１６９９３３号。例えば、ｈｕＣ２４２－ＳＭＣＣ－ＤＭ１およびｈｕＣ２４２－ＳＰＰ－ＤＭ１複合体の耐容性を、ＣＤ－１マウスにおいて１回の静脈内投与を用いる急性毒性試験において比較した。ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の最大耐量（ＭＴＤ）は、試験した最高用量（１５０ｍｇ／ｋｇ）よりも高く、一方、ジスルフィド－リンカー複合体ＳＰＰ－ＤＭ１のＭＴＤは４５～９０ｍｇ／ｋｇの範囲であった。１５０ｍｇ／ｋｇで、ＳＭＣＣ－ＤＭ１治療群のマウスは全て生存し、一方、ＳＰＰ－ＤＭ１治療群の全てのマウスについて治療後９６時間までに致死毒性が観察された。さらに、非還元性チオエーテル結合抗体メイタンシノイド複合体トラスツズマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１は、切断性ジスルフィド結合トラスツズマブ－ＳＰＰ－ＤＭ１よりもラットにおいて２～３倍良好な耐容性を示した。Lewis Phillips GD, Li G, Dugger DL, et al., Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody-cytotoxic drug conjugate, Cancer Res 2008; 68:9280-90。したがって、ＳＭＣＣなどの非切断性リンカーで調製された抗体薬物複合体は、前臨床モデルにおいて良好な毒性および薬物動態パラメータを示し得ることが可能である。

【００１９】

ＣＤ２０は当該技術分野で公知であるが、ＣＤ２０は抗体薬物複合のための好ましい標的ではない。なぜなら、公知抗ＣＤ２０抗体はほとんどインターナライズしないからである。Press OW, Cancer Res. 1989; 49:4906-12およびVangeepuram N, Cancer 1997; 80 (Suppl.): 2425-30。ＣＤ２０抗体の複合体はすでに研究されているが、特に非ジスルフィドまたは酸安定性リンカーを使用する場合、著しく強力な効力を示さない。

【００２０】

例えば、抗ＣＤ２０抗体の非切断性ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、非複合抗体と同じ有効性を有し、一方、同じ抗体の切断性ＳＰＰ－ＤＭ１複合体だけは、ＳＣＩＤマウスのＧｒａｎｔａ－５１９異種移植モデルにおいてわずかに改善された有効性を示したことが報告されている。Polson et al., Cancer Res., 69(6):2358-2364 (2009)。同様に、酸安定性アミドリンカーで作製された抗ＣＤ２０抗体のカリケアマイシン複合体は、ヌードマウスのＲａｍｏｓ異種移植モデルにおいてリツキシマブよりも改善されたインビボ有効性を示さなかったことが報告されている。酸不安定性ジメチルヒドラジドＡｃ－Ｂｕｔリンカーで作製されたリツキシマブのカリケアマイシン複合体だけが、この研究で改善されたインビボ有効性を示した。DiJoseph et al., Cancer Immunol. Immunotherapy, 56(7):1107-1117 (2007)。異なる研究において、抗ＣＤ２０抗体の酸不安定性アドリアマイシン複合体

はＤａｕｄｉ異種移植モデルに対して中程度しか有効でなかったことが報告された。同じ抗体の酸安定性アドリアマイシン複合体は完全に無効であることが示された。Braslawsky et al., Cancer Immunol Immunotherapy, 33:367-74 (1991)。リツキシマブ－ｖｃＭＭＡＥのような酵素切断性ペプチド結合によりモノメチルアウリスタチンＥ（ＭＭＡＥ）に結合したリツキシマブは、報告によれば、Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞に対してインビトロおよびインビボ有効性を示した。Law et al., Clin. Cancer Res., 10(23):7842-7851 (2004); Erratum in: Clin. Cancer Res., 11(10):3969 (2005)。

【００２１】

Ｂ細胞障害の治療においてモノクローナル抗体が有効である能力を改善する別の報告されているアプローチは、放射性標識を抗体と結合させて、標識を抗原部位で局在化させることである。ＣＤ２０標的化放射性免疫複合体Ｂｅｘｘａｒ（登録商標）（１３１Ｉ－トシツモマブ）およびゼバリン（９０Ｙ－イブリツモマブチウキセタン）は、リツキシマブに対して難治性である患者をはじめとする再発性または難治性非ホジキンＢ細胞リンパ腫患者に関して承認されている。臨床状況で、数人のリツキシマブ抵抗性患者がＢｅｘｘａｒ（登録商標）に対して反応した。Horning, J. Clin. Oncol. 2005; 23:712-9。ゼバリンおよびリツキシマブを再発性もしくは難治性低悪性度または濾胞性ＮＨＬで比較した場合、ゼバリン治療は、報告によれば、リツキシマブ治療よりも有意に良好な全体的完全寛解率を示した。Witzig, J Clin Oncol 2002; 20:2453-2463。これらの臨床データは、抗ＣＤ２０放射性免疫複合体がリツキシマブよりも有効であり得ることを示唆するが、それらは放射性化合物の使用と関連したさらなる毒性や投与の困難さのために、広く用いられない。したがって、投与するのが容易であり、毒性の低い、有効な抗ＣＤ２０抗体および複合体を開発することが必要とされている。

【００２２】

したがって、特異性、低減された毒性、安定性ならびに増強された物理的および機能的特性を示す抗体または抗体断片をはじめとする、公知治療薬よりも改善された優れたＣＤ２０標的化治療薬の開発が引き続き必要とされている。本発明はこれらの必要性に対処する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００２３】

以下、その例が添付の構造および式に示されている本発明のある態様を詳細に参照する。本発明を列挙された態様に関連して記載するが、それらは本発明をこれらの態様に限定することを意図しないと理解されるであろう。そうではなく、本発明は、特許請求の範囲により規定されるような本発明の範囲内に含まれ得るすべての代替物、修飾、および等価物を網羅することが意図される。当業者は、本発明の実施において使用することができる、本明細書中に記載されるものと類似または同等の多くの方法および材料を知っているであろう。

【課題を解決するための手段】

【００２４】

１つの態様において、本発明は抗ＣＤ２０抗体および／またはその断片である。１つの態様において、本発明は、抗ＣＤ２０細胞溶解抗体および／またはその断片である。本発明の１つの態様において、抗ＣＤ２０細胞溶解抗体および断片は、ＣＤ２０を発現するＢ細胞がその病状の経過に影響を及ぼす病状の治療に有用である。１つの態様において、標的化Ｂ細胞は望まれない。１つの態様において、病状には、望まれないＢ細胞の活性が関与する。１つの態様において、病状はＢ細胞疾患である。本発明の別の態様は、ＣＤ２０抗原と特異的に結合する抗体またはその断片であり、ここで、前記抗体または断片は、アポトーシス、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導することができる。好ましい態様において、病状は非ホジキンリンパ腫である。

【００２５】

本発明の１つの態様は、ＣＤ２０と特異的に結合する抗体またはその断片であり、ここ

で、前記抗体または断片は、アポトーシス、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導することができ、抗体または断片は、ネズミ、非ヒト、ヒト化、キメラ、再表面化またはヒトである。本発明の別の態様は、ＣＤ２０と特異的に結合する抗体またはその断片であり、ここで、抗体または断片は、アポトーシス、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導することができ、抗体または断片はモノクローナルまたは単鎖である。

【００２６】

本発明の１つの態様は、ＣＤ２０と特異的に結合する抗体またはその断片を含み、ここで、前記抗体または断片は、アポトーシス、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導することができ、ここで、抗体はＣＨＯまたはＮＳ０細胞から得られる。本発明のさらに別の態様において、抗体またはその断片は、ＣＤ２０の第３および第４膜貫通ドメインの間に位置するアミノ酸残基を含む少なくとも１つのアミノ酸と特異的に結合する。

【００２７】

本発明の別の態様において、抗体またはその断片は、配列番号４５のアミノ酸、またはＧＩ２１３３０９８９、ＧｅｎＢａｎｋ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　ＩＤ２３１１０９８９のいずれか１つに対応する配列などを含む少なくとも１つのアミノ酸と特異的に結合する。本発明の別の態様は、抗体または断片であって、ＣＤ２０を発現する細胞の死を誘導することができる抗体または断片である。本発明のさらに別の態様において、抗体または断片は、ＩＩ型抗体と同様に、架橋剤の非存在下でアポトーシスを実質的に誘発する能力を有し、そしてＩ型抗体と同様に、ＣＤ２０の脂質ラフト中への再分布を引き起こし、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を実質的に誘導する能力を有するＩＩＩ型抗体である。

【００２８】

本発明の１つの態様は、抗ＣＤ２０抗体または断片を含み、ここで、抗体または断片は、ウェスタンブロット、ＥＬＩＳＡまたはＦＡＣＳアッセイにおいてＣＤ２０と特異的に結合する。

【００２９】

本発明の１つの態様において、抗ＣＤ２０抗体または断片は、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆｄ、単鎖Ｆｖ、すなわちｓｃＦｖ、ジスルフィド結合Ｆｖ、Ｖ－ＮＡＲドメイン、ＩｇＮａｒ、細胞内抗体、ＩｇＧＤＣＨ２、ミニボディ（minibiody）、Ｆ（ａｂ’）$_3$、四重特異性抗体、三重特異性抗体、二重特異性抗体、（ｓｃＦｖ）$_2$、単一ドメイン抗体、ＤＶＤ－Ｉｇ、Ｆｃａｂ、ｍＡｂ^2、またはｓｃＦｖ－Ｆｃを含む。本発明の別の態様は、免疫グロブリン重鎖定常領域を含む抗体もしくは断片および／またはその複合体である。本発明の１つの態様において、抗体または断片免疫グロブリン重鎖定常領域は、ＩｇＧ$_1$定常領域、ＩｇＧ$_2$定常領域、ＩｇＧ$_3$定常領域およびＩｇＧ$_4$定常領域からなる群から選択される。本発明の１つの態様において、抗ＣＤ２０抗体はＣＤ２０－６である。本発明の別の態様において、抗ＣＤ２０抗体はＣＤ２０－７である。

【００３０】

本発明の１つの態様において、抗体、断片またはその複合体は、リンパ腫細胞のアポトーシスを誘導する。本発明の１つの態様において、抗体、断片またはその複合体は、Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞および／またはＲａｊｉリンパ腫細胞および／またはＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞および／またはＪｅｋｏ－１リンパ腫細胞および／またはＧｒａｎｔａ－５１９リンパ腫細胞のアポトーシスを誘導する。本発明の別の態様において、本発明の抗体、断片および／またはその複合体は、架橋剤の非存在下でＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ染色により測定すると、Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞および／またはＲａｊｉリンパ腫細胞および／またはＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞および／またはＪｅｋｏ－１リンパ腫細胞および／またはＧｒａｎｔａ－５１９リンパ腫細胞のアポトーシスを誘導する。本発明の１つの態様において、抗体、断片および／またはその複合体は、架橋剤の非存在下でＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ染色により測定すると、少なくとも約４８％のＲａｍｏｓリンパ腫細胞および／または少なくとも約５３％のＲａｊｉリンパ腫細胞および／または少なくとも約３４

％のＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞および／または少なくとも約１２％のＪｅｋｏ－１リンパ腫細胞および／または少なくとも約４０％のＧｒａｎｔａ－５１９リンパ腫細胞においてアポトーシスを誘導する。

【００３１】

本発明の別の態様において、抗体、断片またはその複合体は、架橋剤の非存在下で約０．２ｎＭ以下のＥＣ$_{50}$でリンパ腫細胞のアポトーシスを誘導することができる。本発明の別の態様において、抗体、断片またはその複合体は、架橋剤の非存在下で０．２ｎＭ以下のＥＣ$_{50}$で少なくとも４８％のＲａｍｏｓリンパ腫細胞においてアポトーシスを誘導することができる。

【００３２】

本発明の別の態様において、抗体、断片および／またはその複合体は、ＣＤ２０を発現する細胞膜の脂質ラフトコンパートメント中にＣＤ２０を効率的に移動させることができる。本発明の別の態様において、本発明の抗体、断片および／またはその複合体は、ＣＤ２０発現リンパ腫細胞および／またはＣＤ２０発現免疫調節細胞の膜の脂質ラフトコンパートメント中にＣＤ２０を効率的に移動させることができる。本発明の１つの態様において、抗体、断片またはその複合体は、Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞の膜の脂質ラフトコンパートメント中にＣＤ２０を効率的に移動させることができる。

【００３３】

本発明の１つの態様において、抗体、断片および／またはその複合体は、約５％の補体を有するヒト血清の存在下でのＣＤＣにより、Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞を約０．０１８μｇ／ｍＬ以下のＥＣ$_{50}$で殺し、および／またはＤａｕｄｉリンパ腫細胞を約０．２５μｇ／ｍＬ以下のＥＣ$_{50}$で殺し、および／またはＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞を約０．５８μｇ／ｍＬ以下のＥＣ$_{50}$で殺す。

【００３４】

本発明の１つの態様において、抗体、断片またはその複合体は、位置１７０および／または１７２でアミノ酸残基プロリンを含まないかまたは必要としないＣＤ２０上のエピトープと結合する。本発明の１つの態様において、抗体、断片またはその複合体は、位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを含むかまたは有するＣＤ２０上のエピトープと結合する。本発明の１つの態様において、抗体、断片またはその複合体は、位置１７０および／または１７２でアミノ酸残基プロリンを含まないかまたは必要としない、および／または位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを含むかまたは有するＣＤ２０上のエピトープと結合する。

【００３５】

本発明の１つの態様において、抗体、断片またはその複合体はＣＤ２０上のエピトープと結合し、ここで、ＣＤ２０エピトープは位置１７０および／または１７２でプロリンを有さない、および／または位置１６３および／または１６６でアミノ酸残基アスパラギンを有さない。

【００３６】

本発明の１つの態様において、抗体またはその断片は、配列番号２５～３０からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも１つの相補性決定領域を含む。本発明の１つの態様において、抗体またはその断片は、配列番号１７～２２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも１つの相補性決定領域を含む。本発明の１つの態様において、抗体または断片は、配列番号２５～３０および１７～２２からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも１つの相補性決定領域を含み、ここで、前記抗体または断片はＣＤ２０と結合する。本発明の１つの態様において、抗体または断片は少なくとも１つの重鎖および少なくとも１つの軽鎖を含み、ここで、前記重鎖は、配列番号２０～２２または２８～３０のアミノ酸配列を有する３つの連続した相補性決定領域を含み、前記軽鎖は、配列番号１７～１９または２５～２７のアミノ酸配列を有する３つの連続した相補性決定領域を含む。本発明の１つの態様において、Ａｂまたは断片重鎖は、配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と少なくとも９０％の配列

同一性を有する。本発明の１つの態様において、抗体または断片重鎖は、配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と少なくとも９６％を有する。本発明の１つの態様において、抗体または断片重鎖は、配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と少なくとも９７％を有する。本発明の１つの態様において、抗体または断片重鎖は、配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と少なくとも９８％を有する。本発明の１つの態様において、抗体または断片重鎖は、配列番号４７、３４、３５または３６により表されるアミノ酸配列と少なくとも９９％を有する。本発明の１つの態様において、抗体または断片重鎖は、配列番号４７、３４、３５または３６のアミノ酸配列を有する。

【００３７】

分泌シグナル配列を形成する配列は、成熟ポリペプチド中に存在しない。

【００３８】

本発明は、ヒトＣＤ２０、またはその抗原結合断片および／またはその複合体と結合し、インビボでＢ細胞を枯渇させる、再表面化抗体を提供する。さらに別の態様において、Ｂ細胞はヒトまたはカニクイザル由来である。他の態様において、ＣＤＲ領域は、残基がドナー由来でも、レシピエント抗体由来でもない、アミノ酸置換を含む。

【００３９】

好ましい態様において、本発明の抗体は、ＶＨ領域がヒトＩｇＧ重鎖定常領域と結合した完全長抗体である。いくつかの好ましい態様において、ＩｇＧはヒトＩｇＧ$_1$またはＩｇＧ$_3$である。

【００４０】

本発明の１つの態様において、抗体またはその断片軽鎖は、配列番号４６、３２または３３により表されるアミノ酸配列と少なくも９０％の配列同一性を有する。本発明の１つの態様において、抗体またはその断片軽鎖は、配列番号４６、３２または３３により表される前記アミノ酸配列と少なくとも９５％の配列同一性を有する。本発明の１つの態様において、抗体またはその断片軽鎖は、配列番号４６、３２または３３により表される前記アミノ酸配列と少なくとも９６％の配列同一性を有する。本発明の１つの態様において、抗体またはその断片軽鎖は、配列番号４６、３２または３３により表される前記アミノ酸配列と少なくとも９７％の配列同一性を有する。本発明の１つの態様において、抗体またはその断片軽鎖は、配列番号４６、３２または３３により表される前記アミノ酸配列と少なくとも９８％の配列同一性を有する。本発明の１つの態様において、抗体またはその断片軽鎖は、配列番号４６、３２または３３により表される前記アミノ酸配列と少なくとも９９％の配列同一性を有する。本発明の１つの態様において、抗体または断片軽鎖は、配列番号４６、３２または３３のアミノ酸配列を有する。１つの態様において、再表面化抗ＣＤ２０抗体および／またはその複合体は、ＣＤ２０－７、またはその断片である。

【００４１】

本発明の１つの態様において、抗体または断片は：（ａ）配列番号３２～３６、４６、４７、１７～２２、２５～３０および１～７からなる群から選択される少なくとも１つの配列を含む抗体またはその断片をコード化するＤＮＡを提供し；（ｂ）前記ＤＮＡに少なくとも１つのヌクレオチド突然変異、欠失または挿入を導入して、前記ＤＮＡによりコード化される前記抗体または抗体断片のアミノ酸配列を変更し；（ｃ）前記抗体または抗体断片を発現し；（ｄ）前記発現された抗体または抗体断片を前記改善に関してスクリーニングし、それにより前記改善された抗体または抗体断片を調製することによって調製された、ＣＤ２０と特異的に結合する改善された抗体または断片である。本発明の１つの態様において、改善は、ＣＤ２０に対する増大した親和性である。本発明のさらに別の態様において、増大した親和性は、オリゴヌクレオチド介在性部位特異的突然変異誘発、カセット式突然変異誘発、エラープローンＰＣＲ、ＤＮＡシャッフリング、および大腸菌のミューテーター株の使用などの公知方法によりなされた少なくとも１つのヌクレオチド突然変異、欠失または挿入に起因する。本発明の別の態様において、改善は、ＣＤ２０に対する増大した結合力である。本発明の別の態様において、改善は、ＣＤ２０を発現する細胞に

対する増大した細胞毒性活性である。本発明の別の態様において、改善は増大した発現レベルである。本発明の別の態様において、改善は増大したイディオタイプ活性である。

【００４２】

本発明の別の態様において、本発明の抗体またはその断片は、本発明の別の抗体またはその断片と比較した場合、アミノ酸残基の１以上の保存的置換を含む。いくつかの実施形態において、そのような置換は、抗体またはその断片の重および／または軽鎖のフレームワークおよび／またはＣＤＲおよび／または超可変セクションで起こる。いくつかの実施形態において、そのような置換は、ＣＤＲ配列でのみ起こる。いくつかの実施形態において、約１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２５、３０、３５、４０、４５、５０またはそれ以上のそのような置換がある。他の実施形態において、１～２０、１～１５、１～１０、１～５、１～３、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４，１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１のそのような置換が本発明の抗体またはその断片の重および／または軽鎖中にある。

【００４３】

したがって、本発明は、ＣＤ２０結合抗体またはその機能的断片および／またはその複合体、ならびに疾患に関連するＣＤ２０発現細胞での治療におけるそれらの使用を提供する。具体的な態様において、ＣＤ２０と結合する抗体は、さらに好ましくは、再表面化、ヒト化またはキメラである。ヒト化抗体は、フレームワーク領域（ＦＲ）中にアミノ酸置換を有するものおよびＣＤＲ中に変更を有する親和性成熟抗体を含む。ＣＤＲまたはＦＲ中の置換アミノ酸は、ドナーまたはレシピエント抗体に存在するものに限定されない。他の態様において、本発明のＣＤ２０抗体またはその機能的断片および／またはその複合体は、Ｆｃ領域中のアミノ酸において変更をさらに含み、これは増強されたＣＤＣおよび／またはＡＤＣＣ機能ならびにＢ細胞殺滅をはじめとする改善されたエフェクター機能に至る。

【００４４】

本発明の他の抗ＣＤ２０抗体またはその機能的断片および／またはその複合体は、安定性を改善する特定の変化を有するものを含む。具体的な態様において、ヒト化ＣＤ２０抗体またはその機能的断片は安定性を増大させる。

【００４５】

改善されたインビボＡＤＣＣ機能を有するグリコシル化変異を有する抗体も提供される。

【００４６】

本発明の１つの態様において、抗体またはその断片は、ＣＤ２０と特異的に結合するための手段であり、前記手段は、アポトーシス、ＡＤＣＣおよびＣＤＣを誘導することができる。本発明の１つの態様において、抗体または断片は、配列番号１～７および１７～３６からなる群から選択される少なくとも１つのメンバーを含む少なくとも１つのポリペプチドを含む。

【００４７】

別の態様において、本発明は、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０４８６に対応するハイブリドーマまたはＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０４８７に対応するハイブリドーマにより産生される抗体またはその断片である。

【００４８】

診断適用に関して、本発明の抗体またはその断片は、典型的には、検出可能な部分で標識される。検出可能な部分は、直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを産生することができる任意のものであり得る。例えば、検出可能な部分は、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、もしくは^{131}Ｉなどの放射性同位体；フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、もしくはルシフェリンなどの蛍光もしくは化学発光化合物；またはアルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼもしくはホースラディッシュペルオキシダーゼなどの酵素であり得る。

【００４９】
１つの態様において、本発明は、抗ＣＤ２０細胞溶解抗体および／または断片複合体である。本発明の１つの態様において、ＣＤ２０特異的細胞溶解抗体複合体は、ＣＤ２０を発現するＢ細胞が病状の経過に影響を及ぼす病状の治療において有用である。１つの態様において、標的化Ｂ細胞は望まれない。１つの態様において、病状はＢ細胞疾患である。１つの態様において、病状には望まれないＢ細胞の活性が関与する。本発明の別の態様はＣＤ２０と特異的に結合する抗体複合体であり、ここで、前記抗体または断片は、ＣＤ２０を発現する細胞において、アポトーシス、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を誘導することができる。１つの態様において、病状は非ホジキンリンパ腫である。

【００５０】
本発明の１つの態様は、細胞傷害性薬物に結合した抗体または断片を含む抗ＣＤ２０抗体または断片複合体である。複合体で用いられる細胞傷害性薬物は、メイタンシノイドおよびメイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキサン、ＣＣ－１０６５およびＣＣ－１０６５類似体、ズオカルマイシンおよびズオカルマイシン類似体、エンジイン、例えばカリケアマイシン、ドラスタチンならびにアウリスタチン、トマイマイシン誘導体およびレプトマイシン誘導体をはじめとするドラスタチン類似体であり得る。

【００５１】
さらに好ましい細胞傷害性薬物は、メイタンシノイドおよびメイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン、タキサン、ＣＣ－１０６５およびＣＣ－１０６５類似体である。

【００５２】
メイタンシノイドおよびメイタンシノイド類似体は好ましい細胞傷害性薬物に含まれる。好適なメイタンシノイドの例は当業者には公知であり、メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体のエステルが挙げられる。好適なメイタンシノイドは、例えば、米国特許第４，４２４，２１９号；同第４，２５６，７４６号；同第４，２９４，７５７号；同第４，３０７，０１６号；同第４，３１３，９４６号；同第４，３１５，９２９号；同第４，３３１，５９８号；同第４，３６１，６５０号；同第４，３６２，６６３号；同第４，３６４，８６６号；同第４，４５０，２５４号；同第４，３２２，３４８号；同第４，３７１，５３３号；同第６，３３３，４１０号；同第５，４７５，０９２号；同第５，５８５，４９９号；同第５，８４６，５４５号；同第６，４４４，１６３号；同第６，７１６，８２１号；同第７，２７６，４９７号、同第７，４７３，７９６号および米国公開第２００５０１６９９３３号で開示されている。

【００５３】
タキサンも好ましい細胞傷害性薬物である。本発明における使用に適したタキサンは、例えば、米国特許第６，３７２，７３８号；同第６，３４０，７０１号；同第６，４３６，９３１号；同第６，５９６，７５７号；同第７，４４１，０６３号；同第７，４９５，１１４号および同第７，５９８２９０号で開示されている。

【００５４】
細胞毒性複合体の調製物の１つの候補は、ＣＣ－１０６５の類似体であり、これはストレプトマイセス・ゼレンシス（Streptomyces zelensis）の培養ブロスから単離される強力な抗腫瘍抗生物質である。ＣＣ－１０６５は、通常用いられる抗ガン剤、例えばドキソルビシン、メトトレキサートおよびビンクリスチンよりもインビトロで約１０００倍強力である（B.K. Bhuyan et al., Cancer Res., 42, 3532-3537 (1982)）。ＣＣ－１０６５類似体も本発明での使用に好ましい細胞傷害性薬物である。ＣＣ－１０６５およびその類似体は、米国特許第６，７５６，３９７号；同第７，０４９，３１６号；同第７，３８８，０２６号；同第６，３７２，７３８号；同第６，３４０，７０１号；同第５，８４６，５４５号および同第５，５８５，４９９号で開示されている。

【００５５】
ベンゾジアゼピン誘導体もまた、本発明での使用に好適な細胞傷害性薬物である。ピロロベンゾジアゼピン、例えば米国特許公開第２００９００３６４３１号および欧州特許出

願第２０１９１０４号で記載されているものは好適な細胞傷害性薬物である。ベンゾジアゼピン誘導体、例えば米国仮出願第６１／１５０，２０１号で記載されているものも好適である。

【００５６】

細胞傷害性薬物、例えばメトトレキサート、シスプラチン、カルボプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロラムブシルおよびモルホリノドキソルビシンも、本発明の複合体の調製に好適である。

【００５７】

細胞傷害性薬物を抗体と結合させるために、結合基を使用する。好適な切断性および非切断性結合基は本明細書中に記載され、当該技術分野で周知であり、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定性基、感光性基、ペプチダーゼ不安定性基およびエステラーゼ不安定性基を含む。好ましい結合基はジスルフィド基およびチオエーテル基、特に、米国特許第６，９１３，７４８号、米国特許公開第２００５０１６９９３３号、同第２００９０２７４７１３号および国際公開第２００９／０１３４９７６号に記載されているものである。例えば、複合体は、ジスルフィド交換反応を使用するか、または抗体と細胞傷害性薬物との間にチオエーテル結合を形成することによって構築することができる。抗体を修飾してジスルフィド結合複合体を得るための好ましいリンカーは、４－（２－ピリジルジチオ）ペンタン酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＰＰ）、４－（２－ピリジルジチオ）ブタン酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＰＤＢ）または４－（２－ピリジルジチオ）－２－スルホブタン酸Ｎ－スクシンイミジル（スルホ－ＳＰＤＢ）である。

【００５８】

本発明は、非切断性リンカーによるメイタンシノイドの抗体に対する結合が、抗ＣＤ２０抗体またはその断片の固有の機能的活性が維持されるようにインビボで高用量を達成しつつ、その効力を増強する態様を包含する。抗体または抗体断片を修飾してメイタンシノイドとチオエーテル結合を形成するための好ましい非切断性リンカーは、４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボン酸Ｎ－スクシンイミジル（ＳＭＣＣ）、４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボン酸Ｎ－スクシンイミジル（スルホＳＭＣＣ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（ヨードアセチル）－アミドベンゾエート（ＳＩＡＢ）である。

【００５９】

本発明はさらに、本明細書中で記載されるリンカーが親水性であり（例えば、ＰＥＧを組み入れる）、薬物の活性の増大に寄与する態様も包含する。したがって、本発明の別の態様は、薬物が抗ＣＤ２０抗体に結合して、リンカーデザインが広範囲の腫瘍わたって、特に低抗原発現または薬物耐性腫瘍において活性な複合体を提供する、改善された方法を包含する。加えて、これらの親水性リンカーを組み入れることにより、抗体１分子あたり１５分子までの薬物が高収率で、凝集または沈殿なく結合される。抗体１分子あたり１５分子までの薬物が結合した親水性リンカーを含むこれらの複合体は、高親和性で標的ＣＤ２０抗原と結合する（非修飾抗体と同様）。抗体の修飾に好ましい親水性リンカーは、Ｎ－スクシンイミジル－［（Ｎ－マレイミドプロピオンアミド）－テトラエチレングリコール］エステル（ＮＨＳ－ＰＥＧ$_4$－マレイミド）である。

【００６０】

本発明はさらに、本明細書中で記載されるリンカーが硫黄原子を含まない態様、例えばジカルボン酸ベースの部分由来のリンカーも包含する（米国公開第２００５０１６９９３号を参照のこと）。

【００６１】

本発明はさらに、本明細書中で記載されるリンカーが荷電し、電荷が抗ＣＤ２０抗体またはその断片の修飾後と、結果として得られる薬物複合体中との両方で保持される態様も包含する。

【００６２】

本発明はさらに、約２～８個の薬物分子が抗ＣＤ２０抗体またはその断片に結合した態

様も包含する。好ましい態様は、約２～８個の薬物分子が抗ＣＤ２０抗体またはその断片に結合した複合体であり、この複合体の細胞殺滅は、同じ抗ＣＤ２０抗体にさらに少数またはさらに多数の薬物が結合した薬物負荷と比較すると、より有効である。

【００６３】

本発明のさらに別の態様は、前記方法での治療に対して感受性のガンを治療する方法であって、前記方法は、それを必要とする患者に対して、式ＣＢ－［X_l－（－CH_2－CH_2－Ｏ－）$_n$－Y_p－Ｄ］$_m$（式ＩＩ）またはＤ－Y_p－（－CH_2－CH_2－Ｏ－）$_n$－X_l］$_m$－ＣＢ（式ＩＩ’）

（式中、ＣＢは抗ＣＤ２０抗体を表し；

Ｄは薬物を表し；

Ｘは、チオエーテル結合、アミド結合、カーバメート結合、またはエーテル結合により細胞結合剤に結合した脂肪族、芳香族または複素環単位を表し；

Ｙは、チオエーテル結合、アミド結合、カーバメート結合、エーテル結合、アミン結合、炭素－炭素結合およびヒドラゾン結合からなる群から選択される共有結合により薬物と結合した脂肪族、芳香族、または複素環単位を表し；

ｌは０または１であり；

ｐは０または１であり；

ｍは２～１５の整数であり；そして

ｎは１～２０００の整数である）

の複合体を含む有効量の組成物を非経口投与することを含む。

【００６４】

重要なことに、本発明で記載される複合体は、細胞傷害性薬物での治療に対する感受性が低い、多剤耐性（ｍｄｒ）であるＣＤ２０発現細胞に対して非常に強力であるかまたは有効である。例えば、ガン療法は、異なる化学治療薬での複数ラウンドの治療後に多くの場合生じる薬物耐性の機序を克服するという課題を課す。ガン細胞で観察されるそのような機序の１つは、多剤耐性と呼ばれ、ＡＴＰ結合カセット（ＡＢＣ）トランスポーターによる薬物の排出の増大により引き起こされる（C. Drumond, B. I. Sikic, J. Clin. Oncology, 1999, 17, 1061-1070, G, Szokacs et al., Nature Reviews, 5; 219 - 234, 2006）。薬物耐性のこれらの機序を克服する療法、例えばガン細胞による薬物のこのような流出を干渉するかまたは克服することは重要な価値がある。

【００６５】

本発明の１つの態様は、抗体または断片および／またはその複合体を含む組成物である。本発明のさらに別の態様は、抗体または断片および／またはその複合体ならびに薬剤的に許容される担体を含む医薬組成物である。本発明の１つの態様において、抗体または断片医薬組成物は、複合体および薬剤的に許容される担体を含む。本発明は、抗ＣＤ２０抗体または断片複合体および担体（例えば、薬剤的に許容される担体）を含む組成物（例えば、医薬組成物）を包含する。

【００６６】

本発明はさらに、抗ＣＤ２０抗体またはその断片、複合体および担体（薬剤的に許容される担体）を含み、第２の治療薬をさらに含む組成物（例えば、医薬組成物）も包含する。本発明の組成物は、異常な細胞成長を阻害するかまたはほ乳類（例えば、ヒト）における増殖性障害を治療するために有用である。本発明の組成物はさらに、ほ乳類（例えば、ヒト）における鬱病、不安、ストレス、恐怖症、パニック、不快、精神障害、痛み、および炎症性疾患を治療するためにも有用である。

【００６７】

本発明の１つの態様において、診断試薬は、抗体またはその断片および／またはその複合体を有する組成物であって、本明細書中に記載するように、抗体または断片が標識されている組成物を含む。本発明の１つの態様において、抗体または断片および／またはその複合体標識は、放射標識、フルオロフォア、発色団、造影剤および金属イオンからなる群から選択される。

【００６８】
本発明の１つの態様において、ＣＤ２０発現細胞と特異的に結合するための方法がある。本発明の１つの態様において、ＣＤ２０はＢ細胞により発現される。本発明の１つの態様において、ＣＤ２０発現細胞はガン細胞である。本発明の１つの態様において、抗体または断片は、Ｂ細胞リンパ腫、例えばＮＨＬ、前駆体Ｂ細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫および成熟Ｂ細胞新生物、例えばＢ細胞慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、低悪性度、中悪性度および高悪性度ＦＬを包含する濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫（ＭＡＬＴ型、節性および脾臓型）、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞性骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンストレームマクログロブリン血症、および未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ）からなる群から選択されるガン細胞と結合する。

【００６９】
本発明の別の態様において、ＣＤ２０発現細胞は望まれない免疫応答に影響を及ぼす。本発明の別の態様において、ＣＤ２０発現細胞は炎症に影響を及ぼす。

【００７０】
抗ＣＤ２０抗体またはその複合体、およびそれらを含む組成物は、例えば、細胞の異常な成長を特徴とする障害（例えば、ガンならびに免疫疾患および障害）を治療するかまたは重篤度を減少させるために有用である。本発明の他の適用としては、これらに限定されるものではないが、骨粗鬆症、鬱病、不安、ストレス、恐怖症、パニック、不快、精神障害、および痛みの同時治療（co-treating）または抗てんかん薬、抗菌薬、利尿剤ならびに降圧薬、脂質低下薬、および抗鬱薬として、が挙げられる。

【００７１】
本発明の１つの態様において、細胞を抗体または抗体断片および／またはその複合体と接触させることを含む、ガン細胞の成長を阻害するための方法がある。

【００７２】
本発明の１つの態様において、本明細書中に記載される有効量の抗体または断片および／またはその複合体を患者に投与することを含む、ガン患者を治療する方法がある。本発明の１つの態様において、治療は、前記患者に治療薬を投与することをさらに含む。本発明の１つの態様において、治療薬は細胞傷害性薬物である。

【００７３】
さらに別の態様において、本発明は、例えば関節リウマチなどの炎症性疾患の治療に有用なＣＤ２０特異的細胞溶解抗体または断片および／またはその複合体である。さらなる態様において、本発明は、メトトレキサートとの組み合わせで関節リウマチの治療に有用な、ＣＤ２０を標的とした細胞溶解抗体および／またはその複合体である。１つの態様において、本発明は、１以上のＴＮＦ拮抗物質療法に対して不適切な反応をする軽度から重度の関節リウマチの患者においてメトトレキサートとの組み合わせで関節リウマチの治療に有用なＣＤ２０特異的細胞溶解抗体および／またはその複合体である。

【００７４】
本発明の１つの態様において、抗体またはその断片および／またはその複合体は、ガン患者を治療する方法であって、前記患者に有効量の本明細書中に記載される複合体を投与することを含む方法である。本発明の１つの態様において、治療可能なガンは、Ｂ細胞リンパ腫、例えばＮＨＬ、前駆体Ｂ細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫および成熟Ｂ細胞新生物、例えばＢ細胞慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、低悪性度、中悪性度および高悪性度ＦＬを包含する濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫（ＭＡＬＴ型、節性および脾臓型）、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞性骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンストレームマクログロブリン血症、およ

び未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ）からなる群から選択されるガンである。

【００７５】

本発明の１つの態様では、ガンの疑いのある対象者を診断する方法があり、前記方法は、対象者に診断試薬を投与し；そして対象者内の試薬の分布を検出することを含む。本発明の１つの態様において、診断方法は、Ｂ細胞リンパ腫、例えばＮＨＬ、前駆体Ｂ細胞リンパ芽球性白血病／リンパ腫および成熟Ｂ細胞新生物、例えばＢ細胞慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、低悪性度、中悪性度および高悪性度ＦＬをはじめとする濾胞性リンパ腫（ＦＬ）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫（ＭＡＬＴ型、節性および脾臓型）、ヘアリー細胞白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞性骨髄腫、移植後リンパ増殖性障害、ワルデンストレームマクログロブリン血症、および未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ）からなる群から選択されるガンを診断することを含む。

【００７６】

本発明の別の態様では、免疫障害に罹っていることが疑われる対象者を診断するための方法があり、前記方法は、対象者に診断試薬を投与し；そして対象者内の試薬の分布を検出することを含む。本発明の１つの態様において、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、突発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、自己免疫血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、ＩｇＡ腎症、ＩｇＭ多発性ニューロパチー、重症筋無力症、血管炎、真正糖尿病、レーノー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃炎、橋本病、強直性脊椎炎、Ｃ型肝炎関連クリオグロブリン血症性血管炎からなる群から選択される免疫障害を診断することを含む診断方法。本発明の好ましい態様は、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、突発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、自己免疫血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、ＩｇＡ腎症、ＩｇＭ多発性ニューロパチー、重症筋無力症、血管炎、真正糖尿病、レーノー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃炎、橋本病、強直性脊椎炎、Ｃ型肝炎関連クリオグロブリン血症性血管炎、慢性限局性脳炎、水疱性類天疱瘡、血友病Ａ、膜性増殖性糸球体腎炎、成人性および若年性皮膚筋炎、成人性多発筋炎、慢性蕁麻疹、原発性胆汁性肝硬変症、視神経脊髄炎、グレーブス甲状腺疾患、水疱性類天疱瘡、膜性増殖性糸球体腎炎、チャーグ・ストラウス症候群、喘息、乾癬性関節炎、皮膚炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、湿疹、アテローム性動脈硬化症、白血球接着不全、若年型糖尿病、ライター疾患、ベーチェット病、溶血性貧血、アトピー性皮膚炎，尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性感染性単球増加症、ＨＩＶおよびヘルペス関連疾患、全身性硬化症、シェーグレン症候群および糸球体腎炎からなる群から選択される自己免疫または炎症性疾患に罹っていることが疑われる対象者を診断するための方法である。自己免疫疾患が関節リウマチである場合、抗体を場合によっては第２の治療薬と組み合わせて投与することができ、この第２の治療薬は、好ましくはメトトレキサートである。

【００７７】

本発明のさらなる態様は、Ｂ細胞を本発明の抗体および／またはその複合体と接触させて、それによりＢ細胞を殺滅することを含む、インビボでＢ細胞のアポトーシスを誘導する方法である。

【００７８】

本発明はさらに、ＣＤ２０結合抗体またはその断片および／またはその複合体を、疾患を患っているヒト患者などのほ乳類に投与することにより、疾患を治療する方法も提供する。自己免疫疾患またはＣＤ２０発現ガンを治療するための方法のいずれかにおいて、１つの態様では、抗体はＣＤ２０－７またはＣＤ２０－６である。したがって、１つの態様は、ＣＤ２０陽性ガンを治療する方法であって、ガンを患っている患者に、治療有効量の本発明のＣＤ２０結合抗体および／またはその複合体を投与することを含む方法である。

好ましい態様において、ＣＤ２０発現ガンは、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）またはリンパ球優位型ホジキン病（ＬＰＨＤ）、慢性リンパ性白血病（ＣＬＬ）またはＳＬＬをはじめとする、ＣＤ２０を発現するＢ細胞リンパ腫または白血病である。Ｂ細胞リンパ腫または白血病を治療する方法の１つの態様において、抗体および／またはその複合体を約２０～２０００ｍｇ／ｍ^{2}の投与量範囲で投与する。さらなる態様において、治療方法は、患者に少なくとも１つの化学治療薬を投与することをさらに含み、ここで、非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ）に関して、化学治療薬は、ドキソルビシン、シクロホスファミド、ビンクリスチンおよびプレドニゾロンからなる群から選択される。

【００７９】

さらに提供されるのは、自己免疫または炎症性疾患を治療する方法であって、自己免疫または炎症性疾患を患っている患者に、治療有効量の本明細書中で検討されているＣＤ２０結合抗体または断片および／またはその複合体を投与することを含む方法である。自己免疫または炎症性疾患は、関節リウマチ、若年性関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡（ＳＬＥ）、ウェゲナー病、炎症性腸疾患、突発性血小板減少性紫斑病（ＩＴＰ）、血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、自己免疫血小板減少症、多発性硬化症、乾癬、ＩｇＡ腎症、ＩｇＭ多発性ニューロパチー、重症筋無力症、血管炎、真正糖尿病、レーノー症候群、クローン病、潰瘍性大腸炎、胃炎、橋本病、強直性脊椎炎、Ｃ型肝炎関連クリオグロブリン血症性血管炎、慢性限局性脳炎、水疱性類天疱瘡、血友病Ａ、膜性増殖性糸球体腎炎、成人性および若年性皮膚筋炎、成人性多発筋炎、慢性蕁麻疹、原発性胆汁性肝硬変症、視神経脊髄炎、グレーブス甲状腺疾患、水疱性類天疱瘡、膜性増殖性糸球体腎炎、チャーグ・ストラウス症候群、喘息、乾癬性関節炎、皮膚炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、湿疹、アテローム性動脈硬化症、白血球接着不全、若年型糖尿病、ライター疾患、ベーチェット病、溶血性貧血、アトピー性皮膚炎，尋常性天疱瘡、ウェゲナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性感染性単球増加症、ＨＩＶおよびヘルペス関連疾患、全身性硬化症、シェーグレン症候群および糸球体腎炎からなる群から選択される。自己免疫疾患が関節リウマチである場合、抗体は、場合によって、第２の治療薬とあわせて投与することができ、この第２の治療薬は、好ましくはメトトレキサートである。

【００８０】

１つの態様において、本発明は、皮膚筋炎、ヴェゲナー肉芽腫、ＡＮＣＡ、無形成性貧血、自己免疫溶血性貧血（ＡＩＨＡ）、第ＶＩＩＩ因子欠乏症、血友病Ａ、自己免疫好中球減少症、キャッスルマン症候群、グッドパスチャー症候群、臓器移植拒絶反応、移植片対宿主病（ＧＶＨＤ）、ＩｇＭ依存性、血栓性血小板減少性紫斑病（ＴＴＰ）、橋本病、自己免疫肝炎、リンパ様間質肺炎（ＨＩＶ）、閉塞性細気管支炎（非移植）対ＮＳＩＰ、ギラン・バレー症候群、大血管炎、巨細胞（高安）動脈炎、中血管炎、川崎病、結節性多発動脈炎からなる群から選択される自己免疫または炎症性疾患を治療する方法であって、この疾患を患っている患者に、治療有効量のＣＤ２０結合抗体および／または複合体を投与することを含む方法を提供する。この方法の１つの態様において、ＣＤ２０結合抗体はＣＤ２０－７またはＣＤ２０－６である。

【００８１】

本出願者らの治療方法において、ＣＤ２０結合抗体および／またはその複合体を単独あるいは第２の治療薬、例えば第２の抗体、または化学治療薬もしくは免疫抑制剤と組み合わせて投与することができる。第２の抗体または断片および／またはその複合体は、ＣＤ２０もしくは異なるＢ細胞抗原、またはＮＫもしくはＴ細胞抗原と結合するものであり得る。１つの態様において、第２の抗体または断片および／またはその複合体は放射標識された抗ＣＤ２０抗体である。他の態様において、ＣＤ２０結合抗体を、毒素または放射性同位体をはじめとする細胞傷害性薬物に結合させる。

【００８２】

本発明は、望まれないＢ細胞および／もしくは異常な細胞成長を阻害するか、またはほ乳類（例えば、ヒト）における増殖性障害を治療する方法であって、前記ほ乳類に治療有効量の抗ＣＤ２０抗体および／または複合体（および／またはその溶媒和物および塩）ま

たはその組成物を単独または第２の治療薬と組み合わせて投与することを含む方法を包含する。

【００８３】

本発明の１つの態様は、ＣＤ２０抗体および／またはその複合体を約２０ｍｇ／ｍＬの抗体、約１０ｍＭの硫酸ヒスチジンｐＨ５．８、約６０ｍｇ／ｍｌのスクロース（６％）および約０．２ｍｇ／ｍｌのポリソルベート２０（０．０２％）で含む液体処方である。

【００８４】

本発明はさらに、抗体および／または抗体断片を発現するための発現ベクターをはじめとする、本明細書中で開示される抗体のいずれかをコード化する種々の単離された核酸を提供する。本発明の１つの態様は、本明細書中で記載される抗体または断片をコード化するポリヌクレオチド（複数可）を包含する。

【００８５】

本発明の１つの態様において、ポリヌクレオチドは抗体または断片および／またはその複合体の軽鎖または重鎖をコード化し、そしてポリヌクレオチドはＤＮＡまたはＲＮＡである。本発明の１つの態様において、ポリヌクレオチドはベクター中にある。本発明の別の態様において、ベクターは、前記抗体または断片を発現することができる発現ベクターである。

【００８６】

本発明は、配列番号８～１６のヌクレオチド配列を含む単離された核酸、またはこれらの配列の縮重変異体などを提供する。１つの態様は、配列番号１～７および１７～３６からなる群から選択されるアミノ酸配列を有するポリペプチドをコード化する配列を含み、場合によって保存的アミノ酸置換を有する、単離された核酸である。

【００８７】

別の態様は、宿主細胞における発現のための発現ベクターをはじめとする、本明細書中に記載される核酸を含むベクターである。ベクターを含む宿主細胞も同様に含まれる。

【００８８】

本発明の別の態様は、核酸を含む宿主細胞、および抗体または断片を産生する宿主細胞を包含する。後者の好ましい態様において、宿主細胞はＣＨＯ細胞またはＮＳ０細胞である。

【００８９】

抗体および／またはその複合体を産生する方法が提供され、この方法は、抗体を産生する宿主細胞を培養し、細胞培養から抗体を回収することを含む。

【００９０】

本発明は、ほ乳類細胞、生物、または関連する病状のインビトロ、インサイチュ、およびインビボ診断または治療のために抗ＣＤ２０抗体および／または複合体を合成し、使用する方法を含む。

【００９１】

本発明の態様は、製品またはキットで提供することができる。

【００９２】

対象者の診断または治療で使用するために、製品は、その組成物を使用して、適切な疾患または障害を診断または治療することを表示する添付文書をさらに含む。

【００９３】

本発明の抗体、抗体断片、複合体、組成物および使用法のすべての好ましい態様において、再表面化ＣＤ２０結合抗体は、ＣＤ２０－７であり、前述のような軽および重鎖アミノ酸配列を有する。

【図面の簡単な説明】

【００９４】

【図１】図１は、非形質移入の３００－１９対照細胞（左のパネル）およびＣＤ２０発現３００－１９細胞（右のパネル）への抗体結合のヒストグラムを示している。１０ｎＭのｍｕＣＤ２０－６（上段）、ｍｕＣＤ２０－７（中段）および一次抗体なし（下段）での

染色についてのヒストグラムを示している。
【図２】図２は、フローサイトメトリーで定量される、ＢＪＡＢ細胞へのｍｕＣＤ２０－７（図１Ａ）およびｍｕＣＤ２０－６（図１Ｂ）の結合を示している。結合曲線は、抗体の見かけのK_dに相当する、結合している抗体のEC_{50}を決定するために用いられた。
【図３】図３は、１０ｎＭの濃度のリツキシマブ、ｍｕＣＤ２０－２、ｍｕＣＤ２０－５、ｍｕＣＤ２０－６またはｍｕＣＤ２０－７と一緒にインキュベートしたＲａｍｏｓリンパ腫細胞（図３Ａ）、および１０ｎＭの濃度のリツキシマブ、Ｂ１、ｍｕＣＤ２０－２、またはｍｕＣＤ２０－７と一緒にインキュベートしたＲａｊｉリンパ腫細胞（図３Ｂ）を用いた、アネキシンＶアッセイの結果を示している。対照試料は比較のために含まれる。
【図４】図４は、１０μｇ／ｍＬの濃度の抗ＣＤ２０抗体またはｍｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体で染色したＲａｍｏｓ細胞を用いた脂質ラフトアッセイの結果を示している。トリトンＸ１００存在下（黒色バー）およびトリトンＸ１００非存在下（白抜きバー）における試料のＦＬ１の平均蛍光強度（ＭＦＩ）が、各抗体処理群ごとにプロットされた。試験対象の抗体は、ｍｕＣＤ２０－２、ｍｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、ｍｕＩｇＧ対照抗体（図４Ａ）、およびｍｕＣＤ２０－２、ｍｕＣＤ２０－５、ｍｕＣＤ２０－６、ｍｕＣＤ２０－７、ｍｕＩｇＧ対照抗体（図４Ｂ）であった。
【図５】図５は、１０ｎＭの濃度のｃｈＣＤ２０－２、ｃｈＣＤ２０－７、リツキシマブまたは（抗体なし）対照と一緒にインキュベートしたＲａｍｏｓリンパ腫細胞を用いたアネキシンＶアッセイの結果を示している。
【図６】図６は、補体を含む５％ヒト血清の存在下でｃｈＣＤ２０－２、ｃｈＣＤ２０－７、リツキシマブまたはｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体と一緒にインキュベートしたＤａｕｄｉ（図６Ａ）およびＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２（図６Ｂ）細胞に対するＣＤＣアッセイの結果を示している。
【図７】図７は、Ｄ２０－７ＶＬ（図７Ａ）およびＣＤ２０－７ＶＨ（図７Ｂ）について、再表面化された形態におけるＣＤ２０－７の表面残基および置換を示している。
【図８】図８は、ＣＤ２０－７の可変領域とマウスの対応する配列について、再表面化された配列の配列比較を例示している。軽鎖（ＶＬ）可変領域については図８Ａを；重鎖（ＶＨ）可変領域については図８Ｂを参照せよ。ダッシュ「－」は、マウスの配列と同一であることを示している。
【図９】図９は、フローサイトメトリーで定量化される、ＢＪＡＢ細胞へのｍｕＣＤ２０－７、ｃｈＣＤ２０－７およびｈｕＣＤ２０－７の結合、およびｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体の非結合を示している。結合曲線は、抗体の見かけのＫｄに相当する、結合している抗体のＥＣ５０を決定するために用いられた。
【図１０】図１０はＥＬＩＳＡによるもので、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞由来の膜標本に対するｈｕＣＤ２０－７の結合を示している。
【図１１】図１１は、１０ｎＭ、１ｎＭおよび０．１ｎＭの濃度のｍｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７、またはｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体と一緒にインキュベートされたＲａｍｏｓリンパ腫細胞に対するアネキシンＶアッセイの結果を示している。
【図１２】図１２は、$3x10^{-8}$Ｍ～$1.7x10^{-13}$Ｍの濃度範囲のｈｕＣＤ２０－７、Ｂ１、リツキシマブ、ＧＡ１０１－Ｆ、および２Ｆ２と一緒にインキュベートされたＲａｍｏｓリンパ腫細胞に対するアネキシンＶアッセイの結果を示している。対照試料が比較された。「Ｂ１」は、Ｂｅｘｘａｒ（商標登録）（ベックマン・コールター社）の未標識形態に相当し；一方「ＧＡ１０１－Ｆ」は、アフツズマブすなわちＧＡ１０１（ホフマン・ラ・ロシュ社）のフコシル化形態に相当し；さらに一方の「２Ｆ２」は、オファツムマブ（ジェンマブ（Ｇｅｎｍａｂ）／ＧＳＫ社）に相当する。
【図１３】図１３は、１０ｎＭの濃度のｈｕＣＤ２０－７、Ｂ１、またはリツキシマブと一緒にインキュベートされたリンパ腫細胞に対するアネキシンＶアッセイの結果を示している。未処理細胞の対照試料を比較に用いた。実験には、Ｒａｍｏｓ細胞（図１３Ａ）、Ｒａｊｉ細胞（図１３Ｂ）、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞（図１３Ｃ）、Ｊｅｋｏ－１細胞（図１３Ｄ）およびＧｒａｎｔａ－５１９リンパ腫細胞（図１３Ｅ）が含まれる。

【図１４】図１４は、Ｒａｍｏｓ細胞、並びに１０μｇ／ｍＬのｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、２Ｆ２およびＧＡ１０１－Ｆ抗体を用いた脂質ラフトアッセイの結果を示している。トリトンＸ１００存在下（黒色バー）およびトリトンＸ１００非存在下（白色バー）における試料のＦＬ１のＭＦＩが、各抗体処理群ごとにプロットされる。

【図１５】図１５は、補体を含む５％ヒト血清の存在下でｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、ＧＡ１０１－ＦまたはｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体と一緒にインキュベートされたＤａｕｄｉ（図１５Ａ）およびＲａｍｏｓリンパ腫細胞（図１５Ｂ）に対するＣＤＣアッセイの結果を示している。

【図１６】図１６は、補体を含む５％ヒト血清の存在下で、ｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、またはｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体と一緒にインキュベートされたＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２（図１６Ａ）およびＲＬリンパ腫細胞（図１６Ｂ）に対するＣＤＣアッセイの結果を示している。

【図１７】図１７は、効果細胞としての精製ヒトＮＫ細胞存在下でｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、２Ｆ２またはｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体と一緒にインキュベートされたＲａｍｏｓリンパ腫細胞（図１７Ａ）およびＪＶＭ－１３ＣＬＬ細胞（図１７Ｂ）を用いたＡＤＣＣアッセイの結果を示している。

【図１８】図１８は、ｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、２Ｆ２、ＧＡ１０１－Ｆ、Ｂ１（図１８Ａ）、並びにｍｕＣＤ２０－６およびｍｕＣＤ２０－７（図１８Ｂ）を用いたフローサイトメトリーで定量化される、ヒトＣＤ２０を形質移入された細胞に対するＣＤ２０抗体群の結合を示している。

【図１９】図１９は、ｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、２Ｆ２、ＧＡ１０１－Ｆ、Ｂ１（図１９Ａ）並びにｍｕＣＤ２０－６、ｍｕＣＤ２０－７、リツキシマブおよび２Ｆ２（図１９Ｂ）を用いたフローサイトメトリーで定量化される、ヒトＣＤ２０　Ａ１７９Ｓ　Ｐ１７２Ｓを形質移入された細胞に対するＣＤ２０抗体群の結合を示している。

【図２０】図２０は、ｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、２Ｆ２、ＧＡ１０１－Ｆ（図２０Ａ）、並びにｍｕＣＤ２０－６、ｍｕＣＤ２０－７、リツキシマブおよび２Ｆ２（図２０Ｂ）を用いたフローサイトメトリーで定量化される、ヒトＣＤ２０　Ｎ１６３Ｄを形質移入された細胞に対するＣＤ２０抗体群の結合を示している。

【図２１】図２１は、ｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、２Ｆ２、ＧＡ１０１－Ｆ（図２１Ａ）、並びにｍｕＣＤ２０－６、ｍｕＣＤ２０－７、リツキシマブおよび２Ｆ２（図２１Ｂ）を用いたフローサイトメトリーで定量化される、ヒトＣＤ２０　Ｎ１６３Ｄ　Ｎ１６６Ｄを形質移入された細胞に対するＣＤ２０抗体群の結合を示している。

【図２２】図２２はＥＬＩＳＡによるもので、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１および－ＳＰＰ－ＤＭ１（図２２Ａ）またはｈｕＣＤ２０－７－ｓｕｌｆｏｍａｌ－ＤＭ４複合体（図２２Ｂ）と比較した、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞から得られた膜標本に対するｈｕＣＤ２０－７の結合を示している。

【図２３】図２３は、$3x10^{-8}$Ｍ～$1x10^{-11}$Ｍの濃度範囲のリツキシマブ、ｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、またはｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＤＢ－ＤＭ４と一緒にインキュベートされたＲａｍｏｓリンパ腫細胞に対するアネキシンＶアッセイの結果を示している。Ｒａｍｏｓ細胞を、同じ濃度の非結合性ｈｕＩｇＧ１－ＳＭＣＣ－ＤＭ１およびｈｕＩｇＧ１－ＳＰＤＢ－ＤＭ４複合体で処理した。

【図２４】図２４は、補体を含む５％ヒト血清の存在下でｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＤＢ－ＤＭ４、ｈｕＣＤ２０－７－ＰＥＧ４－ｍａｌ－ＤＭ４、リツキシマブまたはｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体と一緒にインキュベートされたＤａｕｄｉ（図２４Ａ）およびＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞（図２４Ｂ）に対するＣＤＣアッセイの結果を示している。

【図２５】図２５は、補体を含む５％ヒト血清の存在下でｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、ｈｕＣＤ２０－７－ｓｕｌｆｏ－ｍａｌ－ＤＭ４、リツキシマブまたはｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体と一緒にインキュベートされたＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２（図２５Ａ）およびＲａｍｏｓリンパ腫細胞（図２５Ｂ）に対するＣＤＣアッ

セイの結果を示している。
【図２６】図２６は、効果細胞としての精製ヒトＮＫ細胞存在下でｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、リツキシマブ、２Ｆ２またはｈｕＩｇＧ１アイソタイプ対照抗体と一緒にインキュベートされたＲａｍｏｓ（図２６Ａ）およびＧｒａｎｔａ－５１９リンパ腫細胞（図２６Ｂ）に対するＡＤＣＣアッセイの結果を示している。
【図２７】図２７は、３ｘ１０$^{-8}$Ｍ～１ｘ１０$^{-11}$Ｍの濃度範囲のｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、リツキシマブまたはｈｕＩｇＧ１－ＳＭＣＣ－ＤＭ１対照複合体と一緒に５日間インキュベートされたＲａｍｏｓ（図２７Ａ）およびＤａｕｄｉ（図２７Ｂ）細胞に対するＷＳＴ－８細胞毒性試験の結果を示している。
【図２８】図２８は、３ｘ１０$^{-8}$Ｍ～１ｘ１０$^{-11}$Ｍの濃度範囲のｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、リツキシマブまたは非結合性ｈｕＩｇＧ１－ＳＭＣＣ－ＤＭ１対照複合体と一緒に５日間インキュベートされたＧｒａｎｔａ－５１９（図２８Ａ）およびＳＣ－１（図２８Ｂ）細胞に対するＷＳＴ－８細胞毒性試験の結果を示している。
【図２９】図２９は、３ｘ１０$^{-8}$Ｍ～１ｘ１０$^{-11}$Ｍの濃度範囲のｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、リツキシマブまたはｈｕＩｇＧ１－ＳＭＣＣ－ＤＭ１対照複合体と一緒に５日間インキュベートされたＤＯＨＨ－２　Ｂ細胞リンパ腫細胞（図２９Ａ）およびＭｏｌｔ－４　Ｔ細胞白血病細胞（図２９Ｂ）に対するＷＳＴ－８細胞毒性試験の結果を示している。Ｍｏｌｔ－４細胞はＣＤ２０陰性である。
【図３０】図３０は、３ｘ１０$^{-8}$Ｍ～１ｘ１０$^{-11}$Ｍの濃度範囲のｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、リツキシマブ、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１または非結合性ｈｕＩｇＧ１抗体およびｈｕＩｇＧ１－ＳＭＣＣ－ＤＭ１対照複合体と一緒に５日間インキュベートされたＲａｍｏｓ（図３０Ａ）およびＤａｕｄｉ（図３０Ｂ）細胞に対するＷＳＴ－８細胞毒性試験の結果を示している。
【図３１】図３１は、フローサイトメトリーで定量化される、ＳＵ－ＤＨＬ－４細胞へのｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１、リツキシマブまたはリツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１の結合を示している（図３１Ａ）。図３１Ｂは、ｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１、リツキシマブまたはリツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１と一緒に５日間インキュベートされた抗原陽性ＳＵ－ＤＨＬ－４　Ｂ細胞リンパ腫細胞および抗原陰性ＣＯＬＯ２０５　結腸がん細胞に対するＷＳＴ－８細胞毒性試験の結果を示している。
【図３２】図３２は、ＳＵ－ＤＨＬ－４細胞の１細胞当たりに結合したｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１またはリツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１の量（図３２Ａ）、およびＳＵ－ＤＨＬ－４細胞のｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１またはリツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１への曝露から２２時間後に産生されるリジン－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１代謝産物の量（図３２Ｂ）を示している。
【図３３】図３３は、３ｘ１０$^{-8}$Ｍ～１ｘ１０$^{-11}$Ｍの濃度範囲のｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、ｈｕＣＤ２０－７－ＰＥＧ４－ｍａｌ－ＤＭ４およびｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＤＢ－ＤＭ４（図３１Ａ）、並びにｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１、ｈｕＣＤ２０－７－ｓｕｌｆｏ－ｍａｌ－ＤＭ４およびｈｕＩｇＧ１－ＳＭＣＣ－ＤＭ１およびｈｕＩｇＧ１－ＳＰＰ－ＤＭ１対照複合体（図３１Ｂ）と一緒に５日間インキュベートされたＧｒａｎｔａ－５１９細胞に対する例示的なＷＳＴ－８細胞毒性試験の結果を示している。
【図３４】図３４は、ＳＵ－ＤＨＬ－４　びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫細胞をＳＣＩＤマウスの皮下に移植した確立された異種移植モデルを用いた実験の結果を示している。マウスは、細胞接種後１４、２１および２８日目（矢印）の一週間ごとに３回、１ｍｇ／ｋｇまたは１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７またはリツキシマブのいずれかで処置した。異なる処置群の平均腫瘍体積を、腫瘍細胞接種後の時間に対してプロットする。
【図３５】図３５は、ＳＣＩＤマウスの静脈内に移植したＤａｕｄｉリンパ腫細胞を用いたｉｎ　ｖｉｖｏ異種移植片試験の結果を示している。マウスは、細胞接種後の７日目に

一度、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１または５ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１のいずれかで（図３５Ａ）、並びに１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１またはｈｕＣＤ２０－７－ＢＭＰＳ－ＤＭ１のいずれかで（図３５Ｂ）、処置した。異なる処置群における生存マウスの数を、腫瘍細胞接種後の時間に対してプロットする。

【図３６】図３６は、ＳＣＩＤマウスの皮下に移植されたＤＯＨＨ－２　濾胞性リンパ腫細胞を用いた例示的な異種移植片試験の結果を示している。マウスは、細胞接種後３日目に一度、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１または５ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１のいずれかで処置した。異なる処置群の平均腫瘍体積を腫瘍細胞接種後の時間に対してプロットする。

【発明を実施するための形態】

【００９５】

本発明は、ＣＤ２０発現（例えば、陽性）細胞に対する以下の３つの細胞傷害性活性、アポトーシス、ＡＤＣＣ、およびＣＤＣの誘導、に高い力価を有する新規の抗ＣＤ２０抗体（すなわち、ＩＩＩ型）を提供する。さらに、ｉｎ　ｖｉｖｏ腫瘍モデルを用いて示されるように、抗ＣＤ２０抗体とＳＭＣＣ－ＤＭ１の複合体は、ＣＤ２０発現細胞を予想外に死滅させる。

【００９６】

定義

【００９７】

あらゆる態様において、「脂肪族基」とは、アルキル、アルケニルまたはアルキニル基と定義される。アルキル基は、直鎖または分岐状であり得る脂肪族炭化水素基で、好ましくは鎖または環の中に１～２０個の炭素原子を有し、好ましくは３～１０個の炭素原子を有する。鎖中に１～１２個の炭素原子を有するアルキル基がさらに好ましい。「分岐状」とは、メチル、エチルまたはプロピル等の1つまたは複数の低級アルキル基が直鎖アルキル鎖に結合していることを意味する。アルキル基の例としては、メチル、エチル、ｎ－プロピル、ｉ－プロピル、ｎ－ブチル、ｔ－ブチル、ｎ－ペンチル、３－ペンチル、オクチル、ノニル、デシル、シクロペンチルおよびシクロヘキシルが挙げられる。

【００９８】

アルケニル基は、炭素炭素二重結合を含み、直鎖または分岐状であり得、好ましくは２～１５個の炭素原子を鎖中に有する脂肪族炭化水素基である。アルケニル基は鎖中に２～１２個の炭素原子を有することがより好ましく；鎖中に約２～４個の炭素原子を有することがより好ましい。アルケニル基の例としては、エテニル、プロペニル、ｎ－ブテニル、ｉ－ブテニル、３－メチルブタ－２－エニル、ｎ－ペンテニル、ヘプテニル、オクテニル、ノネニル、およびデセニルが挙げられる。

【００９９】

アルキニル基は、炭素炭素三重結合を含み、直鎖でも分岐状でもよく、好ましくは鎖中に２～１５個の炭素原子を有する脂肪族炭化水素基である。アルキニル基は鎖中に２～１２個の炭素原子を有することがより好ましく；鎖中に２～４個の炭素原子を有することがより好ましい。アルキニル基の例としては、エチニル、プロピニル、ｎ－ブチニル、２－ブチニル、３－メチルブチニル、ｎ－ペンチニル、ヘプチニル、オクチニルおよびデシニルが挙げられる。

【０１００】

本明細書で使用される場合、「芳香族基」という用語は、６～１４個の炭素原子、好ましくは６～１０個の炭素原子を有する芳香族の単環式または複環式炭化水素環構造から成る置換または非置換のアリール基を意味する。アリール基の例としては、フェニルおよびナフチルが挙げられる。置換基には、限定されないが、アルキル基、ハロゲン、ニトロ、アミノ、ヒドロキシルおよびメトキシ、エトキシおよびプロポキシ等のC_1～C_3アルコキシ基が挙げられる。

【０１０１】
「複素環」、「ヘテロシクリル」および「複素環式基」という用語は、少なくとも１つの環員がヘテロ原子である、飽和、部分不飽和もしくは不飽和の、非芳香族の安定な３～１４員、好ましくは５～１０員の単環式、二環式または複環式の環、または、少なくとも１つのヘテロ原子を有する芳香族の、好ましくは５～１０員の単環式、二環式もしくは複環式の環を意味する。典型的に、ヘテロ原子には、限定されないが、酸素、窒素、硫黄、セレン、およびリン原子が含まれる。好ましいヘテロ原子は酸素、窒素および硫黄である。複素環は、Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W. A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), in particular Volumes 13, 14, 16, 19, and 28; and J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566に記載されている。また、「ヘテロシクリル」には、飽和、部分不飽和環、または芳香族の炭素環式もしくは複素環の環と縮合する、複素環の遊離基も含まれる。

【０１０２】
脂肪族、芳香族、且つ複素環である単位はまた、荷電した置換基も有し得る。荷電した置換基は、限定されないが、カルボン酸塩、スルホン酸およびリン酸から選択される負に帯電した基、または三級もしくは四級アミノ基から選択される正に帯電した基であり得る。

【０１０３】
「ヘテロアリール」という用語は、５または６員環の一価の芳香族遊離基を意味し、窒素、酸素、および硫黄から独立して選択される1つまたは複数のヘテロ原子を含む、５～１８個の原子からなる縮合環構造（少なくともその１つは芳香族である）が含まれる。ヘテロアリール基の例は、ピリジニル（例えば、２－ヒドロキシピリジニルを含む）、イミダゾリル、イミダゾピリジニル、ピリミジニル（例えば、４－ヒドロキシピリミジニルを含む）、ピラゾリル、トリアゾリル、ピラジニル、テトラゾリル、フリル、チエニル、イソオキサゾリル、チアゾリル、オキサゾリル、イソチアゾリル、ピロリル、キノリニル、イソキノリニル、インドリル、ベンゾイミダゾリル、ベンゾフラニル、シンノニリル、インダゾリル、インドリジニル、フタラジニル、ピリダジニル、トリアジニル、イソインドリル、プテリジニル、プリニル、オキサジアゾリル、トリアゾリル、チアジアゾリル、フラザニル、ベンゾフラザニル、ベンゾチオフェニル、ベンゾチアゾリル、ベンゾオキサゾリル、キナゾリニル、キノキサリニル、ナフチリジニル、およびフロピリジニルである。

【０１０４】
複素環またはヘテロアリール基は、可能な場合、炭素（炭素結合型）または窒素（窒素結合型）が結合され得る。例として、限定するものではないが、炭素結合型の複素環およびヘテロアリールは、ピリジンの２、３、４、５、もしくは６位、ピリドアジンの３、４、５、もしくは６位、ピリミジンの２、４、５、もしくは６位、ピラジンの２、３、５、もしくは６位、フラン、テトラヒドロフラン、チオフラン、チオフェン、ピロールもしくはテトラヒドロピロールの２、３、４、もしくは５位、オキサゾール、イミダゾールもしくはチアゾールの２、４、もしくは５位、イソキサゾール、ピラゾール、もしくはイソチアゾールの３、４、もしくは５位、アジリジンの２もしくは３位、アゼチジンの２、３、もしくは４位、キノリンの２、３、４、５、６、７、もしくは８位、またはイソキノリンの１、３、４、５、６、７、もしくは８位に結合される。

【０１０５】
例として、限定するものではないが、窒素結合型複素環およびヘテロアリールは、アジリジン、アゼチジン、ピロール、ピロリジン、２－ピロリン、３－ピロリン、イミダゾール、イミダゾリジン、２－イミダゾリン、３－イミダゾリン、ピラゾール、ピラゾリン、２－ピラゾリン、３－ピラゾリン、ピペリジン、ピペラジン、インドール、インドリン、１Ｈ－インダゾールの１位、イソインドール、またはイソインドリンの２位、モルホリンの４位、およびカルバゾール、またはＯ－カルボリンの９位に結合される。

【０１０６】
ヘテロアリールおよびヘテロシクリル基中に存在するヘテロ原子には、ＮＯ、ＳＯ、およびＳＯ$_2$等の酸化型が含まれる。ヘテロアリールまたはヘテロシクリルの置換基には、限定されないが、アルキル基、ハロゲン、ニトロ、アミノ、ヒドロキシルおよびメトキシ、エトキシおよびプロポキシ等のＣ$_1$～Ｃ$_3$アルコキシ基が含まれる。
【０１０７】
「ハロゲン」には、フッ素、塩素、臭素およびヨウ素原子が含まれる。フッ素および塩素原子が好ましい。
【０１０８】
「複合体」という用語は、本明細書で使用される場合、細胞結合物質（すなわち、抗ＣＤ２０抗体またはその断片）に結合している化合物またはその誘導体を意味し、一般式Ｃ－Ｌ－ＣＢＡにより定義され、式中、Ｃ＝化合物、Ｌ＝リンカー、およびＣＢＡ＝細胞結合物質すなわち抗ＣＤ２０抗体または断片である。いくつかの実施形態において、一般式Ｄ－Ｌ－ＣＢＡ（式中、Ｄ＝薬剤、Ｌ＝リンカーおよびＣＢＡ＝細胞結合物質すなわち抗ＣＤ２０抗体または断片）も、同様に用いられ得る
【０１０９】
リンカーとは、化合物、通常はメイタンシノイド等の薬剤を、抗ＣＤ２０抗体またはその断片等の細胞結合物質に、安定な共有結合様式で連結できるあらゆる化学部分である。リンカーは、化合物または抗体が活性を維持する条件下で、酸による切断、光による切断、ペプチダーゼによる切断、エステラーゼによる切断、およびジスルフィド結合開裂を起こし易くてもよく、またはそれらに対して実質的に抵抗性であってもよい。好適なリンカーは該技術分野において周知であり、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸に不安定な基、光に不安定な基、ペプチダーゼに不安定な基およびエステラーゼに不安定な基が挙げられる。また、リンカーには、本明細書に記載される、当該技術分野で知られている、荷電したリンカー、およびその親水性形態も含まれる。
【０１１０】
「異常な細胞増殖」とは、本明細書で使用される場合、特に明記しない限りは、正常な制御機構に非依存的（例えば、接触阻止の喪失）である細胞増殖を意味する。これには、例えば、（１）変異型チロシンキナーゼの発現または受容体型チロシンキナーゼの過剰発現により増殖する腫瘍細胞（腫瘍）；（２）異常なチロシンキナーゼ活性化が起こる他の増殖性疾患の良性細胞および悪性細胞；（３）受容体型チロシンキナーゼにより増殖するあらゆる腫瘍；（４）異常なセリン／トレオニンキナーゼ活性化により増殖するあらゆる腫瘍；並びに（５）異常なセリン／トレオニンキナーゼ活性化が起こる他の増殖性疾患の良性細胞および悪性細胞の異常増殖が含まれる。
【０１１１】
本発明は、腫瘍形成性疾患を含むＣＤ２０を発現する細胞が関与する種々の疾患、および免疫疾患、例えば、自己免疫性疾患または炎症性疾患を治療および／または予防するのに用いられ得る。
【０１１２】
「がん」および「がん性の」という用語は、典型的には制御されない細胞増殖により特徴付けられる、哺乳類における生理的条件を意味する、または説明している。「腫瘍」は1つまたは複数のがん性細胞から成る。がんの例としては、限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽腫、肉腫、および白血病またはリンパ系腫瘍が含まれる。治療および／または予防され得る「腫瘍形成性の」疾患の例としては、Ｂ細胞リンパ腫（ＮＨＬを含む）、前駆Ｂリンパ芽球性白血病リンパ腫および成熟Ｂ細胞腫瘍、例えば、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ種（ＳＬＬ）等の、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ）、濾胞性リンパ腫（ＦＬ）（低悪性度の、中悪性度のおよび高悪性度のＦＬを含む）、皮膚濾胞中心リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫（ＭＡＬＴ型、結節性および脾臓型）、毛様細胞性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、形質細胞腫、形質細胞骨髄腫、移植後リンパ

球増加症、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、並びに未分化大細胞リンパ腫（ＡＬＣＬ）が含まれる。

【０１１３】

ＣＤ２０発現Ｂ細胞が関与し、治療および／または予防され得る「免疫不全」および免疫疾患の例としては、乾癬、乾癬性関節炎、皮膚炎、全身性強皮症および全身性硬化症、炎症性腸疾患（ＩＢＤ）、クローン病、潰瘍性大腸炎、呼吸窮迫症候群、髄膜炎、脳炎、ブドウ膜炎、糸球体腎炎、湿疹、喘息、アテローム性動脈硬化、白血球接着不全、多発性硬化症、レイノー症候群（Reynaud’s syndrome）、シェーグレン症候群、若年発症糖尿病、ライター病、ベーチェット病、免疫複合体性腎炎、ＩｇＡ腎症、ＩｇＭ多発ニューロパシー、急性特発性血小板減少性紫斑病および慢性特発性血小板減少性紫斑病等の免疫性の血小板減少、溶血性貧血、重症筋無力症ールプス腎炎、全身性エリテマトーデス、関節リウマチ（ＲＡ）、アトピー性皮膚炎、天疱瘡、グレーブス病、橋本甲状腺炎、ウェゲナー肉芽腫症、オーメン症候群、慢性腎不全、急性伝染性単核症、ＨＮ、およびヘルペスウイルス関連疾患が挙げられる。さらに、重症急性呼吸窮迫症候群および脈絡網膜炎（chorioretinitis）が例として挙げられる。さらなる例としては、Ｂ細胞がエプスタイン－バーウイルス（ＥＢＶ）等のウィルスに感染することにより引き起こされる疾患および障害が挙げられる。

【０１１４】

「治療薬」には、抗体、ペプチド、タンパク質、酵素等の生物学的作用物質または化学療法剤の両方が包含される。

【０１１５】

「化学療法剤」とは、がん治療に有用な化学物質である。化学療法剤の例としては、エルロチニブ（ＴＡＲＣＥＶＡ（商標登録）、ジェネンテック社／ＯＳＩ・ファーマスーティカルズ社）、ボルテゾミブ（ＶＥＬＣＡＤＥ（商標登録）、ミレニアム・ファーマスーティカルズ社）、フルベストラント（ＦＡＳＬＯＤＥＸ（商標登録）、アストラゼネカ社）、スーテント（ＳＵ１１２４８、ファイザー社）、レトロゾール（ＦＥＭＡＲＡ（商標登録）、ノバルティス社）、メシル酸イマチニブ（ＧＬＥＥＶＥＣ（商標登録）、ノバルティス社）、ＰＴＫ７８７／ＺＫ２２２５８４（ノバルティス社）、オキサリプラチン（Ｅｌｏｘａｔｉｎ（商標登録）、サノフィ社）、５－ＦＵ（５－フルオロウラシル）、ロイコボリン、ラパマイシン（シロリムス、ＲＡＰＡＭＵＮＥ（商標登録）、ワイス社）、ラパチニブ（ＴＹＫＥＲＢ（商標登録）、ＧＳＫ５７２０１６、グラクソ・スミスクライン社）、ロナファーニブ（ＳＣＨ６６３３６）、ソラフェニブ（ＢＡＹ４３－９００６、バイエル・ラボ社）、およびゲフィチニブ（ＩＲＥＳＳＡ（商標登録）、アストラゼネカ社）、ＡＧ１４７８、ＡＧ１５７１（ＳＵ５２７１；スーゲン）、チオテパおよびＣＹＴＯＸＡＮ（商標登録）シクロホスファミド（cyclosphosphamide）等のアルキル化剤；ブスルファン、インプロスルファンおよびピポスルファン等のスルホン酸アルキル；ベンゾドーパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドーパ（meturedopa）、およびウレドーパ（uredopa）等のアジリジン；エチレンイミンおよびメチラメラミン（methylamelamine）、例えばアルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホラミドおよびトリメチロメラミン；アセトゲニン（特にブラタシンおよびブラタシノン）；カンプトテシン（合成類似化合物トポテカンを含む）；ブリオスタチン；カリスタチン；ＣＣ－１０６５（そのアドゼレシン、カルゼレシンおよびビセレシン合成類似化合物を含む）；クリプトフィシン（特にクリプトフィシン１およびクリプトフィシン８）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似化合物、ＫＷ－２１８９およびＣＢ１－ＴＭ１を含む）；エリュテロビン；パンクラチスタチン；サルコジクチン；スポンジスタチン；クロラムブシル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロルエタミン酸化物塩酸塩、メルファラン、ノベムビシン、フェネステリン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード等のナイトロジェンマスタード；カルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン等のニトロソ尿素（nitrosurea）；エンジイ

ン抗菌剤等の抗菌剤（例えば、カリチアマイシン、特にカリチアマイシンγＩＩおよびカリチアマイシンωＩＩ（Angew Chem. Intl. Ed. Engl.(1994) 33:183-186）；ジネミシン、例えばジネミシンＡ；クロドロネート等のビスホスホネート；エスペラミシン；並びに、ネオカルチノスタチン発色団および関連色素蛋白エンジイン抗菌剤発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン（authramycin）、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン（carabicin）、カルミノマイシン（caminomycin）、カルジノフィリン、クロモマイシン（chromomycinis）、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、ＡＤＲＩＡＭＹＣＩＮ（商標登録）（ドキソルビシン）、モルホリノ－ドキソルビシン、シアノモルホリノ－ドキソルビシン、２－ピロリノ－ドキソルビシンおよびデオキシドキソルビシン）、エピルビシン、エソルビシン、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトマイシンＣ等のマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；メトトレキサートおよび５－フルオロウラシル（５－ＦＵ）等の代謝拮抗剤；デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトレキサート等の葉酸類似体；フルダラビン、６－メルカプトプリン、チアムニプリン（thiamniprine）、チオグアニン等のプリン類似体；アンシタビン、アザシチジン、６－アザウリジン、カルモフール、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタビン、フロクスウリジン等のピリミジン類似体；カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン等のアンドロゲン；アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン等の抗副腎剤（anti-adrenal）；フォリン酸（frolinic acid）等の葉酸補充液；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド（aldophosphamide glycoside）；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ビサントレン；エダトレキサート；デフォファミン（defofamine）；デメコルチン；ジアジクオン；エフロルニチン（elformithine）；エリプチニウムアセタート；エポシロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダミン；メイタンシンおよびアンサマイトシン等のメイタンシノイド；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダモール（mopidanmol）；ニトラエリン（nitraerine）；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ポドフィリン酸；２－エチルヒドラジド；プロカルバジン；ＰＳＫ（商標登録）多糖類複合体（ＪＨＳナチュラル・プロダクツ社（JHS Natural Products）、オレゴン州ユージーン）；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフィラン（sizofuran）；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２’，２’’－トリクロロトリエチルアミン；トリコテシン（特にＴ－２毒素、ベルカリンＡ（verracurin A）、ロリジンＡおよびアングイジン）；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトブロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「シトシンアラビノシド（Ara-C）」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、例えば、ＴＡＸＯＬ（商標登録）（パクリタキセル；ブリストル・マイヤーズ・スクイブ社（Bristol-Myers Squibb Oncology）、ニュージャージー州プリンストン）、ＡＢＲＡＸＡＮＥ（商標登録）（無クレモフォール）、パクリタキセルのアルブミン改変ナノ粒子製剤（アメリカン・ファーマシューティカル・パートナーズ社（American Pharmaceutical Partners）、イリノイ州シャンバーグ（Schaumberg））、およびＴＡＸＯＴＥＲＥ（商標登録）（ドセタキセル（doxetaxel）；ローヌ・プーラン・ローラー社（Rhone-Poulenc Rorer）、フランス、アントニー）；クロランブシル（chloranmbucil）；ＧＥＭＺＡＲ（商標登録）（ゲムシタビン）；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキサート；シスプラチンおよびカルボプラチン等の白金類似体；ビンブラスチン；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ＮＡＶＥＬＢＩＮＥ（商標登録）（ビノレルビン）；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；カペシタビン（ＸＥＬＯＤＡ（商標登録））；イバンドロン酸；ＣＰＴ－１１；トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ

２０００；ジフルオロメチルオルニチン（ＤＭＦＯ）；レチノイン酸等のレチノイド；および上記のいずれかの薬剤的に許容できる塩、酸および誘導体が含まれる。

【０１１６】

また、「化学療法剤」の定義には、（ｉ）抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体調節物質（ＳＥＲＭ）等の、例えば、タモキシフェン（ＮＯＬＶＡＤＥＸ（商標登録）；クエン酸タモキシフェンを含む）、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、４－ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、ＬＹ１１７０１８、オナプリストン、およびＦＡＲＥＳＴＯＮ（商標登録）（クエン酸トレミフェン）を含む、腫瘍に対するホルモン作用を制御または阻害するよう作用する抗ホルモン剤；（ｉｉ）例えば、４（５）－イミダゾール、アミノグルテチミド、ＭＥＧＡＳＥ（商標登録）（酢酸メゲストロール）、ＡＲＯＭＡＳＩＮ（商標登録）（エキセメスタン；ファイザー社）、ホルメスタン（formestanie）、ファドロゾール、ＲＩＶＩＳＯＲ（商標登録）（ボロゾール）、ＦＥＭＡＲＡ（商標登録）（レトロゾール；ノバルティス社）、およびＡＲＩＭＩＤＥＸ（商標登録）（アナストロゾール；アストラゼネカ社）等の、副腎におけるエストロゲン産生を制御する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤；（ｉｉｉ）フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリン等の抗アンドロゲン；並びにトロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；（ｉｖ）タンパク質キナーゼ阻害剤；（ｖ）脂質キナーゼ阻害剤；（ｖｉ）例えば、ＰＫＣ－α、ＲａｌｆおよびＨ－Ｒａｓ等のアンチセンスオリゴヌクレオチド、特に異常な細胞増殖に関わるシグナル経路における遺伝子の発現を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド；（ｖｉｉ）ＶＥＧＦ発現阻害剤（例えば、ＡＮＧＩＯＺＹＭＥ（商標登録））およびＨＥＲ２発現阻害剤等のリボザイム；（ｖｉｉｉ）遺伝子治療ワクチン等のワクチン、例えば、ＡＬＬＯＶＥＣＴＩＮ（商標登録）、ＬＥＵＶＥＣＴＩＮ（商標登録）、およびＶＡＸＩＤ（商標登録）；ＰＲＯＬＥＵＫＩＮ（商標登録）ｒＩＬ－２；ＬＵＲＴＯＴＥＣＡＮ（商標登録）等のトポイソメラーゼ１阻害剤；ＡＢＡＲＥＬＩＸ（商標登録）ｒｍＲＨ；（ｉｘ）ベバシズマブ（ＡＶＡＳＴＩＮ（商標登録）、ジェネンテック社）等の血管新生阻害剤；並びに（ｘ）上記のいずれかの薬剤的に許容できる塩、酸および誘導体も含まれる。他の血管新生阻害剤には、ＭＭＰ－２（マトリックスメタロプロテアーゼ２）阻害剤、ＭＭＰ－９（マトリックスメタロプロテアーゼ９）阻害剤、ＣＯＸ－ＩＩ（シクロオキシゲナーゼＩＩ）阻害剤、およびＶＥＧＦ受容体型チロシンキナーゼ阻害剤が含まれる。本化合物／組成物との併用で使用され得る有用なマトリックスメタロプロテアーゼ阻害剤の例としては、国際公開第９６/３３１７２号、国際公開第９６/２７５８３号、欧州特許第８１８４４２号、欧州特許第１００４５７８号、国際公開第９８/０７６９７号、国際公開第９８/０３５１６号、国際公開第９８/３４９１８号、国際公開第９８/３４９１５号、国際公開第９８/３３７６８号、国際公開第９８/３０５６６号、欧州特許第６０６号,０４６、欧州特許第９３１号,７８８、国際公開第９０/０５７１９号、国際公開第９９/５２９１０号、国際公開第９９/５２８８９号、国際公開第９９/２９６６７号、国際公開第９９/０７６７５号、欧州特許第９４５８６４号、米国特許第５，８６３，９４９号、米国特許第５，８６１，５１０号、および欧州特許第７８０号,３８６に記載され、これら全ての全体が参照により本明細書に組み込まれる。ＶＥＧＦ受容体型チロシンキナーゼ阻害剤の例としては、４－（４－ブロモ－２－フルオロアニリノ）－６－メトキシ－７－（１－メチルピペリジン－４－イルメトキシ）キナゾリン（ＺＤ６４７４；国際公開第０１／３２６５１号中の実施例２）、４－（４－フルオロ－２－メチルインドール－５－イルオキシ）－６－メトキシ－７－（３－ピロリジン－１－イルプロポキシ）－キナゾリン（ＡＺＤ２１７１；国際公開第００／４７２１２号中の実施例２４０）、バタラニブ（ＰＴＫ７８７；国際公開第９８／３５９８５号）およびＳＵ１１２４８（スニチニブ；国際公開第０１／６０８１４号）、並びにＰＣＴ国際公開第９７／２２５９６号、ＰＣＴ国際公開第９７／３００３５号、ＰＣＴ国際公開第９７／３２８５６号、およびＰＣＴ国際公開第９８／１３３５４号）に開示される化合物が挙げられる。

【０１１７】

化学療法剤の他の例としては、ＰＩ３Ｋ（ホスホイノシチド３キナーゼ）の阻害剤、例えば、Yaguchi et al (2006) Jour. of the Nat. Cancer Inst. 98(8):545-556；米国特許第７，１７３，０２９号；米国特許第７，０３７，９１５号；米国特許第６，６０８，０５６号；米国特許第６，６０８，０５３号；米国特許第６，８３８，４５７号；米国特許第６，７７０，６４１号；米国特許第６，６５３，３２０号；米国特許第６，４０３，５８８号；国際公開第２００６／０４６０３１号；国際公開第２００６／０４６０３５号；国際公開第２００６／０４６０４０号；国際公開第２００７／０４２８０６号；国際公開第２００７／０４２８１０号；国際公開第２００４／０１７９５０号；米国特許出願公開第２００４／０９２５６１号；国際公開第２００４／００７４９１号；国際公開第２００４／００６９１６号；国際公開第２００３／０３７８８６号；米国特許出願公開第２００３／１４９０７４号；国際公開第２００３／０３５６１８号；国際公開第２００３／０３４９９７号；米国特許出願公開第２００３／１５８２１２号；欧州特許第１４１７９７６号；米国特許出願公開第２００４／０５３９４６号；日本特許第２００１２４７４７７号；日本特許第０８１７５９９０号；日本特許第０８１７６０７０号；米国特許第６，７０３，４１４号；および国際公開第９７／１５６５８号等で報告されているものが挙げられ、これら文献全ての全体が参照により本明細書に組み込まれる。そのようなＰＩ３Ｋ阻害剤の具体例としては、ＳＦ－１１２６（ＰＩ３Ｋ阻害剤、セマフォー・ファーマスーティカルズ社（Semafore Pharmaceuticals））、ＢＥＺ－２３５（ＰＩ３Ｋ阻害剤、ノバルティス社）、ＸＬ－１４７（ＰＩ３Ｋ阻害剤、エクセリクシス社（Exelixis、Inc.））が挙げられる。

【０１１８】

本明細書で使用される場合、「ＣＤ２０」または「ＣＤ２０抗原」という用語は、天然に発現される、またはＣＤ２０遺伝子を形質移入した細胞等で発現される、ＣＤ２０のポリペプチド並びにあらゆる変異体、アイソフォームおよび種相同体（species homolog）を意味する。ヒトＣＤ２０は、ＭＳ４Ａ１（膜貫通４領域、サブファミリーＡ、メンバー１）としても知られている。当該技術分野で認知される、ＣＤ２０のさらなる同義語には、ＣＤ２０抗原、ＣＤ２０受容体、Ｂ－リンパ球表面抗原Ｂ１、Ｂ１、Ｂｐ３５、ＬＥＵ－１６、ＭＧＣ３９６９、ＭＳ４Ａ２およびＳ７が含まれる。２つの転写変異体が、ヒトＣＤ２０について説明されている。変異体１はより長い転写変異体を表わし、ＧｅｎＢａｎｋ　ＩＤ（ＧＩ）６８３４８７２０に一致する。変異体３は、変異体１と比較すると５’ＵＴＲの一部が欠如しており、ＧｅｎＢａｎｋ　ＩＤ（ＧＩ）６８３４８７２１に一致している。変異体１および３は同じタンパク質をコードしている。ヒトＣＤ２０の主要な形態は、ＧｅｎＢａｎｋタンパク質ＩＤ２３１１０９８９に記載されるタンパク質の２９７個のアミノ酸を含んでいる。

【０１１９】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合することができるタンパク質決定基を意味する。通常、エピトープは、アミノ酸または糖側鎖等の、化学的に活性な表面分子集団から成り、通常は特異的な三次元的構造特性および特異的な電荷特性を有している。

【０１２０】

「ラフト」という用語は、細胞の原形質膜の外側に位置する、スフィンゴ脂質およびコレステロールに富む細胞膜マイクロドメインを意味する。該ドメインへのあるタンパク質の結合能は、そのタンパク質の機能に影響を与え得る。例えば、本発明の抗体および／またはその断片が結合した後に、ＣＤ２０分子が脂質ラフトへ移行することにより、原形質膜に高密度のＣＤ２０抗原－抗体複合体がつくり出される。そのような高密度のＣＤ２０抗原－抗体複合体により、ＣＤＣ中に補体系を効率的に活性化することが可能となり得る。

【０１２１】

本明細書で使用される場合、「抗体」または断片等には、限定されないが、重鎖もしくは軽鎖の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）またはそのリガンド結合部位、重鎖もしくは軽鎖の可変領域、重鎖もしくは軽鎖の定常領域、フレームワーク領域、またはそ

のあらゆる部分、あるいは抗原または抗原受容体または結合タンパク質の少なくとも一部分等の、本発明のＣＤ２０に対する抗体に組み込まれ得る免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む分子を含むいずれのタンパク質またはペプチドも包含される。そのような抗体は、特異的リガンドにさらに作用する場合があり、例えば、限定されないが、そのような抗体はｉｎ　ｖｉｔｒｏ、ｉｎ　ｓｉｔｕ、ｉｎ　ｖｉｖｏおよびｅｘ　ｖｉｖｏにおいて、少なくとも１つの抗原活性もしくは抗原結合、または抗原受容体活性もしくは抗原受容体結合を、調節、減少、増加、拮抗、アゴナイズ、緩和（mitigate）、軽減（alleviate）、遮断、阻害、抑制および／または妨害する。非制限的な例として、特定部位または変異体が、少なくとも１つの抗原分子、またはその特定部位、変異体もしくは領域に結合し得る、種々のＣＤ２０特異的抗体が開示される。また、好適な抗原特異的抗体、特定部位、または変異体は、少なくとも１つの活性または機能、例えば、限定されないが、ＲＮＡ、ＤＮＡまたはタンパク質合成、放出、受容体シグナリング、膜結合、結合活性、タンパク質産生および／または合成にも、場合によっては影響し得る。

【０１２２】

抗体はヘテロ四量体の糖タンパク質であり、２つの同一な軽鎖（ＬＣ）および２つの同一な重鎖（ＨＣ）から成る。典型的には、各軽鎖は１つの共有結合性のジスルフィド結合により重鎖に結合しているが、ジスルフィド結合の数は異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。また、それぞれの重鎖および軽鎖は、一定間隔の鎖内ジスルフィド架橋を有する。各重鎖は、一端に可変領域（VH）を有し、それにいくつかの定常領域が続いている。各軽鎖は、可変領域（ＶＬ）を一端に、定常領域をもう一端に有し；軽鎖の定常領域は重鎖の第一の定常領域と一緒に並んでおり、軽鎖の可変領域は重鎖の可変領域と一緒に並んでいる。いかなる脊椎動物種の抗体の軽鎖も、それらの定常領域のアミノ酸配列に基づいて、２つの明らかに異なる型、すなわちκおよびλのうち１つに分類され得る。免疫グロブリンは、重鎖定常領域のアミノ酸配列に基づいて、５つの主要なクラス、つまりＩｇＡ、ＩｇＤ、ＩｇＥ、ＩｇＧおよびＩｇＭに分類され得る。ＩｇＡおよびＩｇＧはさらに、アイソタイプＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３およびＩｇＧ４に亜分類される。

【０１２３】

抗体断片には、限定されないが、重鎖もしくは軽鎖の少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）またはリガンド結合部位、重鎖もしくは軽鎖の可変領域、重鎖もしくは軽鎖の定常領域、フレームワーク領域、またはそのいかなる部分、あるいは抗原または抗原受容体または結合タンパク質の少なくとも一部分等の、本発明のＣＤ２０に対する抗体に組み込まれ得る免疫グロブリン分子の少なくとも一部分を含む分子を含むいずれのタンパク質またはペプチドも包含される。

【０１２４】

「可変」という用語は、可変領域のある部分が、抗体間の配列において広範に異なっている事実を意味し、それぞれの特定の抗体のその特定の抗原に対する結合および特異性において用いられる。しかし、可変性は抗体の可変領域全体に均等に分布しているわけではない。可変性は、軽鎖および重鎖の可変領域の両方に存在する、相補性決定領域（ＣＤＲ）または超可変領域と呼ばれる３つのセグメントに集中している。可変領域でより高度に保存される領域は、フレームワーク（ＦＲ）と呼ばれる。未変性の重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、４つのＦＲ領域を含み、該ＦＲ領域は主としてβシート立体配置を採り、βシート構造に連結するループを形成し、場合によってはβシート構造の部分を形成する３つのＣＤＲが連結している。各鎖のＣＤＲはＦＲ領域のすぐ傍にまとまっており、他の鎖のＣＤＲと一緒に、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照）。定常領域は抗体の抗原への結合に直接的には関与しないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与等、種々のエフェクター機能を示す。

【０１２５】

また、「抗体」という用語には、その消化断片、特定の部分および変異体が包含され、

抗体模倣体、つまり、抗体またはその特定の断片もしくは部分の構造および／または機能を模倣する抗体の一部分も含まれ、一本鎖抗体およびその断片も含まれる。機能的断片には、ＣＤ２０等の哺乳類の抗原に対し、単独でまたは他の抗原、例えば、ヒト上皮増殖因子受容体（ＨＥＲ１）、ＩｇＥ、血管内皮増殖因子、ＨＥＲ二量化阻害剤、Ｂｃｌ－２ファミリータンパク質、ＭＥＴ、ＩＬ－１３、ＩＦＮα、ＥＧＦＬ７、ＣＤ４０、ＤＲ４およびＤＲ５、ＰＩ３キナーゼ、リンホトキシンα、β７インテグリン、アミロイドβ、ＣＲＩｇ、ＴＮＦ、補体（Ｃ５）、ＣＢＬ、ＣＤ１４７、ＩＬ－８、ｇｐ１２０、ＶＬＡ－４、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０Ｌ、Ｉｄ、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ２、ＥＧＦＲ、ＴＧＦ－β、ＴＮＦ－α、Ｅ－セレクチン、第ＶＩＩ因子（ＦａｃｔＶＩＩ）、ＴＮＦ、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、Ｆ　ｇｐ、ＣＤ１１／１８、ＣＤ１４、ＩＣＡＭ－３、ＣＤ８０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４、ＣＤ２３、β２－インテグリン、α４β７、ＣＤ５２、ＨＬＡ　ＤＲ、ＣＤ２２、ＣＤ６４（ＦｃＲ）、ＴＣＲαβ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＨｅｐＢ、ＣＡ１２５、ＥｐＣＡＭ、ｇｐ１２０、ＣＭＶ、ｇｐＩＩｂＩＩＩａ、ＩｇＥ、ＩＬ５、ＩＬ－４、ＣＤ２５、ＣＤ３、ＣＤ３３、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ３６、ＣＤ３７、ＣＤ４４、ＣＤ５５、ＣＤ５９、ＣＤ７０、ＣＤ７９、ＣＤ８０、ＣＤ１０３、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１３８、ＣＤ１５２、ＣＤ３０、ＨＬＡ、ＶＮＲインテグリン、ＣＤ２５、ＩＬ－２３並びにＩＬ－１２等との組み合わせで、結合する抗原結合部位断片が含まれる。例えば、抗原またはその一部に結合できる抗体断片には、限定されないが、Ｆａｂ（例えば、パパイン分解による）、Ｆａｂ’（例えば、ペプシン消化および部分的還元による）およびＦ（ａｂ’）２（例えば、ペプシン消化による）、ｆａｃｂ（例えば、プラスミン消化による）、ｐＦｃ’（例えば、ペプシンまたはプラスミン消化による）、Ｆｄ（例えば、ペプシン消化、部分的還元および再凝集による）、ＦｖまたはｓｃＦｖ（例えば、分子生物学的技術による）断片が含まれ、本発明に包含される（例えば、Colligan、Immunologyを参照）。

【０１２６】

そのような断片は、該技術分野において周知のおよび／または本明細書に記載の酵素的切断、合成技術または組換え技術によって生成され得る。また、抗体は、1つまたは複数の終止コドンが天然の終結部位の上流に導入されている抗体遺伝子を用いて、種々の切断型で生成され得る。例えば、Ｆ（ａｂ’）２の重鎖部分をコードする組み合わせ遺伝子は、重鎖のＣＨ１領域および／またはヒンジ領域をコードするＤＮＡ配列を含むように設計され得る。抗体の様々な部分は、従来技術により化学的に結合され得、または、遺伝子工学技術を用いて隣接するタンパク質として調製され得る。

【０１２７】

「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体とは、その抗体が結合するＣＤ２０等の抗原の生物活性を阻害するまたは減少させる抗体である。好ましい遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的にまたは完全に阻害する。望ましくは、生物活性は、１０％、２０％、３０％、５０％、７０％、８０％、９０％、９５％、または１００％までも、減少される。

【０１２８】

「アゴニスト抗体」とは、本明細書で使用される場合、目的の参照ポリペプチドの機能活性の少なくとも１つを模倣する抗体である。

【０１２９】

「抗イディオタイプ（抗Ｉｄ）抗体」とは、抗体の抗原結合部位と通常は結合する特有の決定基を認識する抗体である。Ｉｄ抗体は、抗Ｉｄが調製されるｍＡｂのソースと同じ種および遺伝子型の動物（例えば、マウス株）を、免疫することにより調製され得る。免疫化動物は、これらのイディオタイプ決定基に対する抗体（抗イディオタイプ抗体）を産生することにより、免疫化する抗体のイディオタイプ決定基を認識し、応答するだろう。例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第４，６９９，８８０号を参照されたい。抗Ｉｄ抗体は、「免疫原」としても使用され、さらに別の動物において免疫応答を誘導し、いわゆる抗－抗Ｉｄ抗体をさせることができる。抗－抗Ｉｄは、抗Ｉｄ

を誘導した元のｍＡｂと抗原決定基が同一であり得る。従って、あるｍＡｂのイディオタイプ決定基に対する抗体を用いることにより、同一の特異性を有する抗体を発現する他のクローンを特定することが可能となる。

【０１３０】

「単離された」抗体とは、その天然の環境から分離および／または回収された抗体である。その天然の環境の不純物成分は、その抗体の診断または治療での使用を妨げる物質であり、酵素、ホルモン、および他のタンパク質性または非タンパク質性溶質を誘導し得る。好ましい態様では、抗体は、（１）例えば、ローリー法により測定された場合には、抗体の９５重量％超まで、最も好ましくは９９重量％超まで、（２）スピニングカップシーケネーター（spinning cup sequenator）の使用によってＮ末端または内部アミノ酸配列の少なくとも１５残基を得るために十分な程度まで、あるいは（３）クマシー・ブルー、または、好ましくは銀染色を用いる、還元または非還元条件下での、ＳＤＳ－ＰＡＧＥ（ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動）により均一性を示すまで、精製されるであろう。抗体の天然の環境の少なくとも１つの成分は存在しないと予期されるため、単離抗体には組換え体細胞内にあるｉｎ　ｓｉｔｕＣＤ２０抗体が含まれる。しかし通常は、単離抗体は、少なくとも１つの精製工程により調製されるだろう。

【０１３１】

「リツキシマブ」または「ＲＩＴＵＸＡＮ（商標登録）」という用語は、米国特許第５，７３６，１３７号（Anderson et al.）では「Ｃ２Ｂ８」と記載される、市販の抗ＣＤ２０キメラ抗体を意味する。「２Ｆ２」または「オファツムマブ」という用語は、国際公開第２００４／０３５６０７号（Teeling et al.（2004））において記載される、完全ヒト抗ＣＤ２０抗体を意味する。「ＧＡ１０１」または「アフツズマブ」という用語は、国際公開第２００５／０４４８９５９号（Umana、米国特許第５，６３９，６４１号（2005））に記載される、重鎖Ｂ－ＨＨ６および軽鎖Ｂ－ＫＶ１から成る、ヒト化および糖改変された抗ＣＤ２０抗体を意味する。「Ｂ１」という用語は、マウス抗ＣＤ２０抗体、トシツモマブを意味し、Ｂｅｘｘａｒ（商標登録）の未標識抗体成分に相当する。

【０１３２】

本明細書で使用される場合、「ＩＩＩ型」抗体という用語には、ＣＤ２０、そのエピトープおよび／またはそのアイソフォームに結合し、ＩＩ型抗体と同様に、架橋剤なしでアポトーシスを実質的に誘導することができ、Ｉ型抗体と同様に、ＣＤ２０を脂質ラフトに再分布し、補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を実質的に誘導することができるインタクトな抗体またはその断片が含まれる。

【０１３３】

本明細書で使用される場合、「設計された抗体（engineered antibody）」または「改変抗体」という用語には、重要なヒトフレームワークおよび定常領域（ＣＬ、ＣＨ領域（例えば、ＣＨ１、ＣＨ２、ＣＨ３）、およびヒンジ）、並びに抗ＣＤ２０抗体またはその断片等の抗原結合抗体由来のＣＤＲを有する抗体が含まれる。完全ヒトフレームワークは、ヒト生殖細胞の配列および体細胞突然変異を有する配列に相当するフレームワークを含む。ＣＤＲは、あらゆる抗体フレームワークのコンテキスト（context）の内側または外側において、抗原と会合または結合する1つまたは複数のＣＤＲに由来し得る。例えば、ＣＤ２０を対象とする本発明のヒト型に設計された抗体（human engineered antibody）のＣＤＲは、マウス抗体フレームワークのコンテクスト内の抗原に結合するＣＤＲに由来する場合があり、その後ヒトフレームワークのコンテキスト内の抗原に結合するように改変される。ヒト型に設計された抗体（human engineered antibody）はしばしば、ヒトにおいて実質的に非免疫原性である。

【０１３４】

同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジー等）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター等）および他の哺乳類を指定した抗体は、このような種、亜属、属、亜科、および科に特異的な抗体を指定する。さらに、キメラ抗体は上記のいかなる組み合わせをも含み得る。このような変化または変異は、所望により且つ好ましくは、非

改変抗体に比べて、ヒトまたは他の種における免疫原性を保持または低下させる。ヒト型に設計された抗体（human engineered antibody）は、キメラ抗体またはヒト化抗体と異なる。

【０１３５】

設計された抗体（engineered antibody）は、機能的に再編成されたヒトまたはヒト改変免疫グロブリン（例えば、重鎖および／または軽鎖）遺伝子を発現できる非ヒトの動物または原核もしくは真核細胞により産生され得る。さらに、設計された抗体（engineered antibody）が一本鎖抗体である場合、該抗体は未変性のヒトまたは非ヒト抗体で見出されるリンカーペプチドを含み得る。例えば、Ｆｖは、重鎖の可変領域と軽鎖の可変領域を連結する、２～約８のグリシンまたは他のアミノ酸残基等のリンカーペプチドを含み得る。そのようなリンカーペプチドは、ヒト由来であると考えられている。

【０１３６】

ＣＤ２０および非ＣＤ２０抗原等の少なくとも２つの異なる抗原に対する結合特異性を有する、モノクローナル抗体、好ましくは、ヒト抗体、ヒト型に設計された抗体（human engineered antibody）、再表面化された抗体またはヒト化抗体である、二重特異性抗体、異種特異的抗体、ヘテロ複合体抗体または類似抗体も使用され得る。この場合、一方の結合特異性は、少なくとも１つの抗原タンパク質に対するものであり、もう一方は別の抗原タンパク質に対するものである。二重特異性抗体を作成する方法は、該技術分野において周知である。従来、二重特異性抗体の組換え体生成は、２つの免疫グロブリン重鎖－軽鎖対の同時発現に基づくものであり、ここで、２つの重鎖は異なる特異性を有する（Milstein and Cuello,Nature 305:537 (1983)）。免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の任意組み合わせにより、これらのハイブリドーマ（クアドローマ）は、約１０の異なる抗体分子からなる可能な混合物を生成し、このうち１つだけが正しい二重特異性構造を有する。構造が正しい分子の精製は、アフィニティークロマトグラフィーによる工程または本明細書に記載の別の方法により通常は行われる。同様の手法が、例えば、国際公開第９３／０８８２９号、米国特許第６，２１０，６６８号、同第６，１９３，９６７号、同第６，１３２，９９２号、同第６，１０６，８３３号、同第６，０６０，２８５号、同第６，０３７，４５３号、同第６，０１０，９０２号、同第５，９８９，５３０号、同第５，９５９，０８４号、同第５，９５９，０８３号、同第５，９３２，４４８号、同第５，８３３，９８５号、同第５，８２１，３３３号、同第５，８０７，７０６号、同第５，６４３，７５９号、同第５，６０１，８１９号、同第５，５８２，９９６号、同第５，４９６，５４９号、同第４，６７６，９８０号、国際公開第９１／００３６０号、国際公開第９２／００３７３号、欧州特許第０３０８９号、Traunecker et al.,EMBO J. 10:3655 (1991)、Suresh et al.,Methods in Enzymology 121:210 (1986)、米国特許第２００９０２５８０２６号、米国特許第２００６０１４０９４６号および米国特許第２００７０２９８０４０号に開示されており、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１３７】

抗体「エフェクター機能」とは、抗体のＦｃ領域（未変性配列Ｆｃ領域またはアミノ酸配列変異体Ｆｃ領域）に起因する生物活性を意味し、抗体アイソタイプによって異なる。抗体エフェクター機能の例としては、Ｃ１ｑ結合および補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；ファゴサイトーシス；細胞表面受容体（例えばＢ細胞受容体）の下流制御；並びにＢ細胞活性化が挙げられる。

【０１３８】

「ヒト効果細胞」とは、1つまたは複数のＦｃＲを発現し、エフェクター機能を果たす白血球である。ある態様では、該細胞は少なくともＦｃｙＲＩＩＩを発現し、ＡＤＣＣエフェクター機能を果たす。ＡＤＣＣを仲介するヒト白血球の例としては、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、単球、細胞傷害性Ｔ細胞および好中球が挙げられる。エフェクター細胞は、未変性のソース、例えば血液から単離され得る。

【０１３９】

抗ＣＤ２０抗体

【０１４０】
出願者の発見に基づき、特に、本発明の抗ＣＤ２０抗体およびその断片、複合体、組成物および方法は、突然変異体抗体等であり得る。抗ＣＤ２０抗体は、抗ＣＤ２０抗体のアミノ酸残基の１つまたはそれ以上が変化している、抗ＣＤ２０抗体のアミノ酸配列変異体等の「設計された抗体（engineered antibody）」または改変抗体であり得る。抗ＣＤ２０抗体のアミノ酸配列に対する改変には、その抗原に対する抗体もしくは断片の親和性もしくは結合活性を向上させるための、ポリペプチドおよび／もしくはポリヌクレオチド配列に対する改変、並びに／または、本明細書で特に明記しない限り既知のエフェクター機能を向上させるための抗体のＦｃ部分に対する改変が含まれる。改変は、いずれかの既知の抗ＣＤ２０抗体または本明細書に記載のものと同一の抗ＣＤ２０抗体に対してなされ得る。そのような改変抗体は、参照抗ＣＤ２０抗体と１００％未満の配列同一性または類似性を有する必要がある。好ましい態様では、改変抗体は、抗ＣＤ２０抗体の重鎖または軽鎖の可変領域のいずれかのアミノ酸配列と、少なくとも２０％、２５％、３５％、４５％、５５％、６５％、または７５％の、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％のアミノ酸配列同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有するだろう。好ましい態様では、改変抗体は、抗ＣＤ２０抗体の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３のアミノ酸配列と少なくとも２５％、３５％、４５％、５５％、６５％、または７５％の、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％のアミノ酸配列同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有するだろう。好ましい態様では、改変抗体はヒトＣＤ２０結合能を維持するだろう。ある態様では、本発明の抗ＣＤ２０抗体は、配列番号４７、３４、３５および３６のアミノ酸配列に対し、約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上同一である重鎖を含む。ある態様では、本発明の抗ＣＤ２０抗体は、配列番号４６、３２または３３のアミノ酸配列に対し、約１０％、１５％、２０％、２５％、３０％、３５％、４０％、４５％、５０％、５５％、６０％、６５％、７０％、７５％、８０％、８５％、９０％、９５％、９６％、９７％、９８％、９９％またはそれ以上同一である軽鎖を含む。好ましい態様では、改変抗体は、抗ＣＤ２０抗体の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３のアミノ酸配列と少なくとも２５％、３５％、４５％、５５％、６５％、または７５％の、より好ましくは少なくとも８０％、より好ましくは少なくとも８５％、より好ましくは少なくとも９０％、最も好ましくは少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％のアミノ酸配列同一性または類似性を有するアミノ酸配列を有するだろう。

【０１４１】
本発明のいくつかの実施形態では、抗ＣＤ２０抗体は、抗ＣＤ２０抗体のアミノ酸残基の１つまたはそれ以上が改変されている、抗ＣＤ２０抗体のアミノ酸配列変異体等の、「設計された抗体（engineered antibody）」または改変抗体であり得る。抗ＣＤ２０抗体のアミノ酸配列に対する改変には、抗体もしくは断片のその抗原に対する親和性もしくは結合活性を向上させるためのポリペプチドおよび／もしくはポリヌクレオチド配列に対する改変、並びに／または、本明細書に特に明記しない限り既知のエフェクター機能を向上させるための、抗体のＦｃ部分への改変が含まれる。改変は、いずれかの既知の抗ＣＤ２０抗体または本明細書に記載のものと同一の抗ＣＤ２０抗体に対してなされ得る。そのような改変抗体は、参照抗ＣＤ２０抗体と１００％未満の配列同一性または類似性を有する必要がある。好ましい態様では、改変抗体は、抗ＣＤ２０抗体の重鎖または軽鎖の可変領域のいずれかのアミノ酸配列と比較した場合に、少なくとも１～５、１～３、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５または５０この保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有するだろう。好ましい態様では、改変抗体は、抗ＣＤ２０抗体の重鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３

のアミノ酸配列と比較した場合に、少なくとも１～２０、１～１５、１～１０、１～５、１～３、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４，１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１個の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有するだろう。好ましい態様では、改変抗体はヒトＣＤ２０結合能を維持するだろう。ある態様では、本発明の抗ＣＤ２０抗体は、配列番号４７、３４、３５および３６のアミノ酸配列のアミノ酸配列と比較した場合に、約１～２０、１～１５、１～１０、１～５、１～３、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５または５０個の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有する重鎖を含む。ある態様では、本発明の抗ＣＤ２０抗体は、配列番号４６、３２または３３のアミノ酸配列のアミノ酸配列と比較した場合に、約１～２０、１～１５、１～１０、１～５、１～３、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０、２１、２２、２３、２４、２５、２６、２７、２８、２９、３０、３５、４０、４５または５０個の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有する重鎖を含む。好ましい態様では、改変抗体は、抗ＣＤ２０抗体の軽鎖ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、またはＣＤＲ３のアミノ酸配列と比較した場合に、少なくとも１～２０、１～１５、１～１０、１～５、１～３、２０、１９、１８、１７、１６、１５、１４，１３、１２、１１、１０、９、８、７、６、５、４、３、２または１個の保存的アミノ酸置換を有するアミノ酸配列を有するだろう。

【０１４２】

抗ＣＤ２０抗体、ＣＤ２０－７およびＣＤ２０－６を産生するハイブリドーマは、ＡＴＣＣ受託番号ＰＴＡ－１０４８７およびＰＴＡ－１０４８６で寄託されている。

【０１４３】

「同一性（％）」とは、該技術分野で知られているように、２つのポリヌクレオチド間または２つのポリペプチド間の関連性の尺度であり、それらの配列を比較することにより測定される。配列に関する同一性または類似性は、本明細書では、必要ならば、最大の配列一致率を達成するために、配列を整列させ、ギャップを導入した後、抗ＣＤ２０抗体の残基に対して同一（すなわち、同一の残基）であるまたは類似（すなわち、共通の側鎖性質に基づいた同一の群からのアミノ酸残基、下記参照）している、候補配列におけるアミノ酸残基の割合として定義される。可変領域の外側の抗体配列への、いかなるＮ末端の、Ｃ末端の、または内部の伸張、欠失、または挿入も、配列同一性または類似性に影響しないと解釈されるべきである。一般的に、比較される２つの配列は、配列間で最大相関が得られるように整列される。整列した２つの配列が分析され、２つの配列間でアミノ酸またはヌクレオチドが正確に一致している位置の数が決定され、アライメントの全長で除算され、１００を乗算されて、同一性（％）の数字が得られる。この同一性（％）の数字は、比較される配列の全長に渡り測定され得、これは特に長さが同一または非常に類似しており非常に相同的な配列に対して特に好適であり、あるいは、より短い既定の長さに渡り測定され得、これは長さが異なるまたは低いレベルの相同性を有する配列に対してより好適である。

【０１４４】

例えば、配列はＵｎｉｘ下でソフトウェアｃｌｕｓｔａｌＷで整列され得、「．ａｌｎ」拡張子を有するファイルが得られ、続いてこのファイルは．ａｌｎファイルを開くＢｉｏｅｄｉｔプログラム（Hall,T. A. 1999,BioEdit：ウインドウズ９５／９８／ＮＴのためのユーザーフレンドリーな生物学的配列アライメント編集および分析プログラム．Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98）にインポートされ得る。Ｂｉｏｅｄｉｔのウインドウにおいて、個々の配列（１度に２つ）を選択し、それらを整列させることができる。この方法により、配列全体の比較が可能となる。

【０１４５】

２つ以上の配列の同一性を比較するための方法は当技術分野で周知である。従って、例えば、Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｓｅｑｕｅｎｃｅ　ＡｎａｌｙｓｉｓＰａｃｋａｇｅ，バー

ジョン９．１（Devereux J. et al.,Nucleic Acids Res.,12:387-395,1984、ジェネティクス・コンピュータ・グループ社（Genetics Computer Group）、米国ウィスコンシン州マディソンから入手可能）におけるプログラムが利用可能である。２つの配列間の同一性（％）の決定は、数学アルゴリズムを用いて達成され得る。例えば、ＢＥＳＴＦＩＴおよびＧＡＰプログラムは、２つのポリヌクレオチド間の同一性（％）および２つのポリペプチド配列間の同一性（％）を決定するために使用され得る。ＢＥＳＴＦＩＴは、SmithおよびWatermanの「局所的相同性」アルゴリズム（Advances in Applied Mathematics,2:482-489,1981）を用いており、２つの配列間で類似性が最も高い単一領域を発見する。ＢＥＳＴＦＩＴは、長さが似ていない２つのポリヌクレオチドまたは２つのポリペプチド配列を比較するのにより適しており、該プログラムは、短い配列はより長い配列の一部を表すと仮定している。比較において、ＧＡＰは２つの配列を整列させ、NeddlemanおよびWunschのアルゴリズム（J. Mol. Biol.,48:443-354,1970）に従って、「最大類似性」を発見する。ＧＡＰは、おおよそ同じ長さの配列を比較するのにより適しており、全長に渡る配列比較が期待される。各プログラムで用いられるパラメータの「ギャップ加重（Gap Weight）」および「長さ加重（Length Weight）」は、ポリヌクレオチドに対しては、それぞれ５０および３で、ポリペプチドに対しては、それぞれ１２および４であることが好ましい。同一性（％）および類似性（％）は、比較対象の２つの配列が最適に整列した場合に決定されるのが好ましい。

【０１４６】

配列間の同一性および／または類似性を決定するための他のプログラム、例えばＢＬＡＳＴプログラム群（Karlin & Altschul,1990,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,87:2264-2268,modified as in Karlin & Altschul,1993,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,90:5873-5877、国立バイオテクノロジー情報センター（ＮＣＢ）、米国メリーランド州ベテスダから入手可能であり、www.ncbi.nlm.nih.govのＮＣＢＩのホームページを通じてアクセス可能である）もまた、該技術分野において周知である。これらのプログラムは、２つの配列を比較するために利用される数学アルゴリズムの好ましい、非制限的な例を例示している。このようなアルゴリズムは、Altschul et al.,1990,J. Mol. Biol.,215:403-410に記載のＮＢＬＡＳＴおよびＸＢＬＡＳＴプログラムの中に組み込まれている。ＢＬＡＳＴヌクレオチド検索は、ＮＢＬＡＳＴプログラム（スコア＝１００、ワード長＝１２）を用いて実行でき、本発明の任意の抗ＣＤ２０抗体の全てまたは一部をコードする核酸分子に相同的なヌクレオチド配列が得られる。ＢＬＡＳＴタンパク質検索は、ＸＢＬＡＳＴプログラム（スコア＝５０、ワード長＝３）で実行することができ、本発明のタンパク質分子に相同的なアミノ酸配列が得られる。比較する目的でギャップを挿入したアライメントを得るために、Altschul et al.,1997、Nucleic Acids Res.,25:3389-3402に記載されているような、Ｇａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴを利用することができる。あるいは、ＰＳＩ－Ｂｌａｓｔを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を実行することができる（同著）。ＢＬＡＳＴ、Ｇａｐｐｅｄ　ＢＬＡＳＴ、およびＰＳＩ－Ｂｌａｓｔプログラムを利用する場合、各プログラム（例えば、ＸＢＬＡＳＴおよびＮＢＬＡＳＴ）のデフォルトのパラメータを使用することができる。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい。配列を比較するために利用される数学アルゴリズムの別の好ましい、非制限的な例は、Myers and Miller,1988,CABIOS 4:11-17に記載のアルゴリズムである。このようなアルゴリズムは、ＧＣＧ配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるＡＬＩＧＮプログラム（バージョン２．０）に組み込まれている。アミノ酸配列を比較するためにＡＬＩＧＮプログラムを利用する場合、PAM120加重残基表（weight residue table）、ギャップ長ペナルティ＝１２、ギャップペネルティ＝４を用いることができる。

【０１４７】

配列間の同一性および／または類似性を決定するためのプログラムの、該技術分野において周知な、別の非制限的な例としては、ＦＡＳＴＡ（Pearson W. R. and Lipman D. J.,Proc. Nat. Acad. Sci. USA,85:2444-2448,1988, Wisconsin Sequence AnalysisPackageの一部として利用可能）が挙げられる。ＢＬＯＳＵＭ６２アミノ酸置換マトリクス（Heni

koff S. and Henikoff J. G.,Proc. Nat. Acad. Sci. USA、89:10915-10919,1992）を、ヌクレオチド配列が比較前にまずアミノ酸配列に翻訳される場合を含む、ポリペプチド配列比較に用いることが好ましい。

【０１４８】

アミノ酸配列間の同一性および／または類似性を決定するためのプログラムの、該技術分野において周知な、さらに別の非制限的な例としては、ＳｅｑＷｅｂ　Ｓｏｆｔｗａｒｅ（ＧＣＧ　Ｗｉｓｃｏｎｓｉｎ　Ｐａｃｋａｇｅに対するウェブベースのインターフェース：Ｇａｐプログラム）が挙げられ、該プログラムは、プログラムのデフォルトのアルゴリズムおよびパラメータ設定：ｂｌｏｓｕｍ６２、ギャップ加重（Gap Weight）８、長さ加重（Length Weight）２で利用される。

【０１４９】

２つの配列間の同一性（％）は、上記と同様の技術を用いて決定することができ、ギャップは考慮してもしなくてもよい。同一性（％）を計算する際、典型的には、完全な一致のみが数えられる。

【０１５０】

ＢＥＳＴＦＩＴプログラムは、本発明のポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列に対するクエリーポリヌクレオチドまたはポリペプチド配列の同一性（％）を決定するために使用でき、クエリーおよび参照配列は最適に整列され、プログラムのパラメータは初期値に設定される。

【０１５１】

改変抗体を作成するために、1つまたは複数のアミノ酸変化（例えば、置換）が、抗体の1つまたは複数の超可変領域に導入される。あるいは、または、さらに、フレームワーク領域残基の1つまたは複数の変化（例えば、置換）が、抗ＣＤ２０抗体に導入され得、これにより、抗体突然変異体の抗原に対する結合親和性が向上される。改変するフレームワーク領域残基の例としては、非共有結合的に抗原に直接結合し（Amit et al.,Science, 233:747-753 (1986)）；ＣＤＲの高次構造に相互作用／影響し（Chothia et al.,J. Mol. Biol.,196:901-917 (1987)）；および／またはＶＬとＶＨの境界に関与するフレームワーク領域残基が挙げられる。ある態様では、そのようなフレームワーク領域残基の1つまたは複数の改変により、抗体の抗原に対する結合親和性が増強される。例えば、約１～約５個のフレームワーク残基（例えば、１、２、３、４または５）が、本発明の本態様において変化し得る。場合によっては、この変化で、いずれの超可変領域残基も変化していない場合でさえ、結合親和性が増強された抗体を産むのに十分であり得る。しかし通常は、改変抗体は、超可変領域にさらなる変化を含むだろう。

【０１５２】

変化される超可変領域残基は、特に、抗ＣＤ２０抗体の抗原に対する出発結合親和性が、そのような無作為に生成された改変抗体が容易にスクリーニングできるようなものである場合、無作為に変化され得る。

【０１５３】

そのような改変抗体を作成するための１つの有用な手法は、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれている（Cunningham and Wells,Science,244:1081-1085 (1989)）。１つまたは複数の超可変領域残基は、アラニンまたはポリアラニン残基によって置換され、アミノ酸と抗原の相互作用に影響する。置換に対して機能感受性を示すこれらの超可変領域残基は、その後、さらなるまたは他の突然変異を、置換の部位で、または置換の部位に対して、導入することにより、精製される。従って、アミノ酸配列変化を導入するための場所は予め決められているが、突然変異の性質それ自体は必ずしも予め決められていない。この方法で生成されるアラニン突然変異体は、本明細書に記載の生物活性および／または該技術分野において周知の生物活性についてスクリーニングされる。

【０１５４】

そのような改変抗体を作成するための別の手法には、ファージディスプレイを用いた親和性成熟が関わる（Hawkins et al.,J. Mol. Biol.,254:889-896 (1992) and Lowman et

al.,Biochemistry,30(45):10832-10837 (1991))。簡潔に説明すると、いくつかの超可変領域部位（例えば、６～７部位）が変異され、各部位で全ての可能なアミノ酸置換が生成される。そのように作成された抗体突然変異体は、各繊維状ファージ粒子内にパッケージされたＭ１３の遺伝子ＩＩＩ産物への融合体として該繊維状ファージ粒子から一価の形で提示される。ファージにより提示された突然変異体は、続いて本明細書で開示される、および／または該技術分野において周知の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【０１５５】

抗体配列における突然変異には、置換、欠失（内部欠失を含む）、付加（融合タンパク質を生成する付加を含む）、またはアミノ酸配列の内および／または近傍におけるアミノ酸残基の保存的置換が含まれ得るが、それらの突然変異の結果は「サイレント」変化であり、該変化により機能的に同等な抗ＣＤ２０抗体または断片が生成される。保存的アミノ酸置換は、関与する残基の極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性および／または両親媒性における類似性に基づいてなされ得る。例えば、無極性（疎水性）のアミノ酸には、アラニン、ロイシン、イソロイシン、バリン、プロリン、フェニルアラニン、トリプトファン、およびメチオニンが含まれ；極性中性アミノ酸には、グリシン、セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、およびグルタミンが含まれ；正に帯電した（塩基性）アミノ酸には、アルギニン、リジン、およびヒスチジンが含まれ；負に帯電した（酸性）アミノ酸には、アスパラギン酸およびグルタミン酸が含まれる。さらに、グリシンおよびプロリンは、鎖配向に影響し得る残基である。非保存的置換には、これらのクラスのうちの１つのメンバーが別のクラスのメンバーに交換されることが伴うだろう。さらに、必要に応じて、非古典的アミノ酸または化学的なアミノ酸類似体が抗体配列中に置換または付加として導入され得る。非古典的アミノ酸には、限定されないが、一般的なアミノ酸のＤ－異性体、α－アミノイソ酪酸、４－アミノ酪酸、Ａｂｕ、２－アミノ酪酸、γ－Ａｂｕ、ε－Ａｈｘ、６－アミノヘキサン酸、Ａｉｂ、２－アミノイソ酪酸、３－アミノプロピオン酸、オルニチン、ノルロイシン、ノルバリン、ヒドロキシプロリン、サルコシン、シトルリン、システイン酸、ｔ－ブチルグリシン、ｔ－ブチルアラニン、フェニルグリシン、シクロヘキシルアラニン、β－アラニン、フルオロ－アミノ酸、β－メチルアミノ酸等のデザイナーアミノ酸（designer amino acid）、Ｃα－メチルアミノ酸、Ｎα－メチルアミノ酸、およびアミノ酸類似体が、一般に含まれる。

【０１５６】

別の態様では、改変のために選択される部位は、ファージディスプレイを用いて親和性成熟される（上記参照）。

【０１５７】

該技術分野において周知の、突然変異誘発のためのあらゆる技術が、抗体配列にアミノ酸置換を生成する目的で、つまり制限酵素認識部位を作成／削除し、さらなる操作を容易にするために、ＤＮＡ配列における個々のヌクレオチドを改変するために使用され得る。そのような技術には、限定されないが、化学的突然変異誘発、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ部位特異的突然変異誘発（Kunkel,Proc. Natl. Acad. Sci. USA、82:488 (1985); Hutchinson,C. et al.,J. Biol. Chem.,253:6551 (1978))、オリゴヌクレオチド－定方向突然変異誘発（Smith,Ann. Rev. Genet.,19:423-463 (1985); Hill et al.,Methods Enzymol.,155:558-568 (1987))、ＰＣＲをベースにした重複伸張（Ho et al.,Gene,77:51-59 (1989))、ＰＣＲをベースにしたメガプライマー突然変異誘発（Sarkar et al.,Biotechniques,8:404-407 (1990))等が含まれる。改変は、二重鎖ジデオキシＤＮＡ配列決定により確かめることができる。

【０１５８】

本発明の単離された核酸を、少なくとも１つのＣＤ２０特異的抗体またはその断片もしくは特定の変異体を生成するために使用することができ、これを用いて細胞、組織、器官または動物（哺乳類およびヒトを含む）で測定し、または効果を及ぼして、限定されないが、免疫性の障害もしくは疾患、心血管系の障害もしくは疾患、感染性で悪性、且つ／ま

たは神経性の障害もしくは疾患、あるいは他の既知のまたは特定の抗原関連疾患の少なくとも１つから選択される少なくとも１つの状態を、診断、管理、調節、治療、緩和させ、その発生の予防を助け、またはその症状を低減することができる。

【０１５９】

重要な事に、ＣＤ２０等のヒトタンパク質またはその断片に特異的なヒト型に設計された抗体（human engineered antibody）は、他の免疫原性抗原またはアイソフォーム、例えば、ＣＤ２０タンパク質および／またはその一部（合成ペプチド等の合成分子を含む）、あるいは、ＣＤ５６、ヒト上皮成長因子受容体（ＨＥＲ１）、ＩｇＥ、血管内皮増殖因子、ＨＥＲ二量化阻害剤、Ｂｃｌ－２ファミリータンパク質、ＭＥＴ、ＩＬ－１３、ＩＦＮα、ＥＧＦＬ７、ＣＤ４０、ＤＲ４およびＤＲ５、ＰＩ３キナーゼ、リンホトキシンα、β７インテグリン、アミロイドβ、ＣＲＩｇ、ＴＮＦ、補体（Ｃ５）、ＣＢＬ、ＣＤ１４７、ＩＬ－８、ｇｐ１２０、ＶＬＡ－４、ＣＤ１１ａ、ＣＤ１８、ＶＥＧＦ、ＣＤ４０Ｌ、Ｉｄ、ＩＣＡＭ－１、ＣＤ２、ＥＧＦＲ、ＴＧＦ－β、ＴＮＦ－α、Ｅ－セレクチン、ＦａｃｔＶＩＩ、ＴＮＦ、Ｈｅｒ２／ｎｅｕ、Ｆｇｐ、ＣＤ１１／１８、ＣＤ１４、ＩＣＡＭ－３、ＣＤ８０、ＣＤ４０Ｌ、ＣＤ４、ＣＤ２３、β２－インテグリン、α４β７、ＣＤ５２、ＨＬＡ　ＤＲ、ＣＤ２２、ＣＤ６４（ＦｃＲ）、ＴＣＲαβ、ＣＤ２、ＣＤ３、ＨｅｐＢ、ＣＡ１２５、ＥｐＣＡＭ、ｇｐ１２０、ＣＭＶ、ｇｐＩＩｂＩＩＩａ、ＩｇＥ、ＩＬ－５、ＩＬ－４、ＣＤ２５、ＣＤ３、ＣＤ３３、ＣＤ３０、ＣＤ１９、ＣＤ２２、ＣＤ２８、ＣＤ３６、ＣＤ３７、ＣＤ４４、ＣＤ５５、ＣＤ５９、ＣＤ７０、ＣＤ７９、ＣＤ８０、ＣＤ１０３、ＣＤ１３４、ＣＤ１３７、ＣＤ１３８、ＣＤ１５２、ＨＬＡ、ＶＮＲインテグリン、ＣＤ２５、ＩＬ－２３およびＩＬ－１２等の抗原のいずれか１つまたは組み合わせに対して設計され得る。

【０１６０】

抗体産生

【０１６１】

抗ＣＤ２０抗体等の、本発明の少なくとも１つの抗原特異的抗体は、該技術分野において周知のように、細胞株、混合細胞株、不死化細胞または不死化細胞のクローン集団によって、所望により産生され得る。例えば、Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, Inc., NY, N.Y. (1987-2001); Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2 nd Edition, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989); Colligan, et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N.Y., (1997-2001)を参照されたい。

【０１６２】

一つのアプローチにおいて、ハイブリドーマは、好適な不死化細胞株（例えば、骨髄腫細胞株、例えば、限定されないが、Ｓｐ２／０、Ｓｐ２／０－ＡＧ１４、ＮＳ０、ＮＳ１、ＮＳ２、ＡＥ－１、Ｌ．５、Ｌ２４３、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３、Ｓｐ２　ＳＡ３、Ｓｐ２　ＭＡＩ、Ｓｐ２　ＳＳ１、Ｓｐ２　ＳＡ５、Ｕ９３７、ＭＬＡ１４４、ＡＣＴＩＶ、ＭＯＬＴ４、ＤＡ－１、ＪＵＲＫＡＴ、ＷＥＨＩ、Ｋ－５６２、ＣＯＳ、ＲＡＪＩ、ＮＩＨ３Ｔ３、ＨＬ－６０、ＭＬＡ１４４、ＮＡＭＡＬＷＡ、ＮＥＵＲＯ２Ａ等、またはヘテロ骨髄腫（heteromyloma）、それらの融合産物、またはそれらに由来するあらゆる細胞もしくは融合細胞、または該技術分野において周知の他の好適なあらゆる細胞株）（例えば、www.atcc.org、www.lifetech.com.等を参照されたい）を、抗体産生細胞、例えば、限定されないが、単離またはクローン化された脾臓、末梢血、リンパ液、扁桃腺、または他の免疫もしくはＢ細胞含有細胞、またはあらゆる他の細胞と、融合することにより作成され、ここで該抗体産生細胞は、重鎖または軽鎖の定常もしくは可変またはフレームワークもしくはＣＤＲ配列を、内因性核酸または異種核酸のいずれかとして、組換え体または内因性の、ウイルスの、細菌の、藻類の、原核生物の、両生類の、昆虫の、爬虫類の、魚類の、哺乳類の、げっ歯類の、ウマの、ヒツジの（ovine）、ヤギの、ヒツジの（she

ep）、霊長類の、真核生物の、ゲノムＤＮＡ、ｃＤＮＡ、ｒＤＮＡ、ミトコンドリアＤＮＡもしくはＲＮＡ、葉緑体ＤＮＡもしくはＲＮＡ、ｈｎＲＮＡ、ｍＲＮＡ、ｔＲＮＡの、一本鎖、二本鎖もしくは三重鎖、ハイブリダイズされたもの等またはこれらのあらゆる組み合わせとして、発現する、例えば、全体が参照により本明細書に組み込まれる、Ausubel,supra,and Colligan,Immunology,supra,chapter 2を参照されたい。

【０１６３】

抗体産生細胞は、目的の抗原の免疫があるヒトまたは他の好適な動物の、末梢血から、または、好ましくは脾臓もしくはリンパ節から得ることもできる。他のいかなる好適な宿主細胞も、本発明の抗体、その特定の断片または変異体をコードする異種または内因性の核酸を発現するために使用することができる。融合細胞（ハイブリドーマ）または組換え細胞は、選択的培養条件または他の好適な既知の方法を用いて単離され、限界希釈または細胞選別、または他の既知の方法によってクローン化することができる。所望の特異性を有する抗体を産生する細胞は、好適なアッセイ（例えば、ＥＬＩＳＡ、より具体的にはＣＤ２０　ＥＬＩＳＡ）により選択することができる。

【０１６４】

ヒト抗原特異的抗体は、本明細書に記載のおよび／または該技術分野において周知のヒト抗体のレパートリーを産生できる遺伝子導入動物（例えば、マウス、ラット、ハムスター、非ヒト霊長類等）の免疫化によりさらに生成され得る。抗原特異的抗体を産生する細胞は、該動物から単離し、本明細書に記載される方法等の適切な方法を用いて不死化することができる。

【０１６５】

ＣＤ２０等のヒト抗原に結合するヒト抗体のレパートリーを産生できる遺伝子導入マウスは、既知の方法により作成できる（例えば、限定されないが、Lonbergらに対し公布された米国特許第５，７７０，４２８号、同第５，５６９，８２５号、同第５，５４５，８０６号、同第５，６２５，１２６号、同第５，６２５，８２５号、同第５，６３３，４２５号、同第５，６６１，０１６号および同第５，７８９，６５０号；Jakobovitsらによる国際公開第９８／５０４３３号、Jakobovitsらによる国際公開第９８／２４８９３号、Lonbergらによる国際公開第９８／２４８８４号、Lonbergらによる国際公開第９７／１３８５２号、Lonbergらによる国際公開第９４／２５５８５号、Kucherlapateらによる国際公開第９６／３４０９６号、Kucherlapateらによる欧州特許第０４６３１５１Ｂ１号、Kucherlapateらによる欧州特許第０７１０７１９Ａ１号、Suraniらによる米国特許第５，５４５，８０７号、Bruggemannらによる国際公開第９０／０４０３６号、Bruggemannらによる欧州特許第０４３８４７４Ｂ１号、Lonbergらによる欧州特許第０８１４２５９Ａ２号、Lonbergらによる英国特許第２２７２４４０Ａ号、Lonbergら、Nature 368:856-859 (1994)、Taylorら、Int. Immunol. 6(4)579-591 (1994)、Greenら、Nature Genetics 7:13-21 (1994)、Mendezら、Nature Genetics 15:146-156 (1997)、Taylorら、Nucleic Acids Research 20(23):6287-6295 (1992)、Tuaillonら、Proc Natl Acad Sci USA 90(8)3720-3724 (1993)、Lonbergら、Int Rev Immunol 13(1):65-93 (1995)およびFishwaldら、Nat Biotechnol 14(7):845-851 (1996)、それぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる）。一般的に、これらのマウスは、官能基が転移した、または官能基転移することができる少なくとも１つのヒト免疫グロブリン遺伝子座からのＤＮＡを含む少なくとも１つの導入遺伝子を含む。そのようなマウスにおける内因性の免疫グロブリン遺伝子座を、破壊または欠失することで、該動物が内在性遺伝子によりコードされる抗体を産生する能力を失わせることができる。

【０１６６】

類似タンパク質または断片に対して特異的に結合する抗体をスクリーニングすることは、ペプチドディスプレイライブラリー、ファージディスプレイおよび他の既知の方法を用いて好都合に達成され得る。ペプチドディスプレイ法には、所望の機能または構造を有する個々のメンバーを得るために膨大なペプチドをスクリーニングすることが含まれる。ペプチドディスプレイライブラリーの抗体スクリーニングは該技術分野において周知である

。提示されるペプチド配列は、３～５０００またはそれ以上のアミノ酸長であり、しばしば５～１００のアミノ酸長、たびたび約８～２５アミノ酸長であり得る。ペプチドライブラリーを作成するための直接的な化学合成法に加えて、いくつかの組換えＤＮＡ方法が記載されている。ある種類は、バクテリオファージまたは細胞の表面にペプチド配列を提示することを含む。各バクテリオファージまたは細胞は、特定の提示されたペプチド配列をコードするヌクレオチド配列を含む。そのような方法は、ＰＣＴ国際公開第９１／１７２７１号、同第９１／１８９８０号、同第９１／１９８１８号、および同第９３／０８２７８号に記載される。

【０１６７】

ペプチドのライブラリを作成するための他の系は、ｉｎ　ｖｉｔｒｏにおける化学合成および組換え方法（recombinant method）の両方の態様を有する。これらの系の例は、例えば、ＰＣＴ国際公開第９２／０５２５８号、同第９２／１４８４３号、および同第９６／１９２５６号に記載される。また、米国特許第５，６５８，７５４号；および同第５，６４３，７６８号も参照されたい。ペプチドディスプレイライブラリー、ベクター、およびスクリーニングのキットは、インビトロジェン社（カリフォルニア州カールズバッド）、およびケンブリッジ・アンチボディ・テクノロジー社（Cambridge Antibody Technologies）（英国、ケンブリッジシャー）のような供給業者から市販されている。これらの系の例は、例えば、Enzonに譲渡された米国特許第４，７０４，６９２号；同第４，９３９，６６６号；同第４，９４６，７７８号；同第５，２６０，２０３号；同第５，４５５，０３０号；同第５，５１８，８８９号；同第５，５３４，６２１号；同第５，６５６，７３０号；同第５，７６３，７３３号；同第５，７６７，２６０号；同第５，８５６，４５６号；Dyaxに譲渡された米国特許第５，２２３，４０９号；同第５，４０３，４８４号；同第５，５７１，６９８号；同第５，８３７，５００号；Affymaxに譲渡された米国特許第５，４２７，９０８号；同第５，５８０，７１７号；ケンブリッジ・アンチボディ・テクノロジー社（Cambridge Antibody Technologies）に譲渡された米国特許第５，８８５，７９３号；ジェネンテック社に譲渡された米国特許第５，７５０，３７３号；Xomaらに譲渡された米国特許第５，６１８，９２０号；同第５，５９５，８９８号；同第５，５７６，１９５号；同第５，６９８，４３５号；同第５，６９３，４９３号；同第５，６９８，４１７号；およびSambrook、上記、に記載されている。また、本発明のＣＤ２０抗体は、少なくとも１つの抗原特異的抗体をコードする核酸を用いて調製することができ、乳汁中に該抗体を生産するヤギ、雌ウシ、ウマ、ヒツジ、ウサギ等の遺伝子導入動物または哺乳類を提供する。そのような動物は既知の方法を用いて供給され得る。このような方法の例は、例えば、限定されないが、米国特許第５，８２７，６９０号；同第５，８４９，９９２号；同第４，８７３，３１６号；同第５，８４９，９９２号；同第５，９９４，６１６号；同第５，５６５，３６２号；同第５，３０４，４８９号等に記載される。本明細書で参照される各引用は、その全体が参照により組み込まれる。

【０１６８】

さらに、本発明の抗ＣＤ２０抗体は、少なくとも１つの抗原特異的抗体をコードする核酸を用いて調製することができ、植物の一部または該植物から培養された細胞において該抗体、特定部分または変異体を産生する遺伝子導入植物および培養植物細胞（例えば、限定されないが、タバコおよびトウモロコシ）を提供する。非制限的な例として、組換えタンパク質を発現する遺伝子導入したタバコの葉は、例えば、誘導プロモーターを用いて、大量の組換えタンパク質を生産するのに首尾よく使用される。例えば、Cramer et al.,Curr. Top. Microbol. Immunol. 240:95-118 (1999)およびその引用文献を参照されたい。また、遺伝子導入トウモロコシは、他の組換え系で産生されるタンパク質または天然源から精製されるタンパク質と同等の生物活性を有する哺乳類のタンパク質を、商業生産レベルで発現するのに用いられる。例えば、Hood et al.,Adv. Exp. Med. Biol. 464:127-147 (1999)およびその引用文献を参照されたい。抗体（一本鎖抗体（ＳｃＦｖ）等の抗体断片を含む）は、タバコの種およびジャガイモの塊茎を含む遺伝子導入植物の種から大量に生産される。例えば、Conrad et al.,Plant Mol. Biol. 38:101-109 (1998)およびその引

用文献を参照されたい。従って、本発明のＣＤ２０抗体は、遺伝子導入植物を用いて、既知の方法に従って生成される。また、例えば、Fischer et al., Biotechnol. Appl. Biochem. 30:99-108 (October、1999), Ma et al., Trends Biotechnol. 13:522-7 (1995); Ma et al., Plant Physiol. 109:341-6 (1995); Whitelam et al., Biochem. Soc. Trans. 22:940-944 (1994)；およびその引用文献を参照されたい。

【０１６９】

抗体の設計、ヒト化および再表面化

【０１７０】

非ヒトまたはヒト抗体を設計する、ヒト化するまたは再表面化するための方法も用いることができ、該技術分野において周知である。ヒト化された、再表面化されたまたは同じように設計された抗体（engineered antibody）は、非ヒト、例えば、制限されないが、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類または他の哺乳動物であるソース由来の1つまたは複数のアミノ酸残基を有し得る。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「移入」残基と称される残基によって置換され、該残基は、典型的には既知のヒト配列の「移入」可変領域、定常領域または他の領域から得られる。

【０１７１】

既知のヒトＩｇ配列は、例えば、www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi; www.ncbi.nih.gov/igblast; www.atcc.org/phage/hdb.html; www.mrc-cpe.cam.ac.uk/ALIGNMENTS.php; www.kabatdatabase.com/top.html; ftp.ncbi.nih.gov/repository/kabat; www.sciquest.com; www.abcam.com; www.antibodyresource.com/onlinecomp.html; www.public.iastate.edu/.about.pedro/research_tools.html; www.whfreeman.com/immunology/CH05/kuby05.htm; www.hhmi.org/grants/lectures/1996/vlab; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/mikeimages.html; mcb.harvard.edu/BioLinks/Immunology.html; www.immunologylink.com; pathbox.wustl.edu/.about.hcenter/index.html; www.appliedbiosystems.com; www.nal.usda.gov/awic/pubs/antibody; www.m.ehime-u.ac.jp/.about.yasuhito/Elisa.html; www.biodesign.com; www.cancerresearchuk.org; www.biotech.ufl.edu; www.isac-net.org; baserv.uci.kun.nl/.about.jraats/links1.html; www.recab.uni-hd.de/immuno.bme.nwu.edu; www.mrc-cpe.cam.ac.uk; www.ibt.unam.mx/vir/V_mice.html; http://www.bioinf.org.uk/abs; antibody.bath.ac.uk; www.unizh.ch; www.cryst.bbk.ac.uk/.about.ubcg07s; www.nimr.mrc.ac.uk/CC/ccaewg/ccaewg.html; www.path.cam.ac.uk/.about.mrc7/humanisation/TAHHP.html; www.ibt.unam.mx/vir/structure/stat_aim.html; www.biosci.missouri.edu/smithgp/index.html; www.jerini.de; Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Dept. Health (1983)に開示されており、そのそれぞれの全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１７２】

そのような移入された配列は、免疫原性を減少させるのにまたは結合、親和性、オン率、オフ率、結合活性、特異性、半減期、もしくは該技術分野において周知の他のあらゆる適切な特性を減少、増強もしくは改変するのに用いられ得る。一般的に、ＣＤＲ残基は、直接的に且つほとんど実質的に、ＣＤ２０結合への影響に関与している。従って、可変領域および定常領域の非ヒト配列はヒトまたは他のアミノ酸で置換され得るが、一部または全ての非ヒトまたはヒトＣＤＲ配列が保持される。

【０１７３】

また、抗原ＣＤ２０に対する高い親和性および他の有益な生物学的性質を保持したまま、抗体は、所望によりヒト化、再表面化、設計され、つまりヒト抗体が設計され得る。この目的を達成するために、ヒト化された（またはヒト）または設計された抗ＣＤ２０抗体および再表面化された抗体は、親配列、設計された配列、およびヒト化された配列の３次元モデルを用いた、親配列および種々の概念的なヒト化された産物および設計された産物の分析方法によって、所望により調製され得る。３次元的な免疫グロブリンモデルは一般に入手可能であり、当業者によく知られている。選択された対象免疫グロブリン配列の推定３次元的立体配座構造を説明および提示するコンピュータープログラムが利用可能であ

る。このような提示物を調べることにより、対象免疫グロブリン配列の機能における残基の推定機能の分析、すなわち、対象免疫グロブリンがＣＤ２０等の抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能となる。このような方法で、標的抗原に対する向上した親和性等の所望の抗体特性が達成されるように、コンセンサス配列およびインポート配列から、フレームワーク（ＦＲ）残基を選択し組み合わせることができる。

【０１７４】

本発明の抗体のヒト化、再表面化または設計は、あらゆる既知の方法を用いて実効することができ、例えば、限定されないが、Winter (Jones et al., Nature 321:522 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323 (1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534 (1988)), Sims et al., J. Immunol. 151: 2296 (1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901 (1987), Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)、米国特許第５,６３９,６４１号、同第５,７２３,３２３号；同第５,９７６,８６２号；同第５,８２４,５１４号；同第５,８１７,４８３号；同第５,８１４,４７６号；同第５,７６３,１９２号；同第５,７２３,３２３号；同第５,７６６,８８６号；同第５,７１４,３５２号；同第６,２０４,０２３号；同第６,１８０,３７０号；同第５,６９３,７６２号；同第５,５３０,１０１号；同第５,５８５,０８９号；同第５,２２５,５３９号；同第４,８１６,５６７号；国際出願PCT／：US９８／１６２８０号；同第US９６／１８９７８号；同第US９１／０９６３０号；同第US９１／０５９３９号；同第US９４／０１２３４号；同第ＧＢ８９／０１３３４号；同第ＧＢ９１／０１１３４号；同第ＧＢ９２／０１７５５号；国際公開第９０／１４４４３号；国際公開第９０／１４４２４号；国際公開第９０／１４４３０号；欧州特許第２２９２４６号；同第７,５５７,１８９号；同第７,５３８,１９５号；および同第７,３４２,１１０号に記載され、そのそれぞれの全体が、その引用文献を含めて、参照により本明細書に組み込まれる。

【０１７５】

Fc領域

【０１７６】

ある態様では、抗体は変化した（例えば、変異した）Ｆｃ領域を含む。例えば、いくつかの態様では、Ｆｃ領域は抗体のエフェクター機能を減少または増強するために変化されている。いくつかの態様では、Ｆｃ領域はＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＧ、ＩｇＥ、または他のアイソタイプから選択されるアイソタイプである。

【０１７７】

あるいは、または、さらに、アミノ酸改変と、抗原結合分子のＦｃ領域のＣ１ｑ結合および／または補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）機能を変化させる1つまたは複数のさらなるアミノ酸改変とを組み合わせることは有用であり得る。とくに重要な出発ポリペプチドは、Ｃ１ｑに結合し、補体依存性細胞傷害を示すものであり得る。既存のＣ１ｑ結合活性を有し、所望によりＣＤＣ仲介能をさらに有するポリペプチドは、それらの活性うちの一方または両方が増強されるように改変され得る。Ｃ１ｑを変化させるおよび／または補体依存性細胞傷害機能を改変するアミノ酸改変は、例えば、国際公開第００４２０７２号に記載され、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【０１７８】

変化したエフェクター機能をもつ本発明の抗体のＦｃ領域は、例えば、Ｃ１ｑ結合および／またはＦｃγＲ結合を改変することなどにより設計することができ、それによって、ＣＤＣ活性および／またはＡＤＣＣ活性を変化させることができる。「エフェクター機能」は、生物活性（例えば、対象において）を活性化または減少させる原因である。エフェクター機能の例としては、Ｃ１ｑ結合；補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）；Ｆｃ受容体結合；抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）；食作用；細胞表面受容体の下方制御（例えば、Ｂ細胞受容体；ＢＣＲ）等が挙げられるが、これらに限定されない。そのようなエフェクター機能は、Ｆｃ領域が結合ドメイン（例えば、抗体可変領域）と結合していることを要することがあり、多彩なアッセイ（例えば、Ｆｃ結合アッセイ、ＡＤＣＣアッセイ、ＣＤＣア

ッセイ、等）を使用して評価することができる。

【０１７９】

例えば、改善されたＣ１ｑ結合および改善されたＦｃγＲＩＩＩ結合（例えば、改善されたＡＤＣＣ活性および改善されたＣＤＣ活性の両方を有する）をもつ、操作された抗ＣＤ２０抗体の変異型Ｆｃ領域を産生することができる。あるいは、もしエフェクター機能の減少または除去が望まれるならば、減少したＣＤＣ活性および／または減少したＡＤＣＣ活性を持つよう変異型Ｆｃ領域を操作することができる。他の態様において、これらの活性のうち１つだけを増加させることができ、また所望により、他の活性を減少させることもできる（例えば、改善されたＡＤＣＣ活性をもつが減少したＣＤＣ活性を持つＦｃ領域変異体を生成するために、また逆の場合も同様に）。例示的なＦｃ突然変異体は、ＡＤＣＣが強化され、ＣＤＣ活性が減少している、Ｓ２３９Ｄ、Ａ３３０Ｌ、およびＩ３３２Ｄ（ＥＵ番号システム）３残基の変化である。そのような突然変異体を設計するための非限定的な方法が、例えば、Lazar et al. (2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(11): 4005-4010) and Okazaki et al. (2004, J. Mol. Biol. 336(5):1239-49)に記載されている。また、国際公開第０３／０７４６７９号、同第２００４／０２９２０７号、同第２００４／０９９２４９号、同第２００６／０４７３５０号、同第２００６／０１９４４７号、同第２００６／１０５３３８号、同第２００７／０４１６３５号も参照のこと。

【０１８０】

Ｆｃ突然変異を、操作された抗体に導入することにより、新生児期のＦｃ受容体（ＦｃＲｎ）との相互作用を変化させ、薬物速度論的特性を改善することもできる。ＦｃＲｎに対する改善された結合をもつヒトＦｃ変異体に関する一連の記載には、例えば、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている、Shields et al., 2001.High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for FcγRI, FcγRII, FcγRIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the FcγR, J. Biol. Chem. 276:6591-6604)が含まれる。

【０１８１】

アミノ酸置換のもう１つ型は、抗体のＦｃ領域のグリコシル化パターンを変化させる役割を果たす。Ｆｃ領域のグリコシル化は、典型的には、Ｎ－結合型またはＯ－結合型のどちらかである。Ｎ－結合型は一般的には、炭水化物部分とアスパラギン残基の側鎖の結合を表す。炭水化物部分のアスパラギン側鎖ペプチド配列との酵素結合のための認識配列は、Ｘがプロリン以外のいずれかのアミノ酸である、アスパラギン－Ｘ－セリンおよびアスパラギン－Ｘ－トレオニンである。このように、ポリペプチド中のこれらのペプチド配列のどちらかの存在が、潜在的なグリコシル化部位を作り出す。Ｏ－結合型グリコシル化は、一般的には、糖類Ｎ－アセイルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースの１つと、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンの結合を表すが、５－ヒドロキプロリンまたは５－ヒドロキシリジンも使用することができる。

【０１８２】

抗体又はその断片のグリコシル化パターンは、例えば、ポリペプチド中にある１つまたは複数のグリコシル化部位を除去することにより、および／または、ポリペプチド中には存在しない１つまたは複数のグリコシル化部位を付加することにより、変化させることができる。抗体または抗体断片のＦｃ領域中のグリコシル化部位の除去は、１つまたは複数の上述のトリペプチド配列（Ｎ－結合型グリコシル化部位）を取り除くように、アミノ酸配列を変化させることにより、都合よく達成することができる。例示的なグリコシル化変異体は、重鎖の残基Ｎ２９７～Ａ２９７（ＥＵ番号システム）のアミノ酸置換を有する。Ｏ－結合型グリコシル化部位の除去は、１つまたは複数のグリコシル化されたセリンまたはトレオニン残基の、セリンまたはトレオニン以外のいかなるアミノ酸による置換によっても、達成することができる。

【０１８３】

抗体がＦｃ領域を含む場合、そこに結合した炭水化物を変化させることができる。例えば、抗体のＦｃ領域に結合したフコースを欠く、成熟炭水化物構造をもつ抗体が、例えば

、米国特許出願第２００３／０１５７１０８号（Presta、L.）および同第２００４／００９３６２１号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)に記載されている。抗体のＦｃ領域に結合した炭水化物中の、２分Ｎ－アセチルグロコサミン（ＧｌｃＮＡｃ）をもつ抗体が、例えば、国際公開第２００３／０１１８７８号、Jean-Mairet et al.および米国特許第６,６０２,６８４号、Umana et alに参照されている。抗体のＦｃ領域に結合したオリゴ糖中の少なくとも１つのガラクトース残基を持つ抗体が、例えば、国際公開第１９９７／３００８７号、Patel et al.に報告されている。また、Ｆｃ領域に結合した、変化した炭水化物を持つ抗体に関する、国際公開第１９９８／５８９６４号および国際公開第１９９９／２２７６４号（Raju、S.）も参照のこと。また、例えば、変化したグリコシル化をもつ抗原結合部位分子に関する、米国特許出願第２００５／０１２３５４６号（Umana et al.）も参照のこと。

【０１８４】

ある態様において、グリコシル化変異体は、Ｆｃ領域に結合した炭水化物構造がフコースを欠く、Ｆｃ領域を含む。このような変異体は、改善されたＡＤＣＣ機能を有する。「脱フコシル化された」または「フコース欠損」抗体に関する文献の例としては、米国特許出願第２００３／０１５７１０８号；国際公開第２０００／６１７３９号；同第２００１／２９２４６号；米国特許出願第２００３／０１１５６１４号；同第ＵＳ２００２／０１６４３２８号；同第２００４／００９３６２１号；同第２００４／０１３２１４０号；同第２００４／０１１０７０４号；同第２００４／０１１０２８２号；同第２００４／０１０９８６５号；国際公開第２００３／０８５１１９号；同第２００３／０８４５７０号；同第２００５／０３５５８６号；同第２００５／０３５７７８号；同第２００５／０５３７４２号；Okazaki et al., J. Mol. Biol., 336:1239-1249 (2004); Yamane Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 87: 614 (2004)が挙げられる。脱フコシル化された抗体を産生する細胞株の非限定的な例としては、タンパク質フコシル化が欠損しているＬｅｃ１３ＣＨＯ細胞(Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国特許出願第２００３／０１５７１０８号 AI、Presta、L;および国際公開第２００４／０５６３１２号 AI、Adams et al.、特に実施例１１において）、アルファ－１，６－フコシル基転移酵素遺伝子、ＦＵＴ８、ノックアウトＣＨＯ細胞などのノックアウト細胞株（Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng., 87: 614 (2004)）、および、細胞培地中での、例えばカスタノスペルミンなどのフコシル化経路阻害剤の使用によるもの（米国特許出願第２００９／００４１７６５号）などが挙げられる。

【０１８５】

ある態様において、本発明の抗体は、ＧｎＴＩＩＩが、ヒト型に設計された（human engineered）抗原特異的抗体にＧｌｃＮＡｃを付加するように、ベータ（１，４）－Ｎ－アセチルグルコサミン転移酵素ＩＩＩ（ＧｎＴＩＩＩ）を発現する細胞に発現する。そのような様式で抗体を産生する方法が、国際公開第／９９５４３４２号、同第／０３０１１８７８号、特許出願公開第２００３０００３０９７Ａ１号、およびUmana et al., Nature Biotechnology, 17:176-180, February 1999に記載されている。

【０１８６】

抗体親和性

【０１８７】

本発明の抗体は、ヒトＣＤ２０と広範囲の親和性（K_D）で結合する。好ましい態様において、本発明の少なくとも１つのモノクローナル抗体は、所望により、ヒト抗原と高い親和性で結合することができる。例えば、ヒトの、または操作されたヒトの、またはヒト化された、または再表面化したモノクローナル抗体は、当業者によって実施される、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、表面プラズモン共鳴法（ＳＰＲ）またはＫｉｎＥｘＡ（登録商標）法によって決定されるとおり、ヒト抗原を約10^{-7}Ｍ以下のK_D、限定されないが、例えば、０．１～９．９（またはその中のあらゆる範囲または値）ｘ10^{-7}、10^{-8}、10^{-9}、10^{-10}、10^{-11}、10^{-12}、10^{-13}、10^{-14}、10^{-15}またはその中のあらゆる範囲または値によって結合することができる。抗ＣＤ２０

抗体は、約１０$^{-9}$Ｍまたは未満、より具体的には約１０$^{-9}$～１０$^{-10}$ＭのＫｄで結合する。

【０１８８】

抗原に対する抗体の親和性または結合活性は、例えば酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、または放射免疫測定法（ＲＩＡ）、または速度法（kinetics）（例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）分析）などの、該技術分野において周知のあらゆる適切な方法を使用することによって、実験的に決定される。直接結合アッセイ並びに競合結合アッセイ型式は、容易に使用することができる。（例えば、Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y.(1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y.(1992)；および本明細書に記載の方法を参照のこと。）もし異なる条件下で測定される場合は、特定の抗体－抗原相互作用の親和性測定値は変動し得る（例えば、塩分濃度、ｐＨ、温度など）。従って、親和性測定値および他の抗原結合部位パラメータ（例えば、ＫＤまたはＫ$_{d}$、Ｋ$_{on}$、Ｋ$_{off}$）は、本明細書に記載の緩衝液のように、該技術分野において周知の、標準化された抗体および抗原の溶液、および標準化された緩衝液を使用して得ることが好ましい。

【０１８９】

１つの態様において、結合アッセイは、酵素免疫測定法（例えば、ＥＬＩＳＡ）とＣＤ２０抗原を使用することにより実施できる。例えば、ＣＤ２０を発現しているＢ細胞株または組み換え型タンパク質から調製された未精製の細胞可溶化物は、本明細書に記載のＣＤ２０抗原の原料として使用することができる。そのようなＣＤ２０抗原標本を、５０ｍＭ炭酸ナトリウム（ｐＨ９．６）中のＩｍｍｕｌｏｎ　２ＨＢプレート上に、１００μＬ／ウェルで、４℃で約１８～２４時間コーティングする。プレートを洗浄緩衝液（ＴＢＳ中の０．１％トウィーン－２０、ｐＨ７．４）で洗う。次いで、プレートをＴＢＳ（ｐＨ７．４）中の１％カゼインを用いて、１時間室温でブロックする。プレートに抗体の段階希釈を加え、約３時間室温でインキュベートし、次いで前述と同様に洗浄する。検出のために、ＨＲＰ結合ヤギ－抗ヒトまたはヤギ－抗マウス抗体を二次抗体として添加し、１時間室温でインキュベートさせておく。プレートを前述と同様に洗浄し、１００μＬ／ウェルのＴＭＢ１基質（ＢｉｏＦＸ）を添加して発色させる。約２０分間後、１００μＬ／ウェルの４５０ｎｍ反応停止試薬（ＢｉｏＦＸ）で、反応を停止させる。４５０ｎｍでの吸光度を読み取り、それぞれの抗体の抗体濃度に対してプロットする。Ｓ字形の用量反応曲線を結合曲線に当てはめ、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　ｖ４などのプログラムで初期状態のパラメータを用いて、ＥＣ５０値を算出する（グラフパッドソフトウェア社（GraphPad software）カリフォルニア州、サンディエゴ）。ＥＣ５０値は、それぞれの抗体に対する明白な解離定数「Ｋ$_{d}$」または「ＫＤ」の尺度として使用することができる。

【０１９０】

ペプチドまたはポリペプチド配列に関するアミノ酸配列同一性（％）は、配列のアライメント、および必要に応じて最大配列同一性（％）を達成するためのギャップ導入の後の、また配列相同性の一部としての保存的置換を全く考慮しない、特定のペプチドまたはポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である、候補配列中のアミノ酸残基のパーセンテージとしても定義される。アミノ酸配列同一性（％）を決定するためのアライメントは、該技術分野の範囲内の多彩な方法、例えば、本明細書に記載される、ＢＬＡＳＴ、ＢＬＡＳＴ－２、ＡＬＩＧＮまたはＭｅｇａｌｉｇｎ（ＤＮＡスター社（DNASTAR））ソフトウェアなどの一般に入手できるコンピューターソフトウェアを使用したものなどによって達成することができる。当業者は、比較する配列の完全長にわたる最大のアライメントを達成するのに必要なアルゴリズムを含む、アライメント測定のための適切なパラメーターを決定することができる。ＡＬＩＧＮ－２が入手可能でアミノ酸配列比較のために使用できる場合、特定のアミノ酸配列Ａの、特定のアミノ酸配列Ｂとの、またはＢに対するアミノ酸配列同一性（％）（あるいは、特定のアミノ酸配列Ｂとの、または、Ｂに対するあるアミノ酸配列同一性（％）を有する、または含む、特定のアミノ酸配列Ａ、とも表現し得る

）は、分数Ｘ／Ｙを１００倍することにより算出する。ここで、Ｘは、配列アライメントプログラムＡＬＩＧＮ－２によって、そのプログラムのＡおよびＢのアライメントにおいて同一の一致としてスコア化されたアミノ酸残基の数であり、およびＹはＢにおけるアミノ酸残基の総数である。アミノ酸配列Ａの長さがアミノ酸配列Ｂの長さと同じでない場合、ＡのＢに対するアミノ酸配列同一性（％）は、ＢのＡに対するアミノ酸配列同一性（％）と等しくはならないことが理解されよう。

【０１９１】

望ましくは、２つ以上のアミノ酸配列は、少なくとも５０％、６０％、７０％、８０％、または９０％同一である。より望ましくは、２つ以上のアミノ酸配列は、少なくとも９５％、９６％、９７％、９８％、９９％、または１００％同一である。特に断りがない限り、本明細書で使用されるすべてのアミノ酸配列同一性（％）の値は、直前の段落で記載した通り、例えば、ＡＬＩＧＮ－２またはＢＬＡＳＴコンピューターを使用して得た。

【０１９２】

抗体の使用

【０１９３】

一般的に、本発明の方法および組成物における有用な抗原特異的抗体のいくつかの形態は、所望により抗原に対する高い親和性結合を特徴とし得、また所望によりかつ好ましくは、レシピエントにおいて低い毒性および悪影響を有することを特徴とし得る。特に、可変領域、定常領域、およびフレームワークなどの個々の成分が、個々におよび／または集合的に、所望によりおよび好ましくは低い免疫原性を持つ、本発明の抗体、指定の断片または変異体は、本発明において有用である。本発明において使用し得る抗体は、所望により、長期間にわたって患者を治療し測定可能な症状軽減をもたらす能力、および、低いおよび／または許容できる毒性を特徴とする。低いまたは許容できる免疫原性および／または高い親和性、並びに他の適切な特性は、達成される治療結果に貢献し得る。「低免疫原性」は、本明細書において、治療された患者の２５％未満において、好ましくは、治療期間の間推奨される容量と推奨される治療経過によって治療された患者の１０％未満において発生する、抗体治療を受けている患者における抗原に対する抗体の少なくとも滴定可能なレベルの発生率として定義される。

【０１９４】

本発明の単離された核酸は、その少なくとも１つのＣＤ２０特異的抗体断片または指定されたその変異体を産生するために使用することができ、これらを用いて細胞、組織、器官または動物（哺乳類とヒトを含む）において測定しまたは影響を及ぼし、限定されないが、少なくとも１つの免疫不全または免疫疾患、心血管障害または心血管疾患、感染性の、悪性の、および／または神経性の障害または疾患、または他の既知のまたは指定の抗原関連疾患から選択される少なくとも一つの症状の、診断、モニタリング、調節、治療、緩和、発生予防を助ける、または症状の軽減をすることができる。

【０１９５】

そのような方法は、抗ＣＤ２０抗体または断片などの少なくとも１つの抗原特異的抗体を含む有効量の組成物または医薬組成物を、そのような調節、治療、緩和、予防、または症状、影響、または機構の軽減を必要としている、細胞、組織、器官、動物または患者に投与することを含み得る。有効量は、また本明細書に記載されるまたは関連技術において公知である、既知の方法を使用して実施および決定される通り、単一（例えば、大量瞬時投与）、複数、または継続投与あたり、または単一、複数、または継続投与あたり約０．０１～５０００μｇ／ｍｌの血清濃度を達成するために、約０．００１～５００ｍｇ／ｋｇの量、またはその中のあらゆる有効な範囲または値を含み得る。

【０１９６】

例示的な抗体

【０１９７】

本発明の好ましい抗原特異的ＣＤ２０抗体は、示される配列を有する。例えば、本発明の抗原特異的抗体は、表１（すなわち、ＣＤＲＬ１、ＣＤＲＬ２、およびＣＤＲＬ３）に

示される軽鎖ＣＤＲ配列の１つ、および／または表１（すなわち、ＣＤＲＨ１、ＣＤＲＨ２、およびＣＤＲＨ３）に示される重鎖ＣＤＲ配列の１つを含む。より具体的には、抗ＣＤ２０－６抗体は、配列番号２５のＣＤＲＬ１、配列番号２６のＣＤＲＬ２、配列番号２７のＣＤＲＬ３、配列番号２８のＣＤＲＨ１、配列番号２９のＣＤＲＨ２、配列番号３０のＣＤＲＨ３を有する。また、抗ＣＤ２０－７抗体は、配列番号１７のＣＤＲＬ１、配列番号１８のＣＤＲＬ２、配列番号１９のＣＤＲＬ３、配列番号２０のＣＤＲＨ１、配列番号２１のＣＤＲＨ２、配列番号２２のＣＤＲＨ３を有する。

【０１９８】

本発明例示的な態様には以下が含まれる。

マウスアミノ酸配列

ｍｕＣＤ２０－７ＬＣ
ＤＩＶＬＴＱＳＰＡＳＬＡＶＳＬＧＱＲＡＴＩＳＣＲＡＳＧＳＶＤＳＦＧＮＳＦＭＨＷＹ
ＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＲＡＳＮＬＥＳＧＶＰＡＲＦＳＧＧＧＳＲＴＤＦＴＬＴＩＮ
ＰＶＥＡＤＤＩＡＴＹＦＣＱＱＳＹＥＤＰＦＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＭＲＡＤＡＡＰＴＶＳ
ＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱ
ＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡ
ＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ　［配列番号１］；

ｍｕＣＤ２０－７ＬＣ　可変領域
ＤＩＶＬＴＱＳＰＡＳＬＡＶＳＬＧＱＲＡＴＩＳＣＲＡＳＧＳＶＤＳＦＧＮＳＦＭＨＷＹ
ＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＲＡＳＮＬＥＳＧＶＰＡＲＦＳＧＧＧＳＲＴＤＦＴＬＴＩＮ
ＰＶＥＡＤＤＩＡＴＹＦＣＱＱＳＹＥＤＰＦＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＭＲ　［配列番号３２］

ｍｕＣＤ２０－７ＨＣ
ＱＬＱＬＶＱＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＳＦＴＮＹＧＭＮＷＶＫＱＡ
ＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＤＤＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹ
ＬＱＩＳＮＬＫＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
ＳＡＫＴＴＰＰＳＶＹＰＬＡＰＧＳＡＡＱＴＮＳＭＶＴＬＧＣＬＶＫＧＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＥＳＤＬＹＴＬＳＳＳＶＴＶＰＳＳＭＲＰＳＥＴ
ＶＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＶＰＲＤＣＧＣＫＰＣＩＣＴＶＰＥＶＳＳＶＦＩ
ＦＰＰＫＰＫＤＶＬＴＩＴＬＴＰＫＶＴＣＶＶＶＤＩＳＫＤＤＰＥＶＱＦＳＷＦＶＤＤＶ
ＥＶＨＴＡＱＴＱＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＳＶＳＥＬＰＩＭＨＱＤＷＬＮＧＫＥＦＫＣＲ
ＶＮＳＡＡＦＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＲＰＫＡＰＱＶＹＴＩＰＰＰＫＥＱＭＡＫＤＫ
ＶＳＬＴＣＭＩＴＤＦＦＰＥＤＩＴＶＥＷＱＷＮＧＱＰＡＥＮＹＫＮＴＱＰＩＭＮＴＮＧ
ＳＹＦＶＹＳＫＬＮＶＱＫＳＮＷＥＡＧＮＴＦＴＣＳＶＬＨＥＧＬＨＮＨＨＴＥＫＳＬＳ
ＨＳＰＧＫ　［配列番号２］；

ｍｕＣＤ２０－７ＨＣ
可変領域ＱＬＱＬＶＱＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＳＦＴＮＹＧＭＮＷ
ＶＫＱＡＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＤＤＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡ
ＳＴＡＹＬＱＩＳＮＬＫＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹＷＧＱＧＴＳ
ＶＴＶＳＳ　［配列番号３４］

ｍｕＣＤ２０－６ＬＣ
ＤＩＶＬＴＱＳＰＡＳＬＡＶＳＬＧＱＲＡＩＩＳＣＲＡＳＥＳＶＤＮＦＧＮＳＦＭＨＷＹ
ＱＱＫＰＧＱＰＰＴＬＬＩＹＲＡＳＮＬＥＳＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＲＴＤＦＴＬＴＶＮ
ＰＶＥＡＤＤＩＡＴＹＹＣＱＱＳＹＥＤＰＦＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＲＡＤＡＡＰＴＶＳ
ＩＦＰＰＳＳＥＱＬＴＳＧＧＡＳＶＶＣＦＬＮＮＦＹＰＫＤＩＮＶＫＷＫＩＤＧＳＥＲＱ
ＮＧＶＬＮＳＷＴＤＱＤＳＫＤＳＴＹＳＭＳＳＴＬＴＬＴＫＤＥＹＥＲＨＮＳＹＴＣＥＡ
ＴＨＫＴＳＴＳＰＩＶＫＳＦＮＲＮＥＣ　［配列番号３］；

ｍｕＣＤ２０－６ＬＣ可変領域
ＤＩＶＬＴＱＳＰＡＳＬＡＶＳＬＧＱＲＡＩＩＳＣＲＡＳＥＳＶＤＮＦＧＮＳＦＭＨＷＹ
ＱＱＫＰＧＱＰＰＴＬＬＩＹＲＡＳＮＬＥＳＧＩＰＡＲＦＳＧＳＧＳＲＴＤＦＴＬＴＶＮ

ＰＶＥＡＤＤＩＡＴＹＹＣＱＱＳＹＥＤＰＦＴＦＧＡＧＴＫＬＥＬＫＲ　［配列番号４６］

ｍｕＣＤ２０－６ＨＣ

ＱＩＱＬＶＱＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＫＦＴＮＶＧＭＮＷＶＫＱＶ
ＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＡＹＡＤＤＦＫＧＲＦＶＦＳＬＥＴＳＡＳＡＡＦ
ＬＱＩＮＮＬＫＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
ＳＡＫＴＴＰＰＳＶＹＰＬＡＰＧＳＡＡＱＴＮＳＭＶＴＬＧＣＬＶＫＧＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＴＷＮＳＧＳＬＳＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＥＳＤＬＹＴＬＳＳＳＶＴＶＰＳＳＭＲＰＳＥＴ
ＶＴＣＮＶＡＨＰＡＳＳＴＫＶＤＫＫＩＶＰＲＤＣＧＣＫＰＣＩＣＴＶＰＥＶＳＳＶＦＩ
ＦＰＰＫＰＫＤＶＬＴＩＴＬＴＰＫＶＴＣＶＶＶＤＩＳＫＤＤＰＥＶＱＦＳＷＦＶＤＤＶ
ＥＶＨＴＡＱＴＱＰＲＥＥＱＦＮＳＴＦＲＳＶＳＥＬＰＩＭＨＱＤＷＬＮＧＫＥＦＫＣＲ
ＶＮＳＡＡＦＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＴＫＧＲＰＫＡＰＱＶＹＴＩＰＰＰＫＥＱＭＡＫＤＫ
ＶＳＬＴＣＭＩＴＤＦＦＰＥＤＩＴＶＥＷＱＷＮＧＱＰＡＥＮＹＫＮＴＱＰＩＭＮＴＮＧ
ＳＹＦＶＹＳＫＬＮＶＱＫＳＮＷＥＡＧＮＴＦＴＣＳＶＬＨＥＧＬＨＮＨＨＴＥＫＳＬＳ
ＨＳＰＧＫ　［配列番号４］；

ｍｕＣＤ２０－６ＨＣ可変領域

ＱＩＱＬＶＱＳＧＰＥＬＫＫＰＧＥＴＶＫＩＳＣＫＡＳＧＹＫＦＴＮＶＧＭＮＷＶＫＱＶ
ＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＡＹＡＤＤＦＫＧＲＦＶＦＳＬＥＴＳＡＳＡＡＦ
ＬＱＩＮＮＬＫＮＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
Ｓ　［配列番号４７］

ヒト化アミノ酸配列

ｈｕＣＤ２０－７ＬＣｖ１．０　ＤＩＶＬＴＱＳＰＡＳＬＡＶＳＰＧＱＲＡＴＩＳＣＲＡ
ＳＧＳＶＤＳＦＧＮＳＦＭＨＷＹＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＲＡＳＮＬＥＳＧＶＰＡＲ
ＦＳＧＧＧＳＲＴＤＦＴＬＴＩＮＰＶＥＡＮＤＩＡＴＹＦＣＱＱＳＹＥＤＰＦＴＦＧＱＧ
ＴＫＬＥＬＫＲＴＶＡＡＰＳＶＦＩＦＰＰＳＤＥＱＬＫＳＧＴＡＳＶＶＣＬＬＮＮＦＹＰ
ＲＥＡＫＶＱＷＫＶＤＮＡＬＱＳＧＮＳＱＥＳＶＴＥＱＤＳＫＤＳＴＹＳＬＳＳＴＬＴＬ
ＳＫＡＤＹＥＫＨＫＶＹＡＣＥＶＴＨＱＧＬＳＳＰＶＴＫＳＦＮＲＧＥＣ　［配列番号５］；

ｈｕＣＤ２０－７ＬＣｖ１．０可変領域

ＤＩＶＬＴＱＳＰＡＳＬＡＶＳＰＧＱＲＡＴＩＳＣＲＡＳＧＳＶＤＳＦＧＮＳＦＭＨＷＹ
ＱＱＫＰＧＱＰＰＫＬＬＩＹＲＡＳＮＬＥＳＧＶＰＡＲＦＳＧＧＧＳＲＴＤＦＴＬＴＩＮ
ＰＶＥＡＮＤＩＡＴＹＦＣＱＱＳＹＥＤＰＦＴＦＧＱＧＴＫＬＥＬＫＲ　［配列番号３３］

ｈｕＣＤ２０－７ＨＣｖ１．０

ＥＬＱＬＶＱＳＧＧＥＬＫＫＰＧＥＴＶＲＩＳＣＡＡＳＧＹＴＦＴＮＹＧＭＮＷＶＫＱＡ
ＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＡＰＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹ
ＬＱＩＳＳＬＫＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱ
ＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮ
ＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧ
ＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤ
ＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰ
ＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹ
ＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　［配列番号６］；

ｈｕＣＤ２０－７ＨＣｖ１．０可変領域

ＥＬＱＬＶＱＳＧＧＥＬＫＫＰＧＥＴＶＲＩＳＣＡＡＳＧＹＴＦＴＮＹＧＭＮＷＶＫＱＡ
ＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＡＰＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹ
ＬＱＩＳＳＬＫＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ

Ｓ　［配列番号３５］
ｈｕＣＤ２０－７ＨＣｖ１．１
ＥＬＱＬＶＱＳＧＧＥＬＫＫＰＧＥＴＶＲＩＳＣＡＡＳＧＹＳＦＴＮＹＧＭＮＷＶＫＱＡ
ＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＡＰＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹ
ＬＱＩＳＳＬＫＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
ＳＡＳＴＫＧＰＳＶＦＰＬＡＰＳＳＫＳＴＳＧＧＴＡＡＬＧＣＬＶＫＤＹＦＰＥＰＶＴＶ
ＳＷＮＳＧＡＬＴＳＧＶＨＴＦＰＡＶＬＱＳＳＧＬＹＳＬＳＳＶＶＴＶＰＳＳＳＬＧＴＱ
ＴＹＩＣＮＶＮＨＫＰＳＮＴＫＶＤＫＫＶＥＰＫＳＣＤＫＴＨＴＣＰＰＣＰＡＰＥＬＬＧ
ＧＰＳＶＦＬＦＰＰＫＰＫＤＴＬＭＩＳＲＴＰＥＶＴＣＶＶＶＤＶＳＨＥＤＰＥＶＫＦＮ
ＷＹＶＤＧＶＥＶＨＮＡＫＴＫＰＲＥＥＱＹＮＳＴＹＲＶＶＳＶＬＴＶＬＨＱＤＷＬＮＧ
ＫＥＹＫＣＫＶＳＮＫＡＬＰＡＰＩＥＫＴＩＳＫＡＫＧＱＰＲＥＰＱＶＹＴＬＰＰＳＲＤ
ＥＬＴＫＮＱＶＳＬＴＣＬＶＫＧＦＹＰＳＤＩＡＶＥＷＥＳＮＧＱＰＥＮＮＹＫＴＴＰＰ
ＶＬＤＳＤＧＳＦＦＬＹＳＫＬＴＶＤＫＳＲＷＱＱＧＮＶＦＳＣＳＶＭＨＥＡＬＨＮＨＹ
ＴＱＫＳＬＳＬＳＰＧＫ　［配列番号７］；
ｈｕＣＤ２０－７ＨＣｖ１．１可変領域
ＥＬＱＬＶＱＳＧＧＥＬＫＫＰＧＥＴＶＲＩＳＣＡＡＳＧＹＳＦＴＮＹＧＭＮＷＶＫＱＡ
ＰＧＫＧＬＫＷＭＧＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＡＰＦＫＧＲＦＡＦＳＬＥＴＳＡＳＴＡＹ
ＬＱＩＳＳＬＫＴＥＤＴＡＴＹＦＣＡＲＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹＷＧＱＧＴＳＶＴＶＳ
Ｓ　［配列番号３６］
マウス可変領域ＤＮＡ配列
ｍｕＣＤ２０－７ＬＣ
ｇａｔａｔｔｇｔｇｃｔｇａｃｃｃａｇｔｃｔｃｃａｇｃｔｔｃｔｔｔｇｇｃｔｇｔｇｔ
ｃｔｃｔａｇｇｇｃａｇａｇｇｇｃｃａｃｃａｔａｔｃｃｔｇｃａｇａｇｃｃａｇｔｇｇ
ａａｇｔｇｔｔｇａｔａｇｔｔｔｔｇｇｃａａｔａｇｔｔｔｔａｔｇｃａｃｔｇｇｔａｃ
ｃａｇｃａｇａａａｃｃａｇｇａｃａｇｃｃｔｃｃｃａａａｃｔｃｃｔｃａｔｃｔａｔｃ
ｇｔｇｃａｔｃｃａａｃｃｔａｇａａｔｃｔｇｇｇｇｔｃｃｃｔｇｃｃａｇｇｔｔｃａｇ
ｔｇｇｃｇｇｔｇｇｇｔｃｔａｇｇａｃａｇａｃｔｔｃａｃｃｃｔｃａｃｃａｔｔａａｔ
ｃｃｔｇｔｇｇａａｇｃｔｇａｔｇａｔａｔｔｇｃａａｃｃｔａｔｔｔｃｔｇｔｃａｇｃ
ａａａｇｔｔａｔｇａｇｇａｔｃｃｇｔｔｃａｃｇｔｔｃｇｇｔｇｃｔｇｇｇａｃｃａａ
ｇｃｔｇｇａｇｃｔｇａｔｇｃｇｇ　［配列番号８］；
ｍｕＣＤ２０－７ＨＣ
ｃａｇｃｔｃｃａｇｔｔｇｇｔｇｃａｇｔｃｔｇｇａｃｃｔｇａｇｃｔｇａａｇａａｇｃ
ｃｔｇｇａｇａｇａｃａｇｔｃａａｇａｔｃｔｃｃｔｇｃａａｇｇｃｔｔｃｔｇｇｇｔａ
ｔａｇｔｔｔｃａｃａａａｃｔａｔｇｇａａｔｇａａｃｔｇｇｇｔｇａａｇｃａｇｇｃｔ
ｃｃａｇｇａａａｇｇｇｔｔｔａａａｇｔｇｇａｔｇｇｇｃｔｇｇａｔａａａｃａｃｃｔ
ａｃａｃｔｇｇａｇａｇｃｃａｔｃｔｔａｔｇｃｔｇａｔｇａｃｔｔｃａａｇｇｇａｃｇ
ｇｔｔｔｇｃｃｔｔｃｔｃｔｔｔｇｇａａａｃｃｔｃｔｇｃｃａｇｃａｃｔｇｃｃｔａｔ
ｔｔｇｃａｇａｔｃａｇｃａａｃｃｔｃａａａａａｔｇａｇｇａｃａｃｇｇｃｔａｃａｔ
ａｔｔｔｃｔｇｔｇｃａａｇｇｇｇｇｇｃｃｔａｃｔａｔａｇｇｔａｃｇａｃｔｔａｇｇ
ｔａｔｇｇａｃｔａｃｔｇｇｇｇｔｃａａｇｇａａｃｃｔｃａｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｃ
ｔｃａ　［配列番号９］；
ｍｕＣＤ２０－６ＬＣ
ｇａｔａｔｔｇｔｇｃｔｇａｃｃｃａｇｔｃｔｃｃａｇｃｔｔｃｔｔｔｇｇｃｔｇｔｇｔ
ｃｔｔｔａｇｇｇｃａｇａｇｇｇｃｃａｔｔａｔａｔｃｃｔｇｃａｇａｇｃｃａｇｔｇａ
ａａｇｔｇｔｔｇａｔａａｔｔｔｔｇｇｃａａｔａｇｃｔｔｔａｔｇｃａｃｔｇｇｔａｃ
ｃａｇｃａｇａａｇｃｃａｇｇａｃａｇｃｃａｃｃｃａｃａｃｔｃｃｔｃａｔｃｔａｔｃ
ｇｔｇｃａｔｃｃａａｃｃｔａｇａａｔｃｔｇｇｇａｔｃｃｃｔｇｃｃａｇｇｔｔｃａｇ
ｔｇｇｃａｇｔｇｇｇｔｃｔａｇｇａｃａｇａｃｔｔｃａｃｃｃｔｃａｃｃｇｔｔａａｔ
ｃｃｔｇｔｇｇａｇｇｃｔｇａｔｇａｔａｔｔｇｃａａｃｔｔａｔｔａｃｔｇｔｃａａｃ
ａａａｇｔｔａｔｇａｇｇａｔｃｃｇｔｔｃａｃｇｔｔｃｇｇｔｇｃｔｇｇｇａｃｃａａ

ｇｃｔｇｇａｇｃｔｇａａａｃｇｇ　［配列番号１０］；
ｍｕＣＤ２０－６ＨＣ
ｃａｇａｔｃｃａｇｔｔｇｇｔｇｃａｇｔｃｔｇｇａｃｃｔｇａｇｃｔｇａａｇａａｇｃ
ｃｔｇｇａｇａｇａｃａｇｔｃａａｇａｔｃｔｃｃｔｇｃａａｇｇｃｔｔｃｔｇｇｇｔａ
ｔａａａｔｔｃａｃａａａｃｇｔｔｇｇａａｔｇａａｃｔｇｇｇｔｇａａｇｃａｇｇｔｔ
ｃｃａｇｇａａａｇｇｇｔｔｔａａａｇｔｇｇａｔｇｇｇｃｔｇｇａｔａａａｃａｃｃｔ
ａｃａｃｔｇｇａｇａｇｃｃａｇｃａｔａｔｇｃｔｇａｔｇａｃｔｔｃａａｇｇｇａｃｇ
ｇｔｔｔｇｔｃｔｔｔｔｃｔｔｔｇｇａａａｃｃｔｃｔｇｃｃａｇｃｇｃｔｇｃｃｔｔｔ
ｔｔｇｃａｇａｔｃａａｃａａｃｃｔｃａａａａａｔｇａｇｇａｃａｃｇｇｃｔａｃａｔ
ａｔｔｔｃｔｇｔｇｃａａｇｇｇｇｇｇｃｃｔａｃｔａｔａｇｇｔａｔｇａｃｔｔａｇｇ
ｔａｔｇｇａｃｔａｃｔｇｇｇｇｔｃａａｇｇａａｃｃｔｃａｇｔｃａｃｃｇｔｃｔｃｃ
ｔｃａ　［配列番号１１］；
ヒト化およびキメラの可変領域ＤＮＡ配列
ｈｕＣＤ２０－７ＬＣｖ１．０
ｇａａｔｔｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｇｃｔｇｇａｇｃｔｇｔａｔｔａｔｔｃｔｇｔｔｃｃ
ｔｇｇｔａｇｃａａｃｃｇｃｔａｃａｇｇｔｇｔａｃａｃｔｃｃｇａｔａｔｔｇｔｔｃｔ
ｔａｃｃｃａａａｇｃｃｃａｇｃｃｔｃｃｃｔｃｇｃｔｇｔｃａｇｔｃｃａｇｇｃｃａｇ
ｃｇａｇｃｃａｃｔａｔｃｔｃｃｔｇｃｃｇｔｇｃａａｇｔｇｇａｔｃｔｇｔｃｇａｃａ
ｇｃｔｔｔｇｇａａａｔａｇｃｔｔｃａｔｇｃａｃｔｇｇｔａｃｃａｇｃａｇａａｇｃｃ
ｔｇｇｔｃａｇｃｃｃｃｃａａａａｃｔｃｃｔｇａｔｔｔａｔｃｇｇｇｇｃｔｔｃｃａａｔ
ｃｔｇｇａｇｔｃａｇｇａｇｔｇｃｃｃｇｃａａｇｇｔｔｃｔｃｔｇｇｃｇｇｇｇｇｇｃａ
ｇｃｃｇｇａｃａｇａｔｔｔｃａｃａｔｔｇａｃｔａｔａａａｔｃｃｃｇｔｇｇａｇｇｃ
ｔａａｃｇａｔａｔｃｇｃａａｃａｔａｃｔｔｃｔｇｔｃａｇｃａｇｔｃｔｔａｔｇａｇ
ｇａｃｃｃｃｔｔｃａｃａｔｔｃｇｇｃｃａｇｇｇｃａｃａａａｇｃｔｇｇａｇｃｔｃａ
ａａｃｇｔａｃｇ　［配列番号１２］；
ｈｕＣＤ２０－７ＨＣｖ１．０
ａａｇｃｔｔｇｃｃａｃｃａｔｇｇｇａｔｇｇａｇｔｔｇｃａｔｃａｔｃｃｔｇｔｔｃｃ
ｔｃｇｔｃｇｃａａｃｃｇｃａａｃａｇｇｇｇｔｇｃａｔｔｃｃｇａａｃｔｇｃａｇｃｔ
ｇｇｔｃｃａｇｔｃｔｇｇｔｇｇｔｇａｇｔｔｇａａｇａａａｃｃａｇｇｇｇａａａｃａ
ｇｔｔｃｇｃａｔｔａｇｃｔｇｔｇｃｔｇｃａａｇｃｇｇｃｔａｔａｃａｔｔｃａｃａａ
ａｔｔａｔｇｇａａｔｇａａｔｔｇｇｇｔｇａａａｃａｇｇｃｃｃｃｃｇｇｃａａｇｇｇ
ｃｃｔｇａａｇｔｇｇａｔｇｇｇｃｔｇｇａｔａａａｔａｃｃｔａｔａｃｔｇｇａｇａｇ
ｃｃｔａｇｔｔａｃｇｃｃｇｃｔｃｃｃｔｔｃａａｇｇｇｇｃｇｇｔｔｔｇｃｃｔｔｃｔ
ｃｔｃｔｔｇａｇａｃａａｇｔｇｃｃａｇｃａｃｃｇｃｃｔａｔｔｔｇｃａｇａｔｔｔｃ
ｔａｇｔｔｔｇａａａａｃｃｇａａｇａｃａｃａｇｃｔａｃａｔａｃｔｔｃｔｇｃｇｃｃ
ｃｇｃｇｇｃｇｃａｔａｔｔａｃａｇａｔａｔｇａｔｃｔｇｇｇｇａｔｇｇａｃｔａｔｔ
ｇｇｇｇｃｃａｇｇｇｔａｃｃｔｃｃｇｔｇａｃｃｇｔａｔｃａｔｃｃｇｃｃｔｃｃａｃ
ａａａｇｇｇｃｃｃ　［配列番号１３］；
ｈｕＣＤ２０－７ＨＣｖ１．１
ａａｇｃｔｔｇｃｃａｃｃａｔｇｇｇｔｔｇｇｔｃｔｔｇｃａｔｃａｔｔｃｔｇｔｔｔｃ
ｔｇｇｔａｇｃａａｃｔｇｃａａｃｔｇｇａｇｔｇｃａｃａｇｃｇａｇｃｔｇｃａａｃｔ
ｃｇｔｃｃａｇａｇｃｇｇａｇｇｔｇａｇｃｔｔａａｇａａｇｃｃａｇｇａｇａｇａｃｃ
ｇｔｇｃｇａａｔｃｔｃｔｔｇｃｇｃｃｇｃａｔｃｃｇｇｃｔａｃｔｃｔｔｔｃａｃａａ
ａｔｔａｃｇｇａａｔｇａａｔｔｇｇｇｔｃａａｇｃａｇｇｃａｃｃａｇｇｔａａｇｇｇ
ａｃｔｃａａａｔｇｇａｔｇｇｇｃｔｇｇａｔｃａａｔａｃｃｔａｃａｃｃｇｇｃｇａｇ
ｃｃｔａｇｔｔａｔｇｃｃｇｃａｃｃｃｔｔｃａａｇｇｇｔｃｇａｔｔｔｇｃａｔｔｃａ
ｇｃｃｔｇｇａｇａｃｃａｇｔｇｃｔｔｃｔａｃａｇｃｔｔａｔｔｔｇｃａｇａｔｃａｇ
ｃｔｃｔｃｔｇａａｇａｃｃｇａｇｇａｃａｃａｇｃｔａｃａｔａｃｔｔｃｔｇｃｇｃｃ
ｃｇｔｇｇｔｇｃｃｔａｃｔａｃｃｇａｔａｃｇａｔｃｔｇｇｇｇｃａｔｇｇａｃｔａｔｔ
ｇｇｇｇｃｃａａｇｇｃａｃｃｔｃａｇｔｇａｃｔｇｔｇｔｃｔｔｃａｇｃａｔｃａａｃ

ｃａａｇｇｇｃｃｃ［配列番号１４］；
ｃｈＣＤ２０－７ＬＣ
ｇａａｔｔｃｇｃｃａｃｃａｔｇｇｇｇｔｇｇｔｃａｔｇｔａｔｃａｔｃｃｔｃｔｔｃｃ
ｔｔｇｔｇｇｃａａｃｃｇｃａａｃａｇｇｃｇｔａｃａｃｔｃｃｇａｃａｔｔｇｔａｃｔ
ｇａｃｃｃａｇｔｃａｃｃｔｇｃｃｔｃｃｃｔｃｇｃｃｇｔａｔｃｃｃｔｔｇｇｇｃａｇ
ａｇａｇｃｃａｃｔａｔｔａｇｔｔｇｃａｇｇｇｃｔａｇｔｇｇｃａｇｔｇｔｃｇａｔｔ
ｃｔｔｔｃｇｇｃａａｔｔｃａｔｔｔａｔｇｃａｃｔｇｇｔａｔｃａｇｃａｇａａａｃｃ
ａｇｇｇｃａｇｃｃａｃｃｃａａｇｔｔｇｃｔｃａｔａｔａｃｃｇｃｇｃｃｔｃａａａｃ
ｃｔｔｇａｇｔｃｃｇｇｇｇｔｃｃｃａｇｃｃｃｇｇｔｔｔｔｃｃｇｇａｇｇｃｇｇｇｔ
ｃｃｃｇｃａｃｃｇａｃｔｔｃａｃｃｃｔｇａｃａａｔｃａａｃｃｃａｇｔａｇａａｇｃ
ａｇａｔｇａｔａｔｃｇｃｔａｃｔｔａｔｔｔｃｔｇｔｃａｇｃａｇａｇｃｔａｔｇａａ
ｇａｃｃｃｔｔｔｔａｃａｔｔｔｇｇｇｇｃｃｇｇａａｃｃａａｇｔｔｇｇａｇｃｔｃａ
ａｇｃｇｔａｃｇ［配列番号１５］；
ｃｈＣＤ２０－７ＨＣ
ａａｇｃｔｔｇｃｃａｃｃａｔｇｇｇａｔｇｇａｇｃｔｇｃａｔｃａｔｔｔｔｇｔｔｔｃ
ｔｔｇｔｃｇｃｔａｃｃｇｃａａｃｔｇｇｃｇｔｃｃａｃｔｃａｃａｇｃｔｇｃａｇｃｔ
ｇｇｔｇｃａｇａｇｔｇｇｇｃｃｔｇａｇｃｔｔａａｇａａａｃｃｃｇｇｔｇａｇａｃｔ
ｇｔｇａａｇａｔｃｔｃａｔｇｔａａｇｇｃｔａｇｃｇｇｃｔａｔｔｃｃｔｔｔａｃａａ
ａｔｔａｔｇｇｃａｔｇａａｔｔｇｇｇｔｇａａｇｃａｇｇｃｃｃｃｔｇｇｇａａｇｇｇ
ｔｃｔｃａａｇｔｇｇａｔｇｇｇａｔｇｇａｔｔａａｃａｃｃｔａｔａｃｔｇｇａｇａｇ
ｃｃｔｔｃａｔａｃｇｃｃｇａｔｇａｔｔｔｃａａａｇｇｇａｇｇｔｔｃｇｃｃｔｔｃｔ
ｃｃｔｔｇｇａａａｃｃｔｃｔｇｃｔｔｃｔａｃｔｇｃｃｔａｃｃｔｔｃａｇａｔｔｔｃ
ｔａａｃｃｔｃａａｇａａｃｇａｇｇａｃａｃｔｇｃａａｃｃｔａｔｔｔｔｔｇｃｇｃｔ
ｃｇｔｇｇｃｇｃａｔａｃｔａｔｃｇａｔａｔｇａｔｃｔｇｇｇｃａｔｇｇａｔｔａｔｔ
ｇｇｇｇｔｃａａｇｇｃａｃａｔｃｃｇｔａａｃｃｇｔｇｔｃｃｔｃａｇｃｔａｇｃａｃ
ｔａａｇｇｇｃｃｃ［配列番号１６］；
マウスおよびヒトのＣＤ２０－７再表面化ＣＤＲ
軽鎖
ＣＤ２０－７＿ＬＣ＿ＣＤＲ１　ＲＡＳＧＳＶＤＳＦＧＮＳＦＭＨ［配列番号：１７］；
ＣＤ２０－７＿ＬＣ＿ＣＤＲ２　ＲＡＳＮＬＥＳ［配列番号１８］；
ＣＤ２０－７＿ＬＣ＿ＣＤＲ３　ＱＱＳＹＥＤＰＦＴ［配列番号１９］；
重鎖
ＣＤ２０－７＿ＨＣ＿ＣＤＲ１　ＮＹＧＭＮ［配列番号２０］；
ＣＤ２０－７＿ＨＣ＿ＣＤＲ２　ＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳ［配列番号２１］；
ＣＤ２０－７＿ＨＣ＿ＣＤＲ３　ＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹ［配列番号２２］；
Ｋａｂａｔにより定義されたマウスおよびヒト化ＣＤ２０－７　ＨＣ　ＣＤＲ２
マウスｍｕＣＤ２０－７＿ＨＣ＿ＫａｂＣＤＲ２　ＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＤＤＦＫＧ
［配列番号２３］；
ヒト化ｈｕＣＤ２０－７＿ＨＣ＿ＫａｂＣＤＲ２　ＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＡＰＦＫＧ
［配列番号２４］；
マウスＣＤ２０－６ＣＤＲ配列
軽鎖
ＣＤ２０－６＿ＬＣ＿ＣＤＲ１　ＲＡＳＥＳＶＤＮＦＧＮＳＦＭＨ［配列番号２５］；
ＣＤ２０－６＿ＬＣ＿ＣＤＲ２　ＲＡＳＮＬＥＳ［配列番号２６］；
ＣＤ２０－６＿ＬＣ＿ＣＤＲ３　ＱＱＳＹＥＤＰＦＴ［配列番号２７］；
重鎖
ＣＤ２０－６＿ＨＣ＿ＣＤＲ１　ＮＶＧＭＮ［配列番号２８］；
ＣＤ２０－６＿ＨＣ＿ＣＤＲ２　ＷＩＮＴＹＴＧＥＰＡ［配列番号２９］；
ＣＤ２０－６＿ＨＣ＿ＣＤＲ３　ＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹ［配列番号３０］；および
Ｋａｂａｔにより定義されたＨＣ　ＣＤＲ２

ＣＤ２０－６＿ＨＣ＿ＫａｂＣＤＲ２　ＷＩＮＴＹＴＧＥＰＡＹＡＤＤＦＫＧ［配列番号３１］。
当業者は、本応用における配列が、非限定的な例であることを理解する。
【０１９９】
機能的等価物、抗体変異体、および誘導体
【０２００】
機能的等価物はさらに、全抗体またはインタクトな抗体のものと同じまたは匹敵する結合特性を持つ抗体の断片を含む。そのような断片は、Ｆａｂ断片またはＦ（ａｂ’）$_2$断片の１つまたは両方を含んでもよい。好ましくは、抗体断片は、完全抗体のすべての６つの相補性決定領域を含むことが望ましいが、完全抗体の６つの相補性決定領域のすべてよりもより少ない数、例えば１つ、２つ、３つ、４つ、５つのＣＤＲを含む断片も、また機能的である。さらに、機能的等価物は、以下の免疫グロブリンクラス：ＩｇＧ、ＩｇＭ、ＩｇＡ、ＩｇＤ、またはＩｇＥ、およびそのサブクラスのいずれか１つのメンバー、またはそれらの組み合わせであってもよい。
【０２０１】
本発明のある態様において、抗ＣＤ２０抗体を改変することにより融合タンパク質、すなわち、抗体、異種タンパク質に融合した断片、ポリペプチド、またはペプチドを産生することができる。ある態様において、抗ＣＤ２０抗体の一部に融合したタンパク質は、ＡＤＥＰＴの酵素成分である。抗ＣＤ２０抗体との融合タンパク質として操作され得る、他のタンパク質またはポリペプチドの例としては、リシン、アブリン、リボヌクレアーゼ、デオキシリボヌクレアーゼI、ブドウ球菌腸毒素Ａ、ポークウィード抗ウイルスタンパク質、ゲロニン、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素、および緑膿菌内毒素などの毒素類が挙げられるが、これに限定されない。例えばPastan et al., Cell, 47:641 (1986); and Goldenberg et al., Cancer Journal for Clinicians, 44:43 (1994)を参照のこと。使用し得る、酵素的に活性な毒素類およびその断片としては、ジフテリアＡ鎖、ジフテリア毒素の非結合性活性断片、外毒素Ａ鎖（緑膿菌（Pseudomonas aeruginosa）から採取）、リシンＡ鎖、アブリンＡ鎖、モデシンＡ鎖、α－サルシン、シナアブラギ（Aleurites fordii）タンパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、アメリカヤマゴボウ（Phytolaca americana）タンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰＩＩ、およびＰＡＰ－Ｓ）、ニガウリ（momordica charantia）阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ（sapaonari aofficinalis）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン（mitogellin）、レストリクトシン、フェノマイシン（phenomycin）、エノマイシン（enomycin）およびトリコセセンス（tricothecenes）が挙げられる。非限定的な例が、例えば、その全体が参照により本明細書に組み入れられている、１９９３年１０月２８日に公開された国際公開第９３／２１２３２号に記載されている。
【０２０２】
さらなる融合タンパク質は、遺伝子シャフリング、モチーフシャフリング、エキソンシャフリング、および／またはコドンシャフリング（まとめて「ＤＮＡシャフリングと呼ぶ」）技術によって生成することができる。ＤＮＡシャフリングは、抗体またはその断片（例えば、より高い親和性とより低い解離速度をもつ抗体、またはその断片）の活性を変化させるために使用することができる。一般的には、それぞれが参照によりその全体が本明細書に組み入れられている、米国特許第５，６０５，７９３号；同第５，８１１，２３８号；同第５，８３０，７２１号；同第５，８３４，２５２号；および同第５，８３７，４５８号、およびPatten et al., 1997, Curr. Opinion Biotechnol., 8:724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol., 16(2):76-82; Hansson et al., 1999, J. Mol. Biol., 287:265-76; および Lorenzo および Blasco, 1998, Biotechniques, 24(2):308-313を参照のこと。抗体はさらに、米国特許出願公開第２００３０１１８５９２号、同第２００３３０１３３９３９号、およびＰＣＴ国際公開第０２／０５６９１０号に記載される通り、結合ドメイン免疫グロブリン融合タンパク質であり得る。これら特許出願公開は、すべてLedbetterらにより、その全体が参照により本明細書に組み込まれている。
【０２０３】

ドメイン抗体。本発明の組成物および方法の抗ＣＤ２０抗体は、ドメイン抗体、例えば、ヒト抗体の重鎖（ＶＨ）または軽鎖（ＶＬ）の可変領域に対応する、抗体の小さな機能的結合単位を含む抗体であり得る。ドメイン抗体の例としては、治療標的に特異的な、ドマンティス・リミテッド社（Domantis Limited）（英国、ケンブリッジ）およびドマンティス・インク社（Domantis Inc.）（米国、マサチューセッツ州、ケンブリッジ）より入手可能なものが挙げられるが、これらに限定されない（例えば国際公開第０４／０５８８２１号；同第０４／００３０１９号；米国特許第６，２９１，１５８号；同第６，５８２，９１５号；同第６，６９６，２４５号；および同第６，５９３，０８１号を参照のこと）。市販されているドメイン抗体のライブラリを使用して、抗ＣＤ２０ドメイン抗体を同定することができる。ある態様において、本発明の抗ＣＤ２０抗体は、ＣＤ２０機能的結合単位およびＦｃガンマ受容体機能的結合単位を含む。

【０２０４】

二重特異性抗体。「二重特異性抗体」という用語は、２つの抗原結合部位を持つ小さな抗体断片を表し、その断片は、同じポリペプチド鎖（ＶＨ－ＶＬ）の軽鎖可変領域（ＶＬ）に結合している重鎖可変領域（ＶＨ）を含む。同一鎖上で２つのドメイン間の対形成を可能にするには短すぎるリンカーを使用することにより、ドメインは、もう１つの鎖の相補的ドメインと強制的に対になり、２つの抗原結合部位を作る。二重特異性抗体は、例えば、欧州特許第４０４，０９７号；国際公開第９３／１１１６１号；および、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)に、より詳細に記載されている。

【０２０５】

ワクチボディ（Vaccibodies）。本発明のある態様において、抗ＣＤ２０抗体はワクチボディ（vaccibodies）である。ワクチボディ（Vaccibodies）は、二量体ポリペプチドである。ワクチボディ（vaccibody）のそれぞれの単量体は、ヒンジ領域とＣｇ３ドメインを介して第２ｓｃＦｖに結合しているＡＰＣ上の表面分子に特異性を持つｓｃＦｖから成る。本発明の他の態様において、ｓｃＦｖの１つとして抗ＣＤ２０抗体断片を含むワクチボディ（Vaccibodies）を使用して、破壊しようとするＢ細胞と、ＡＤＣＣを媒介するエフェクター細胞を並置することができる。例えば、Bogenらによる、米国特許出願公開第２００４０２５３２３８号を参照のこと。

【０２０６】

線状抗体。本発明のある態様において、抗ＣＤ２０抗体は、線状抗体である。線状抗体は、一対の抗原結合部位領域を形成する、一対のタンデムＦｄセグメント（ＶＨ－ＣＨ１－ＶＨ－ＣＨ１）を含む。線状抗体は、二重特異性でも、単一特異性でもあってもよい。線状抗体の非限定的な例は、例えば、Zapata et al., Protein Eng., 8(10): 1057-1062 (1995)に開示されている。

【０２０７】

親抗体。本発明のある態様において、抗ＣＤ２０抗体は親抗体である。「親抗体」は、本明細書に開示される変化した抗体／突然変異体抗体と比較して、１つまたは複数のその超可変領域中または隣接した領域において、１つまたは複数のアミノ酸残基が欠如または欠失しているアミノ酸配列を含む抗体である。従って、親抗体は、本明細書に開示される抗体突然変異体の対応する超可変領域より短い超可変領域を持つ。親ポリペプチドは未変性配列（すなわち、天然の）抗体（天然の対立遺伝子変異型を含む）、または天然配列に、既存のアミノ酸配列の改変（他の挿入、欠失および／または置換など）を持つ抗体を含んでもよい。好ましくは、親抗体はヒト化抗体またはヒト抗体である。

【０２０８】

抗体断片。「抗体断片」は、全長抗体の一部、一般的には、抗原結合性領域、またはその可変領域を含む。抗体断片の例としては、とりわけ、Ｆａｂ、Ｆａｂ’、Ｆ（ａｂ’）２、およびＦｖ断片；二重特異性抗体；線状抗体；単鎖抗体分子；および、抗体断片から形成された多選択性抗体などが挙げられる。

【０２０９】

従来は、インタクトな抗体をタンパク分解することにより断片を得ていた（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 24:107-117 (1992)およびBrennan et al., Science, 229:81 (1985)を参照のこと）。しかし現在は、組み換え型宿主細胞によって断片を直接産生することができる。例えば、本明細書で論じられているように、抗体断片を抗体ファージライブラリから単離することができる。あるいは、Ｆａｂ’－ＳＨ断片を、大腸菌（E.coli）から直接回収し、Ｆ（ａｂ’）２断片を形成するように化学的に結合させることができる。(Carter et al., Bio Technology, 10:163-167 (1992))。もう１つのアプローチによれば、Ｆ（ａｂ’）２断片を、組み換え型宿主細胞を培養することにより、直接単離することもできる。本明細書の詳細な教示があれば、抗体断片を生成するための他の技術も、当業者には明らかである。他の態様において、好ましい抗体は単鎖Ｆｖ断片（ｓｃＦｖ）である。例えば、国際公開第９３／１６１８５号を参照のこと。ある態様においては、抗体はＦａｂ断片ではない。

【０２１０】

二重特異性抗体。二重特異性抗体は、少なくとも２つの異なるエピトープに対する結合特異性を有する抗体である。例示的な二重特異性抗体は、ＣＤ２０の２つの異なるエピトープと結合し得る。他のそのような抗体は、ＣＤ２０と結合し、さらに第二抗原とも結合し得る。あるいは、ＣＤ２０結合アームは、標的への細胞防御機構に集中するために、Ｔ細胞受容体分子（例えばＣＤ２またはＣＤ３）などの白血球上のトリガー分子、またはＩｇＧ（ＦｃγＲ）のためのＦｃ受容体に結合するアームと結合し得る。二重特異性抗体は、細胞傷害性薬物を標的に局在化するためにも使用し得る。これらの抗体は、細胞マーカー結合アームおよび細胞傷害性薬物（例えば、サポリン、抗インターフェロンα、ビンカアルカロイド、リシンＡ鎖、メトラ・エキセート（methola-exate）、または放射性同位元素ハプテン）を結合するアームを持つ。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片（例えば、Ｆ（ａｂ’）：二重特異性抗体）として調製し得る。

【０２１１】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当分野において公知である。例えば、Millstein et al., Nature, 305:537-539 (1983); Traunecker et al., EMBO J., 10:3655-3659 (1991); Suresh et al., Methods in Enzymology, 121:210 (1986); Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992); Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993); Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994);米国特許第４,４７４,８９３号；同第４,７１４,６８１号；同第４,９２５,６４８号；同第５,５７３,９２０号；同第５,６０１,８１号；同第９５,７３１,１６８号； 同第４,６７６,９８０号；および同第４,６７６,９８０号、国際公開第９４／０４６９０号；同第９１／００３６０号；同第９２／２００３７３号；同第９３／１７７１５号；同第９２／０８８０２号；欧州特許第０３０８９号、および米国特許出願公開第２００９／００４８１２２号を参照のこと。

【０２１２】

本発明のある態様において、組成物および方法は、Daniel et al., Blood, 92:4750-4757 (1998)に記載されている二重特異性抗体などの、Ｔ細胞受容体のヒトＣＤ２０およびＣＤ３イプシロン鎖に特異性を持つ二重特異性マウス抗体またはその断片、および／またはその複合体をふくむ。本発明の組成物および方法の抗ＣＤ２０抗体またはその断片および／またはその複合体が二重特異的である好ましい態様において、抗ＣＤ２０抗体は、ヒト抗体またはヒト化抗体であり、ヒトＣＤ２０およびＴ細胞のエピトープに対する特異性を有し、または、例えば、単球／マクロファージ、および／またはＮＫ細胞などのヒトエフェクター細胞に結合して細胞死をもたらすことができる。

【０２１３】

抗体結合親和性

【０２１４】

本発明のある態様において、抗ＣＤ２０抗体を改変して、ＣＤ２０およびその抗原性断片に対する結合親和性を変化させることができる。結合特性は、例えば酵素免疫測定法（

ＥＬＩＳＡ）、または放射免疫測定法（ＲＩＡ））、または速度法（例えばＢＩＡＣＯＲＥ（商標）による分析など）の、当分野で公知の多彩なｉｎ　ｖｉｔｒｏアッセイによって決定し得る。一般的に、低ＫＤを有する結合分子が好ましいことが理解されている。

【０２１５】

本発明の１つの態様において、抗体および抗体断片は、ＣＤ２０とその抗原性断片と、10^{-5}Ｍ未満、または10^{-6}Ｍ未満、または10^{-7}Ｍ未満、または10^{-8}Ｍ未満、または10^{-9}Ｍ未満、または10^{-10}Ｍ未満、または10^{-11}Ｍ未満、または10^{-12}Ｍ未満、または10^{-13}Ｍの解離定数またはＫＤまたはK_d（k_{off}/k_{on}）で特異的に結合する。

【０２１６】

１つの態様において、本発明の抗体または断片は、ＣＤ２０および／またはその抗原性断片と、$1x10^{-3}s^{-1}$未満、または$3x10^{-3}s^{-1}$未満のK_{off}で結合する。他の態様においては、抗体は、ＣＤ２０およびその抗原性断片と、$10^{-3}s^{-1}$未満、$5x10^{-3}s^{-1}$未満、$10^{-4}s^{-1}$未満、$5x10^{-4}s^{-1}$未満、$10^{-5}s^{-1}$未満、$5x10^{-5}s^{-1}$未満、$10^{-6}s^{-1}$未満、$5x10^{-6}s^{-1}$未満、$10^{-7}s^{-1}$未満、$5x10^{-7}s^{-1}$未満、$10-8s^{-1}$未満、$5x10^{-8}s-1$未満、$10^{-9}s^{-1}$未満、$5x10^{-9}s^{-1}$未満、または$10^{-10}s^{-1}$未満のK_{off}で結合する。

【０２１７】

もう１つの態様において、本発明の抗体または断片は、ＣＤ２０および／またはその抗原性断片と、少なくとも$10^{5}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$5x10^{5}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$10^{6}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$5x10^{6}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$10^{7}M^{-1}s^{-1}$、少なくとも$5x10^{7}M^{-1}s^{-1}$、または少なくとも$10^{8}M^{-1}s^{-1}$、または少なくとも$10^{9}M^{-1}s^{-1}$の会合速度定数またはk_{on}比で結合する。

【０２１８】

当業者は、本発明の複合体が、本明細書に記載されるものと同じ特性を持つことを理解する。

【０２１９】

抗体ｐＩおよびＴｍ

【０２２０】

本発明のある態様において、抗ＣＤ２０抗体を改変して、それらの等電点（ｐＩ）を変化させることができる。抗体は、すべてのポリペプチドと同様に、一般的にポリペプチドが実効電荷をもたないｐＨとして定義される、ｐＩを有する。タンパク質の溶解度は、典型的には、溶液のｐＨがタンパク質の等電点（ｐＩ）と同じである時最も低いことが、当分野において公知である。本明細書で使用されるとおり、ｐＩ値は、主な荷電形状のｐＩとして定義されている。タンパク質のｐＩは、等電点電気泳動、および多彩なコンピュータ・アルゴリズムを含む多様な方法によって決定し得るが、これらに限定されない（例えば、Bjellqvist et al., 1993, Electrophoresis, 14:1023を参照のこと）。さらに、抗体のＦａｂドメインの融解温度（Ｔｍ）は、抗体の熱安定性の良好な指標と成り得、有効期間の指標も提供し得る。より低いＴｍは、より高い凝集性／より低い安定性を示し、一方より高いＴｍはより低い凝集性／より高い安定性を示す。従って、ある態様において、より高いＴｍを有する抗体が好ましい。タンパク質のドメイン（例えば、ＦａｂドメインのＴｍは、例えば、示差走査熱量測定などの、当分野で公知のいかなる標準的方法を使用することによっても測定し得る。（例えば、Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 78:394-404; Vermeer et al., 2000, Biophys. J. 79: 2150-2154を参照のこと）。

【０２２１】

従って、本発明のさらなる非排他的態様は、特定の等電点（ｐＩ）または融解温度（Ｔｍ）などの、ある好ましい生化学特性を有する改変された抗体も包含する。

【０２２２】

より具体的には、１つの態様において、本発明の改変された抗体は、５．５～９．５の

範囲のｐＩを有する。さらにもう１つの具体的な態様においては、本発明の改変された抗体は、約５．５～約６．０、または約６．０～約６．５、または約６．５～約７．０、または約７．０～約７．５、または約７．５～約８．０、または約８．０～約８．５、または約８．５～約９．０、または約９．０～約９．５の範囲のｐＩを有する。他の具体的な態様においては、本発明の改変された抗体は、５．５～６．０、または６．０～６．５、または６．５～７．０、または７．０～７．５、または７．５～８．０、または８．０～８．５、または８．５～９．０、または９．０～９．５の範囲のｐＩを有する。さらにより具体的には、本発明の改変された抗体は、少なくとも５．５、または少なくとも６．０、または少なくとも６．３、または少なくとも６．５、または少なくとも６．７、または少なくとも６．９、または少なくとも７．１、または少なくとも７．３、または少なくとも７．５、または少なくとも７．７、または少なくとも７．９、または少なくとも８．１、または少なくとも８．３、または少なくとも８．５、または少なくとも８．７、または少なくとも８．９、または少なくとも９．１、または少なくとも９．３、または少なくとも９．５のｐＩを有する。他の具体的な態様においては、本発明の改変された抗体は、少なくとも約５．５、または少なくとも約６．０、または少なくとも約６．３、または少なくとも約６．５、または少なくとも約６．７、または少なくとも約６．９、または少なくとも約７．１、または少なくとも約７．３、または少なくとも約７．５、または少なくとも約７．７、または少なくとも約７．９、または少なくとも約８．１、または少なくとも約８．３、または少なくとも約８．５、または少なくとも約８．７、または少なくとも約８．９、または少なくとも約９．１、または少なくとも約９．３、または少なくとも約９．５のｐＩを有する。

【０２２３】

抗体中のイオン化可能な残基の数と位置を変化させることにより溶解度を最適化し、ｐｌを調製することが可能である。例えば、ポリペプチドのｐＩは、適切なアミノ酸の置換を起こすことによって、（例えば、リジンなどの荷電したアミノ酸で、アラニンなどの非荷電の残基を置換することにより）操作することができる。いかなる特定の理論にも拘束されることを望まないが、前記抗体のｐＩの変化をもたらす抗体のアミノ酸置換は、抗体の溶解度および／または安定性を改善し得る。当業者は、特定の抗体が所望のｐＩを達成するために、どのアミノ酸置換が最も適切であるかを理解するだろう。１つの態様において、ｐＩを変化させるために、本発明の抗体において置換を起こす。ＦｃγＲへの変化した結合をもたらすＦｃ領域の置換（スプラと記載）が、ｐＩの変化をももたらすことは、具体的に考慮される。もう１つの態様において、Ｆｃ領域の置換は、ＦｃγＲ結合における所望の変化、およびいかなる所望のｐＩの変化の双方に影響を与えるように、具体的に選ばれる。

【０２２４】

１つの態様において、本発明の改変された抗体 は、６５℃～１２０℃の範囲のＴｍを有する。具体的な態様において、本発明の改変された抗体は、約７５℃～約１２０℃、または約７５℃～約８５℃、または約８５℃～約９５℃、または約９５℃～約１０５℃、または約１０５℃～約１１５℃、または約１１５℃～約１２０℃の範囲のＴｍを有する。他の具体的な態様において、本発明の改変された抗体は、７５℃～１２０℃、または７５℃～８５℃、または８５℃～９５℃、または９５℃～１０５℃、または１０５℃～１１５℃、または１１５℃～１２０℃のＴｍを有する。さらに他の具体的な態様において、本発明の改変された抗体は、少なくとも約６５℃、または少なくとも約７０℃、または少なくとも約７５℃、または少なくとも約８０℃、または少なくとも約８５℃、または少なくとも約９０℃、または少なくとも約９５℃、または少なくとも約１００℃、または少なくとも約１０５℃、または少なくとも約１１０℃、または少なくとも約１１５℃、または少なくとも約１２０℃のＴｍを有する。さらに他の具体的な態様において、本発明の改変された抗体少なくとも６５℃、または少なくとも７０℃、または少なくとも７５℃、または少なくとも８０℃、または少なくとも８５℃、または少なくとも９０℃、または少なくとも９５℃、または少なくとも１００℃、または少なくとも１０５℃、または少なくとも１１０

℃、または少なくとも１１５℃、または少なくとも１２０℃のＴｍを有する。
【０２２５】
操作されたエフェクター機能
【０２２６】
本発明の抗ＣＤ２０抗体を、エフェクター機能に関して、例えば、がん、ＧＶＨＤまたは拒絶反応などのＢ細胞関連疾患の治療において抗体の有効性を高めるように改変する事は望ましくあり得る。例えば、システイン残基をＦｃ領域に導入し、それによって、この領域における鎖間ジスルフィド結合の形成を可能にすることができる。このようにして産生されたホモ二量体の抗体は、改善された内部移行能力、および／または増加した補体媒介性細胞殺害、および／または抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を有し得る。Caron et al., J. Exp Med., 176:1191-1195 (1992) and Shopes, B., J. Immunol., 148:2918-2922 (1992)を参照のこと。強化された活性をもつホモ二量体抗体は、Wolff et al., Cancer Research, 53:2560-2565 (1993)に記載される通り、ヘテロ二機能性のクロスリンカーを使用して調製することもできる。あるいは、二重のＦｃ領域を有し、それによって強化された補体溶解およびＡＤＣＣ能力を有する抗体を設計することもできる。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design, 3:219-230 (1989)を参照のこと。
【０２２７】
エフェクター機能を変化させるように、抗体のＦｃ領域を操作する他の方法は、当分野において公知である（例えば、Ｆｃ領域を改変することにより、ＦＣγＲＩＩＡに対する結合親和性と比較した、ＦｃγＲＩＩＢに対する結合親和性を強化すること記載しており、ともにKoenigらによる、米国特許出願公開第２００４０１８５０４５号およびＰＣＴ国際公開第２００４／０１６７５０号；また、ArmourらによるＰＣＴ国際公開第９９／５８５７２号；Idusogieらによる同９９／５１６４２号；およびDeoらによる米国特許第６,３９５,２７２号も参照のこと。これらの開示は本明細書にその全体が組み入れられている）。Ｆｃ領域を改変して、ＦｃγＲＩＩＢに対する結合親和性を減少させる方法もまた、当分野において公知である（例えば、ともにRavetchらによる、米国特許出願公開第２００１００３６４５９号、およびＰＣＴ国際公開第０１／７９２９９号。その開示は本明細書にその全体が組み入れられる）。野生型Ｆｃ領域と比較して、ＦｃγＲＩＩＩＡおよび／またはＦｃγＲＩＩＡに対する強化された結合親和性をもつ、変異型Ｆｃ領域を有する改変された抗体は、公知である（例えば、ともにRavetchらによる、米国特許出願公開第２００１００３６４５９号、およびＰＣＴ国際公開第０１／７９２９９号；その開示は本明細書にその全体が組み入れられている）。
【０２２８】
当分野で公知のＩｎ　ｖｉｔｒｏアッセイを使用して、本発明の抗ＣＤ２０抗体、組成物、複合体および方法が、例えば、本明細書に記載されるもののように、ＡＤＣＣを媒介可能かどうかを決定することができる。
【０２２９】
変異型Ｆｃ領域。本発明は、変異型Ｆｃ領域を含むタンパク質の製剤を提供する。すなわち、非天然のＦｃ領域、例えば、１つまたは複数の非天然のアミノ酸残基を含むＦｃ領域である。さらに、本発明の変異型Ｆｃ領域に包含されるのは、アミノ酸の欠失、付加、および／または改変を含むＦｃ領域である。
【０２３０】
本明細書で使用されるＦｃ領域は、最初の定域免疫グロブリンドメインを除いた抗体の定常領域を含む、ポリペプチドを含むということが理解されるだろう。従って、Ｆｃは、ＩｇＡ、ＩｇＤ、およびＩｇＧの最後の２つの定域免疫グロブリンドメイン、ＩｇＥおよびＩｇＭの最後の３つの定域免疫グロブリンドメイン、およびこれらドメインに対する柔軟なヒンジＮ－末端を表す。ＩｇＡおよびＩｇＭにおいては、ＦｃはＪ鎖を含んでもよい。ＩｇＧにおいては、Ｆｃは免疫グロブリンドメインＣγ２およびＣγ３（Ｃγ２およびＣγ３）、およびＣγ１（Ｃγ１）とＣγ２（Ｃγ２）間のヒンジを含む。Ｆｃ領域の境界は変化するが、ヒトＩｇＧ重鎖Ｆｃ領域は、通常、残基Ｃ２２６またはＰ２３０を、そ

のカルボキシル末端に含むと定義され、その番号付けは、Kabat et al. (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.)に記載される通り、ＥＵインデックスに基づく。「Kabat記載のＥＵインデックス」とは、Kabat et al.、supraに記載される、ヒトＩｇＧ１　ＥＵ抗体の残基の番号付けを表す。Ｆｃとは、隔離されたこの領域、または抗体、抗体断片との関係におけるこの領域、またはＦｃ融合タンパク質を表し得る。Ｆｃ変異タンパク質は、抗体、Ｆｃ融合物、またはＦｃ領域を含むいかなるタンパク質またはタンパク質ドメインであってもよい。Ｆｃの非天然型変異体である変異型Ｆｃ領域を含むタンパク質が、特に好ましい。多型はKabat２７０、２７２、３１２、３１５、３５６、および３５８を含むいくつかのＦｃ位置において観察されているが、これらに限定されず、従って、本配列と先行技術における配列には、わずかな差異が存在し得、当業者には、当教示に基づき理解されるだろう。

【０２３１】

本発明は、比較可能な分子（例えば、野生型Ｆｃ領域を有することを除いて同一なアミノ酸配列を有するタンパク質）と比べて、Ｆｃリガンド（例えば、Ｆｃ受容体、Ｃ１ｑ）に対する改変された結合特性を有するＦｃ変異タンパク質を包含する。結合特性の例としては、結合特異性、平衡解離定数（K_D）、解離および会合速度（K_{off}およびK_{on}）、結合親和性および／または結合活性が挙げられるが、これらに限定されない。低ＫＤを持つ結合分子（例えば、抗体などのＦｃ変異タンパク質）が、高ＫＤをもつ結合分子よりも好ましいことは、一般的に理解されている。しかし、いくつかの例においては、K_{on}またはK_{off}の値が、ＫＤの値よりも、より関連性があることがある。当業者は、所定の抗体応用において、どの反応速度パラメータが最も重要であるかを決定し得る。

【０２３２】

リガンドに対するＦｃ領域の親和性および結合特性は、Ｆｃ－ＦｃγＲ相互作用、すなわち、Ｆｃ領域のＦｃγＲとの特異的結合を決定するための、当分野で公知の多彩なｉｎｖｉｔｒｏアッセイの方法（生化学または免疫学に基づくアッセイ）により決定することができ、例としては平衡時法（例えば、酵素免疫測定法（ＥＬＩＳＡ）、または放射免疫測定法（ＲＩＡ））、または速度法（例えば、ＢＩＡＣＯＲＥ（商標）分析）、および間接結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー転移（ＦＲＥＴ）、ゲル電気泳動、およびクロマトグラフィー（例えば、ゲルろ過）などの他の方法が挙げられるが、これらに限定されない。これらおよび他の方法は、１つまたは複数の検査されている成分上の標識を利用することができ、および／または、発色法、蛍光法、発光法、または同位体標識法を含む多彩な検知方法も使用し得るが、これらに限定されない。結合親和性および速度法に関する詳細は、例えば、Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)に記載されている。

【０２３３】

例えば、１つまたは複数の正の制御因子（例えば、ＦｃγＲＩＩＩＡ）とのＦｃ結合を強化しつつ、負の制御因子ＦｃγＲＩＩＢとのＦｃ結合を未変化に保つか、または減少すらさせる改変が、ＡＤＣＣ活性を強化するためにはより好ましいだろう。あるいは、１つまたは複数の正の制御因子との結合を減少させ、および／またはＦｃγＲＩＩＢとの結合を強化した改変が、ＡＤＣＣ活性を減少するためには好ましいだろう。従って、結合親和性（例えば、平衡解離定数（ＫＤ））の比率は、Ｆｃ変異体のＡＤＣＣ活性が強化されたか、または減少したかを示すことができる。例えば、ＦｃγＲＩＩＩＡ／ＦｃγＲＩＩＢ平衡解離定数（ＫＤ）の比率の減少は、改善されたＡＤＣＣ活性に相関し、一方比率の増加は、ＡＤＣＣ活性の減少に相関する。さらに、Ｃ１ｑとの結合を強化した改変は、ＣＤＣ活性を強化するために好ましく、一方Ｃ１ｑとの結合を減少させた改変は、ＣＤＣ活性を減少させ、または除去するために好ましい。

【０２３４】

１つの態様において、本発明のＦｃ変異体は、比較可能な分子と比べて増加した親和性でＦｃγＲＩＩＩＡと結合する。もう１つの態様において、本発明のＦｃ変異体は、比較可能な分子と比べて、増加した親和性でＦｃγＲＩＩＩＡと結合し、未変化の結合親和性

でＦｃγＲＩＩＢと結合する。さらなるもう１つの態様において、本発明のＦｃ変異体は、比較可能な分子と比べて、増加した親和性でＦｃγＲＩＩＩＡと結合し、減少した親和性でＦｃγＲＩＩＢと結合する。さらにもう１つの態様において、本発明のＦｃ変異体は、比較可能な分子と比べて、減少したＦｃγＲＩＩＩＡ／ＦｃγＲＩＩＢ平衡解離定数（ＫＤ）の比率を有する。

【０２３５】

１つの態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子と比べて、１つまたは複数のＦｃリガンドに対する強化された結合をもつ。もう１つの態様において、変異タンパク質は、比較可能な分子のものより、少なくとも２倍、または少なくとも３倍、または少なくとも５倍、または少なくとも７倍、または少なくとも１０倍、または少なくとも２０倍、または少なくとも３０倍、または少なくとも４０倍、または少なくとも５０倍、または少なくとも６０倍、または少なくとも７０倍、または少なくとも８０倍、または少なくとも９０倍、または少なくとも１００倍、または少なくとも２００倍大きな、Ｆｃリガンドに対する親和性を持つ。具体的な態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、Ｆｃ受容体に対する強化された結合を有する。もう１つの具体的な態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、Ｆｃ受容体ＦｃγＲＩＩＩＡに対する強化された結合を有する。さらにもう１つの具体的な態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、Ｆｃ受容体ＦｃＲｎに対する強化された結合を有する。さらにもう１つの具体的な態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子と比べて、Ｃ１ｑに対する強化された結合を有する。

【０２３６】

もう１つの態様において、本発明のＦｃ変異体は、比較可能な分子と比べて、約２倍～約１０倍の間、または約５倍～約５０倍の間、または約２５倍～約２５０倍の間、または約１００倍～約５００倍の間、または約２５０倍～約１０００倍の間の減少した平衡解離定数（ＫＤ）を有する。もう１つの態様において、本発明のＦｃ変異体は、比較可能な分子と比べて、２倍～１０倍の間、または５倍～５０倍の間、または２５倍～２５０倍の間、または１００倍～５００倍の間、または２５０倍～１０００倍の間の減少した平衡解離定数（ＫＤ）を有する。具体的な態様において、Ｆ変異体は、比較可能な分子と比べて、少なくとも２倍、または少なくとも３倍、または少なくとも５倍、または少なくとも７倍、または少なくとも１０倍、または少なくとも２０倍、または少なくとも３０倍、または少なくとも４０倍、または少なくとも５０倍、または少なくとも６０倍、または少なくとも７０倍、または少なくとも８０倍、または少なくとも９０倍、または少なくとも１００倍、または少なくとも２００倍、または少なくとも４００倍、または少なくとも６００倍減少した、ＦｃγＲＩＩＩＡに対する平衡解離定数（ＫＤ）を有する。

【０２３７】

Ｆｃ領域を含むタンパク質の血清半減期は、ＦｃＲｎに対するＦｃ領域の結合親和性を増加させることにより、増加させることができる。１つの態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子と比べてより長い血清半減期を有する。

【０２３８】

「抗体依存性細胞傷害」または「ＡＤＣＣ」は、ある細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するＦｃ受容体（ＦｃＲｓ）上に結合した分泌されたＩｇが、これらの細胞傷害性エフェクター細胞を、抗原を有する標的細胞に特異的に結合させ、続いて細胞毒素により標的細胞を死滅させることを可能にする、細胞傷害性の１つの形態を表す。例えば、標的細胞の表面に向けられた高親和性ＩｇＧ抗体は、細胞傷害性細胞を「武装」し、そのような死滅をもたらす。標的細胞の溶解は細胞外のものであり、細胞と細胞との間の直接接触を必要とし、補体は関与しない。抗体に加えて、Ｆｃ領域を含む他のタンパク質、具体的には、抗原をもつ標的細胞に特異的に結合する能力を有するＦｃ融合タンパク質は、細胞媒介性細胞傷害に影響を与え得ることが考慮される。簡便性のために、融合タンパク質の活性の結果生じる細胞媒介性細胞傷害も、本明細書において、ＡＤＣＣ活性と呼ぶ。

【０２３９】

ＡＤＣＣによる標的細胞の溶解を媒介する、いかなる特定のＦｃ変異タンパク質の能力も検査することができる。ＡＤＣＣ活性を評価するために、抗原抗体複合体によって活性化され標的細胞の細胞溶解をもたらす免疫エフェクター細胞とともに、目的のＦｃ変異タンパク質を、標的細胞に添加する。細胞溶解は、一般的に、溶解した細胞からの標識の放出によって検知される（例えば、放射性基質、蛍光色素、または天然細胞内タンパク質）。そのようなアッセイに有用なエフェクター細胞の例としては、末梢血単核球（ＰＢＭＣ）およびナチュラルキラー（ＮＫ）細胞が挙げられる。ｉｎ ｖｉｔｒｏ ＡＤＣＣアッセイの具体例は、Wisecarver et al., 1985, 79:277-282; Bruggemann et al., 1987, J Exp Med, 166:1351-1361; Wilkinson et al., 2001, J Immunol Methods, 258:183-191; and Patel et al., 1995, J Immunol Methods, 184:29-38に記載されている。あるいは、または追加的に、目的のＦｃ変異タンパク質のＡＤＣＣ活性は、例えば、Clynes et al., 1998, PNAS USA, 95:652-656に記載されているもののような動物モデルにおいて、ｉｎ ｖｉｖｏで評価し得る。

【０２４０】

１つの態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子と比べて、強化されたＡＤＣＣ活性を有する。具体的な態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子のものよりも、少なくとも２倍、または少なくとも３倍、または少なくとも５倍、または少なくとも１０倍、または少なくとも５０倍、または少なくとも１００倍大きいＡＤＣＣ活性を有する。もう１つの具体的な態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、Ｆｃ受容体ＦｃγＲＩＩＩＡに対する強化された結合を有し、また、比較可能な分子と比べて、強化されたＡＤＣＣ活性を有する。他の態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子と比べて、強化されたＡＤＣＣ活性およびより長い血清半減期の両方を有する。

【０２４１】

「補体依存性細胞傷害」および「ＣＤＣ」は、補体の存在下での標的細胞の溶解を表す。補体活性化経路は、補体系（Ｃ１ｑ）の第一成分と、例えば抗体などの、同族の抗原と複合された分子との結合により開始される。補体活性化を評価するために、例えばGazzano-Santoro et al., 1996, J. Immunol. Methods, 202:163に記載されているようなＣＤＣアッセイを実施することができる。１つの態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子と比べて、強化されたＣＤＣ活性を有する。具体的な態様においては、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子のものより、少なくとも２倍、または少なくとも３倍、または少なくとも５倍、または少なくとも１０倍、または少なくとも５０倍、または少なくとも１００倍大きいＣＤＣ活性を有する。他の態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、比較可能な分子と比べて、強化されたＣＤＣ活性とより長い血清半減期の両方を有する。

【０２４２】

１つの態様において、本発明は、Kabat記載のＥＵインデックス番号２３４、２３５、２３６、２３９、２４０、２４１、２４３、２４４、２４５、２４７、２５２、２５４、２５６、２６２、２６３、２６４、２６５、２６６、２６７、２６９、２９６、２９７、２９８、２９９、３１３、３２５、３２６、３２７、３２８、３２９、３３０、３３２、３３３、および３３４番から成る群より選択される１つまたは複数の位置において、Ｆｃ領域が非天然のアミノ酸残基を含む、製剤を提供する。所望により、Ｆｃ領域は、当業者に公知の（例えば、米国特許第５，６２４，８２１号；同第６，２７７，３７５号；同第６，７３７，０５６号；ＰＣＴ国際公開第０１／５８９５７号；同第０２／０６９１９号；同第０４／０１６７５０号；同第０４／０２９２０７号；同第０４／０３５７５２号、および同第０５／０４０２１７号を参照のこと）、または本明細書に記載される通りの、付加的および／または選択的な位置に、非天然のアミノ酸残基を含み得る。

【０２４３】

特定の態様において、本発明は、Ｆｃ変異タンパク質の製剤であって、Ｆｃ領域がKabat記載のＥＵインデックス番号２３４Ｄ、２３４Ｅ、２３４Ｎ、２３４Ｑ、２３４Ｔ、２３４Ｈ、２３４Ｙ、２３４Ｉ、２３４Ｖ、２３４Ｆ、２３５Ａ、２３５Ｄ、２３５Ｒ、２３５Ｗ、２３５Ｐ、２３５Ｓ、２３５Ｎ、２３５Ｑ、２３５Ｔ、２３５Ｈ、２３５Ｙ、２

３５Ｉ、２３５Ｖ、２３５Ｆ、２３６Ｅ、２３９Ｄ、２３９Ｅ、２３９Ｎ、２３９Ｑ、２３９Ｆ、２３９Ｔ、２３９Ｈ、２３９Ｙ、２４０Ｉ、２４０Ａ、２４０Ｔ、２４０Ｍ、２４１Ｗ、２４１Ｌ、２４１Ｙ、２４１Ｅ、２４１Ｒ．２４３Ｗ、２４３Ｌ２４３Ｙ、２４３Ｒ、２４３Ｑ、２４４Ｈ、２４５Ａ、２４７Ｖ、２４７Ｇ、２５２Ｙ、２５４Ｔ、２５６Ｅ、２６２Ｉ、２６２Ａ、２６２Ｔ、２６２Ｅ、２６３Ｉ、２６３Ａ、２６３Ｔ、２６３Ｍ、２６４Ｌ、２６４Ｉ、２６４Ｗ、２６４Ｔ、２６４Ｒ、２６４Ｆ、２６４Ｍ、２６４Ｙ、２６４Ｅ、２６５Ｇ、２６５Ｎ、２６５Ｑ、２６５Ｙ、２６５Ｆ、２６５Ｖ、２６５Ｉ、２６５Ｌ、２６５Ｈ、２６５Ｔ、２６６Ｉ、２６６Ａ、２６６Ｔ、２６６Ｍ、２６７Ｑ、２６７Ｌ、２６９Ｈ、２６９Ｙ、２６９Ｆ、２６９Ｒ、２９６Ｅ、２９６Ｑ、２９６Ｄ、２９６Ｎ、２９６Ｓ、２９６Ｔ、２９６Ｌ、２９６Ｉ、２９６Ｈ、２６９Ｇ、２９７Ｓ、２９７Ｄ、２９７Ｅ、２９８Ｈ、２９８Ｉ、２９８Ｔ、２９８Ｆ、２９９Ｉ、２９９Ｌ、２９９Ａ、２９９Ｓ、２９９Ｖ、２９９Ｈ、２９９Ｆ、２９９Ｅ、３１３Ｆ、３２５Ｑ、３２５Ｌ、３２５Ｉ、３２５Ｄ、３２５Ｅ、３２５Ａ、３２５Ｔ、３２５Ｖ、３２５Ｈ、３２７Ｇ、３２７Ｗ、３２７Ｎ、３２７Ｌ、３２８Ｓ、３２８Ｍ、３２８Ｄ、３２８Ｅ、３２８Ｎ、３２８Ｑ、３２８Ｆ、３２８Ｉ、３２８Ｖ、３２８Ｔ、３２８Ｈ、３２８Ａ、３２９Ｆ、３２９Ｈ、３２９Ｑ、３３０Ｋ、３３０Ｇ、３３０Ｔ、３３０Ｃ、３３０Ｌ、３３０Ｙ、３３０Ｖ、３３０Ｉ、３３０Ｆ、３３０Ｒ、３３０Ｈ、３３２Ｄ、３３２Ｓ、３３２Ｗ、３３２Ｆ、３３２Ｅ、３３２Ｎ、３３２Ｑ、３３２Ｔ、３３２Ｈ、３３２Ｙ、および３３２Ａから成る群より選択される少なくとも１つの非天然のアミノ酸残基を含む、製剤を提供する。所望により、Ｆｃ領域は、付加的および／または選択的な、当業者に公知の非天然のアミノ酸残基を含み得る。（例えば、米国特許第５，６２４，８２１号；同６，２７７，３７５；６，７３７，０５６号；ＰＣＴ国際公開第０１／５８９５７号；同第０２／０６９１９号；同第０４／０１６７５０号；同第０４／０２９２０７号；同第０４／０３５７５２号、および同第０５／０４０２１７号を参照のこと）。

【０２４４】

もう一つの態様において、本発明は、Ｆｃ変異タンパク質の製剤であって、Ｆｃ領域が、Kabat記載のＥＵインデックス番号２３９、３３０および３３２から成る群より選択される１つまたは複数の位置に、少なくとも１つの非天然のアミノ酸を含む製剤を提供する。具体的な態様において、本発明は、Ｆｃ変異タンパク質の製剤であって、Ｆｃ領域が、Kabatに記載のＥＵインデックス番号２３９Ｄ、３３０Ｌ、および３３２Ｅから成る群より選択される、少なくとも一つの非天然のアミノ酸を含む製剤を提供する。所望により、Ｆｃ領域は、Kabat記載のＥＵインデックス番号２５２、２５４、および２５６から成る群より選択される１つまたは複数の位置に、付加的な非天然のアミノ酸をさらに含み得る。具体的な態様において、本発明は、Ｆｃ変異タンパク質の製剤であって、Ｆｃ領域が、Kabatに記載のＥＵインデックス番号２３９Ｄ、３３０Ｌ、および３３２Ｅから成る群より選択される、少なくともひとつの非天然のアミノ酸を含み、１つまたは複数の位置の少なくともひとつの非天然のアミノ酸が、Kabat記載のＥＵインデックス番号２５２Ｙ、２５４Ｔ、および２５６Ｅから成る群より選択される、製剤を提供する。

【０２４５】

１つの態様において、本発明のＦｃ変異体は、例えば、例示的なＦｃ変異体を開示している、Ghetie et al., 1997, Nat. Biotech. 15:637-40; Duncan et al, 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J. Immunol., 147:2657-2662; Lund et al, 1992, Mol. Immunol., 29:53-59; Alegre et al, 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl. Acad Sci USA, 92:11980-11984; Jefferis et al, 1995, Immunol Lett., 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J., 9:115-119; Jefferis et al, 1996, Immunol Lett., 54:101-104; Lund et al, 1996, J. Immunol., 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al, 2000, J. Immunol., 164:4178-4184; Reddy et al, 2000, J. Immunol., 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol., 200:16-26; Idusogie et al, 2001, J. Immunol., 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol. Chem., 276:6591-6604; Jefferis et al, 2002, Immunol

Lett., 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans., 30:487-490);米国特許第５，６２４，８２１号；同第５，８８５，５７３号；同第５，６７７，４２５号；同第６，１６５，７４５号；同第６，２７７，３７５号；同第５，８６９，０４６号；同第６，１２１，０２２号；同第５，６２４，８２１号；同第５，６４８，２６０号；同第６，５２８，６２４号；同第６，１９４，５５１号；同第６，７３７，０５６号；同第６，８２１，５０５号；同第６，２７７，３７５号；米国特許出願公開第２００４／０００２５８７号、およびＰＣＴ国際公開第９４／２９３５１号；同第９９／５８５７２号；同第００／４２０７２号；同第０２／０６０９１９号；同第０４／０２９２０７号；同第０４／０９９２４９号；および同第０４／０６３３５１号に開示されるものなどの、他の公知のＦｃ変異体と組み合わせることもできる。また、本発明は、欠失、付加、および／または改変を含むＦｃ領域を包含する。さらにＦｃ領域の他の改変／置換／付加／欠失が、当業者には容易に明白となるだろう。

【０２４６】

非天然のＦｃ領域を生成する方法は、当分野において公知である。例えば、アミノ酸置換および／または欠失は、部位特異的突然変異誘発法（例えば、Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82:488-492 (1985)）、PCR突然変異誘発法（例えば、Higuchi, in "PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications", Academic Press, San Diego, pp. 177-183 (1990)）、およびカセット変異導入法（例えば、Wells et al., Gene, 34:315-323 (1985)）を含む突然変異誘発法によって生成することができるが、これらに限定されない。好ましくは、部位特異的な突然変異誘発は、重複伸長ＰＣＲ法（例えば、Higuchi, in "PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification", Stockton Press, New York, pp. 61-70 (1989)）によって実施される。あるいは、重複伸長ＰＣＲ法（例えば、Higuchi, supra.）の技術は、いかなる所望の突然変異を標的配列（出発ＤＮＡ）に導入するためも使用することができる。例えば、重複伸長ＰＣＲ法のＰＣＲ一巡目は、標的配列を外側のプライマー（プライマー１）と内側の突然変異誘発プライマー（プライマー３）で増幅し、別々に第二の外側のプライマー（プライマー４）と内側のプライマー（プライマー２）で増幅することを含み、二つのＰＣＲセグメント（セグメントＡおよびＢ）を産生する。内側の突然変異誘発プライマー（プライマー３）は、所望の突然変異を特定する標的配列に対する不適正塩基対を含むよう設計される。二巡目においては、ＰＣＲ一巡目の生成物（セグメントＡおよびＢ）を、二つの外側のプライマー（プライマー１および４）を使用して、ＰＣＲにより増幅する。得られた全長ＰＣＲセグメント、（セグメントＣ）を、制限酵素で消化し、得られた制限酵素断片を適切なベクターにクローニングする。突然変異誘発の第一の工程として、出発ＤＮＡ（例えば、融合タンパク質、抗体または単にＦｃ領域をコードする）を、突然変異誘発ベクターに機能的にクローニングする。プライマーは、所望のアミノ酸置換を反映するように設計される。変異型Ｆｃ領域の生成に有用な他の例示的な方法は、当分野において公知である（例えば、米国特許第５,６２４,８２１号；同第５,８８５,５７３号；同第５,６７７,４２５号；同第６,１６５,７４５号；同第６,２７７,３７５号；同第５,８６９,０４６号；号６,１２１,０２２号；同第５,６２４,８２１号；同第５,６４８,２６０号；同第６,５２８,６２４号；同第６,１９４,５５１号；同第６,７３７,０５６号号；同第６,８２１,５０５号；同第６,２７７,３７５号；米国特許出願公開第２００４／０００２５８７号、およびＰＣＴ国際公開第９４／２９３５１号；同第９９／５８５７２号；同第００／４２０７２号；同第０２／０６０９１９号；同第０４／０２９２０７号；同第０４／０９９２４９号；同第０４／０６３３５１号を参照のこと。これらは参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。）

【０２４７】

いくつかの態様において、Ｆｃ変異タンパク質は、１つまたは複数の操作されたグリコフォーム、すなわち、Ｆｃ領域を含む分子に、共有結合的に結合した炭水化物組成物を含む。操作されたグリコフォームは、エフェクター機能を強化または減少させることを含む、多彩な目的に有用であるが、これらに限定されない。操作されたグリコフォームは、本

明細書に開示された方法および当業者に公知のいずれかの方法、例えば、操作されたまたは変異型の発現株を使用することによって、グリコシル化に影響ををを与える成長条件または培地を使用することによって、１つまたは複数の酵素、例えばＤＩＮ－アセチルグルコサミン転移酵素ＩＩＩ（ＧｎＴＩ１１）などとの同時発現によって、多彩な生物または多彩な生物由来の細胞株中にＦｃ領域を含む分子を発現させることによって、または、Ｆｃ領域を含む分子が発現した後に、炭水化物を改変することによって生成することができる。操作されたグリコフォームを生成するための方法は、当分野において公知であり、Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol., 17:176-180; Davies et al., 20017 Biotechnol Bioeng., 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol. Chem., 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol. Chem., 278:3466-3473)；米国特許第６，６０２，６８４号；米国特許出願番号第１０／２７７，３７０号；同第１０／１１３，９２９号；ＰＣＴ国際公開第００／６１７３９Ａ１号；同第０１／２９２２４６Ａ１号；同第０２／３１１１４０Ａ１号；同第０２／３０９５４Ａ１号；Potillegent（商標）technology (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); GlycoMAb（商標）glycosylation engineering technology (GLYCART（商標）biotechnology AG, Zurich, Switzerland)に記載されるものを含むが、これらに限定されない。また、例えば、国際公開第０００６１７３９号；ＥＡ０１２２９１２５号；米国特許出願第２００３０１１５６１４；Okazaki et al., 2004, JMB, 336: 1239-49も参照のこと。

【０２４８】

ポリヌクレオチド、ベクター、宿主セル、および組み換え方法

【０２４９】

本発明はさらに、本発明の抗体またはそのエピトープ結合性断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【０２５０】

本発明はまた、ＣＤ２０と結合することができ、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドと、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下でハイブリダイズするポリペプチドをコードするポリヌクレオチドであって、前記ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が、６ｘ　ＳＳＣ、０．５％　ＳＤＳ、５ｘ　Denhardt’s溶液、および１００μｇ／ｍｌの熱変性させたサケ精子ＤＮＡ中、６０℃で２時間のプレハイブリダイゼーション；６０℃で１８時間のハイブリダイゼーション；４ｘ　ＳＳＣ、０．５％　ＳＤＳ、０．１％　ピロリン酸ナトリウム中、６０℃で３０分間、２回洗浄し、２ｘ　ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳ中、６０℃で３０分間、２回洗浄することを含む、ポリヌクレオチドも包含する。

【０２５１】

当分野で公知の方法によって、ポリヌクレオチドを得、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定することができる。例えば、もし抗体のヌクレオチド配列が既知であれば、抗体をコードするポリヌクレオチドは、化学的に合成されたオリゴヌクレオチド（例えば、Kutmeier et al., 1994, BioTechniques 17:242に記載される通り）から構築することができ、その方法は簡単に言えば、抗体をコードする配列の一部を含む重複するオリゴヌクレオチドの合成、アニーリング、およびそれらオリゴヌクレオチドのライゲーション、次いでＰＣＲによる連結されたオリゴヌクレオチドの増幅を含む。

【０２５２】

抗体をコードする配列と適切な転写および翻訳制御信号を含む組み換え型ベクターを構築するための方法は、当分野において公知である。これらの方法としては、例えば、ｉｎ　ｖｉｔｒｏ組み換え型ＤＮＡ技術、合成技術、およびｉｎ　ｖｉｖｏ遺伝子組み換えなどが挙げられる。本発明は、従って、本発明の抗体分子、またはその重鎖または軽鎖、または重鎖または軽鎖可変領域、または、これらいずれかのエピトープ結合性断片をコードする、プロモーターに機能的に結合したヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。

【０２５３】

組み換え型ベクターを、通常の技術によって宿主細胞に移植し、次いで、トランスフェクトした細胞を通常の技術により培養して、本発明の抗体を得る。従って、本発明は、本発明の抗体またはそのエピトープ結合性断片をコードする、異種のプロモーターに機能的に結合したポリヌクレオチドを含む、宿主細胞を包含する。好ましい態様において、重鎖および軽鎖両方をコードするベクターは、全免疫グロブリン分子を発現させるために、宿主細胞中で同時発現し得る。

【０２５４】

種々の宿主発現ベクター系を利用して、本発明の抗体分子を発現させることができる。そのような宿主発現系は、目的のコード配列を生成しその後精製し得るビヒクルを表すが、また適切なヌクレオチドコード配列で形質転換または形質移入した際、本発明の抗体分子をｉｎ　ｓｉｔｕで発現し得る細胞も表す。これらは、抗体をコードする配列を含む組み換え型バクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡまたはコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換されたバクテリア（例えば、大腸菌(E.oli)および枯草菌（B.subtilis））などの微生物；抗体をコードする配列を含む組み換え型酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロマイセス属およびピキア属）；抗体をコードする配列を含む組み換え型ウィルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を感染させた昆虫細胞系；組み換え型ウィルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス（ＣａＭＶ）；タバコモザイクウイルス（ＴＭＶ））を感染させた、または抗体をコードする配列を含む組み換え型プラスミド発現ベクター（例えば、Ｔｉプラスミド）で形質転換した植物細胞系；または、哺乳類の細胞のゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）、または、哺乳類のウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス７．５Ｋプロモーター）由来のプロモーターを含む組み換え型発現構築体を有する哺乳類細胞系（例えば、ＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、３Ｔ３細胞）、を含むがこれらに限定されない。

【０２５５】

好ましくは、大腸菌(Escherichiacoli)などのバクテリア細胞、そしてより望ましくは、特に全組み換え型抗体分子を発現させるためには、真核細胞を、組み換え型抗体分子の発現のために使用する。例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（ＣＨＯ）などの哺乳類細胞と、ヒトサイトメガロウイルス由来の主要な中間初期遺伝子プロモーターエレメントなどのベクターを合わせたものは、抗体の効果的な発現系である（例えば、Foecking et al., 1986, Gene 45:101; Cockett et al., 1990, Bio/Technology 8:2に開示されるとおり）。

【０２５６】

組み換え型タンパク質の長期、高収率の生成のためには、安定した発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現する細胞株を設計することができる。ウイルスの複製起点を含む発現ベクターを使用するよりもむしろ、適切な発現制御要素（例えば、プロモーター、エンハンサー、転写ターミネータ、ポリアデニル化部位など）および選択可能なマーカーで制御されたＤＮＡで、宿主細胞を形質転換することができる。外来性ＤＮＡの導入に続いて、操作された細胞を、豊富化した培地で１～２日成長させておいてもよく、次いで選択培地に切り替える。組み換え型プラスミド中の選択可能なマーカーは選択への抵抗性を与え、細胞が染色体中にプラスミドを安定して統合し、成長して病巣を形成することを可能にし、その病巣を、次々に細胞株中にクローニングし、増殖させることができる。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を設計するために、有利に使用することができる。このような操作された細胞株は、抗体分子と直接的または間接的に相互作用する化合物のスクリーニングおよび評価において、特に有用であり得る。

【０２５７】

ひとたび本発明の抗体分子が組み換えにより発現したら、免疫グロブリン分子を精製するための当分野で公知のいかなる方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、特にプロテインＡ後の特異抗原に対してはアフィニティークロマトグラフィーによって、およびサイジングカラムク

ロマトグラフィー）、遠心分離、吸収率較差溶解度測定、またはタンパク質精製のためのいかなる他の標準的技術によっても、抗体分子を精製することができる。この点については、本開示において米国特許第７，５３８，１９５号が参照されており、その教示は参照によりその全体が本明細書に組み込まれている。

【０２５８】

もう一つの態様において、多様な抗体および抗体断片、ならびに擬態抗体を、ＣＤＲの特定の一組に隣接する可変領域および定常領域配列内で、突然変異、欠失および／または挿入により、容易に産生することができる。従って、例えば、異なる重鎖の置換によって、ＣＤＲの特定の一組に対し、異なるクラスの抗体が可能であり、それによって、例えば、ＩｇＧ１～４、ＩｇＭ、ＩｇＡ１～２、ＩｇＤ、ＩｇＥ抗体型およびアイソタイプを産生し得る。同様に、本発明の範囲に含まれる人工抗体を、ＣＤＲの特定の一組を完全に合成のフレームワーク内に埋め込むことにより、産生することができる。「可変(variable)」という用語は、本明細書において、抗体間で配列が異なる可変領域のある部分を記述するために使用され、それぞれの特定の抗体の抗原に対する結合と特異性において使用される。しかし、可変性は、通常、抗体の可変領域を通して均一には分布していない。典型的には、軽鎖および重鎖両方の可変領域において、相補性決定領域（ＣＤＲ）または超可変領域とよばれる３つのセグメントに集中している。より高度に保存された可変領域の部分は、フレームワーク（ＦＲ）と呼ばれる。重鎖および軽鎖の可変領域それぞれは、が主としてβシート構造をとる４つのフレームワーク領域を含み、これらは、環状に連結し、いくつかの場合においてはβシート構造の一部を形成する３つのＣＤＲによって連結される。各鎖中のＣＤＲはＦＲ領域によってごく近傍にまとめられ、他の鎖からのＣＤＲとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（例えば、E. A. Kabat et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest, fifth edition, 1991, NIHを参照のこと）。定常領域は、抗体の抗原との結合には直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害における抗体の関与などの、多彩なエフェクター機能を示す。

【０２５９】

ヒト化抗体、または他の哺乳類による非拒絶に適合させた抗体は、再表面化およびＣＤＲ移植などのいくつかの技術を使用して産生することができる。再表面化技術において、分子モデリング、統計的分析、および突然変異誘発を組み合わせることにより、可変領域の非ＣＤＲ表面を、標的宿主の既知抗体の表面に類似するように調整する。抗体の再表面化のための指針および方法、および異なる宿主内の抗体の免疫原性を減少させるための他の方法が、例えば、米国特許第５，６３９，６４１号に開示されており、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている。ＣＤＲ移植技術においては、マウスの重鎖および軽鎖ＣＤＲを、完全にヒト型のフレームワーク配列中に移植する。

【０２６０】

本発明は、また、本明細書に記載される抗体の機能的等価物も包含する。機能的等価物は、抗体の結合特性に匹敵する結合特性を持ち、例えば、キメラ化抗体、ヒト化抗体、および単鎖抗体ならびにその断片などを含む。そのような機能的等価物を産生する例示的な方法が、ＰＣＴ国際出願第９３／２１３１９号、欧州特許出願第２３９，４００号；ＰＣＴ国際出願第８９／０９６２２号；欧州特許出願第３３８，７４５号；および同第３３２，４２４号に開示されており、それぞれの全体が参照により組み入れられている。

【０２６１】

機能的等価物は、本発明の抗体の可変領域または超可変領域のアミノ酸配列と実質的に同じであるアミノ酸配列をもつポリペプチドを含む。アミノ酸配列に用いた「実質的に同じである」は、本明細書において、Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988)に従ってＦＡＳＴＡ調査法により決定される通り、もう１つのアミノ酸配列に対して、少なくとも約９０％、そしてより好ましくは少なくとも約９５％、９６％、９７％、９８％、および９９％の配列同一性をもつ配列として定義される。

【０２６２】

キメラ化抗体は、好ましくは、ヒト抗体定常領域に実質的または独占的に由来する定常

領域を有し、ヒト以外の哺乳類由来の可変領域の配列に実質的または独占的に由来する可変領域を有する。抗体のヒト化形態は、例えばマウス抗体の相補性決定領域を、ヒトフレームワークドメイン中に置換することによって作成される。例えば、ＰＣＴ国際公開第９２／２２６５３号。ヒト化抗体は好ましくは、対応するヒト抗体領域に実質的または独占的に由来する相補性決定領域（ＣＤＲ）、およびヒト以外の哺乳類に実質的または独占的に由来するＣＤＲ以外に、定常領域および可変領域を有する。

【０２６３】

機能的等価物はまた、単鎖抗体（ｓｃＦｖｓ）としても知られる単鎖抗体断片をも含む。これらの断片は、１つまたは複数の相互接続リンカーを伴いまたは伴わずに、抗体可変軽鎖配列（V_L）の少なくとも１つの断片に係留された（tethered）、抗体可変重鎖アミノ酸配列（V_H）の少なくとも１つの断片を含む。そのようなリンカーは、単鎖抗体断片が由来する全抗体の標的分子結合特異性を維持するように、（V_L）および（V_H）ドメインがひとたび結合されると、それらの適切な３次元フォールディングが確実に生じるように選択された、短く柔軟なペプチドであってもよい。一般的に、（V_L）または（V_H）配列のカルボキシル末端は、そのようなペプチドリンカーによって、相補的な（V_L）および（V_H）配列のアミノ酸末端に、共有結合的に連結されていてもよい。単鎖抗体断片は、分子クローニング、抗体ファージディスプレイライブラリー、または同様の技術によって産生することができる。これらのタンパク質は、真核細胞、または、バクテリアを含む原核細胞のいずれかにおいて産生することができる。

【０２６４】

単鎖抗体断片は、本明細書に記載されるインタクトな抗体の少なくとも１つの可変領域または相補性決定領域（ＣＤＲ）を有するが、それらの抗体の定常領域のいくらかまたはすべてを欠いている。これらの定常領域は、抗原結合には必要ではないが、インタクトな抗体の構造の主要な部分を構成する。従って、単鎖抗体断片は、定常領域の一部または全てを含む抗体の使用に付随する問題のいくつかを克服し得る。例えば、単鎖抗体断片には、生体分子と重鎖定常領域間の不必要な相互作用、または他の不必要な生物活性がないことが多い。その上、単鎖抗体断片は、インタクトな抗体または全抗体よりもかなり小さく、従ってインタクトな抗体よりもより大きな毛細血管透過性を有し得るため、単鎖抗体断片はより効率的に局在化しかつ標的抗原結合部位に結合することが可能になる。また、抗体断片は原核細胞において比較的大規模に産生することができ、そのようにしてそれらの産生を促進することができる。さらに、単鎖抗体断片は比較的サイズが小さいため、インタクトな抗体よりも、レシピエントにおける免疫応答を誘発しにくい。

【０２６５】

本明細書に記載される、抗ＣＤ２０抗体、およびその再表面化したまたはヒト化変異体のためのアミノ酸および核酸配列に関する知識を使用して、ヒトＣＤ２０にも結合する多数の抗体を開発することができる。いくつかの研究が、抗体の一次配列の知識に基づき、抗体の配列中の様々な位置に、１つまたは複数のアミノ酸変化を導入する事による、結合および発現レベルなどのその特性における効果を調査している（例えば、Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254, 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539）。

【０２６６】

これらの研究において、オリゴヌクレオチドによって媒介される部位特異的突然変異誘発、カセット変異導入法、エラープローンＰＣＲ、ＤＮＡシャフリング、または大腸菌(E.oli)の突然変異誘発株などの方法を使用して、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、またはフレームワーク領域中の重鎖および軽鎖遺伝子の配列を変化させることにより、一次抗体の変異体が生成された（Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Chapter 16, pp. 277-291, in "Phage Display of Peptides and Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press）。一次抗体の配列を変化させるこれらの方法は、結果として、改善された二次抗体の親和性をもたらした（例

えば、Gram, H. et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. and Riechmann, L., 1996, Immunotechnolgy, 2, 169-179; Thompson, J. et al., 1996, J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short, M. K. et al., 2002, J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, J. Biol. Chem., 276, 27622-27628）。

【０２６７】

抗体の１つまたは複数のアミノ酸残基を変化させる同様の定方向戦略（directed strategy）により、本発明に記載される抗体配列は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている特許出願公開第２００９０２４６１９５号に記載される方法などの、改善された機能をもつ抗ＣＤ２０抗体の開発に使用することができる。

【０２６８】

免疫複合体

【０２６９】

本発明はまた、薬剤またはプロドラッグに結合または接合した、抗ＣＤ２０抗体、抗体断片、機能的等価物、改善された抗体、および、本明細書に記載されるそれらの態様を含む、複合体（本明細書において免疫複合体とも呼ぶ）に関する。適切な薬剤またはプロドラッグは当分野において公知である。好ましい薬剤またはプロドラッグは、細胞傷害性薬物である。本発明の細胞毒性複合体に使用された細胞傷害性薬物は、細胞を死滅に至らせる、または細胞死を誘発する、または若干のあきらかでない方法で細胞生存性を減少させる、いかなる化合物であってもよく、例えば、メイタンシノイド類およびメイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン類、タキソイド類、ＣＣ－１０６５およびＣＣ－１０６５類似体、デュオカルマイシン類およびデュオカルマイシン類似体、カリチアマイシン類などのエンジイン類、アウリスタチン類を含むドラスタチンおよびドラスタチン類似体、トメイマイシン誘導体、レプトマイシン誘導体、メトトレキサート、シスプラチン、カルボプラチン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンＣ、クロラムブシルおよびモルフォリノドキソルビシンを含む。より好ましい細胞傷害性薬物はメイタンシノイド類およびメイタンシノイド類似体、ベンゾジアゼピン類、タキサン類、ＣＣ－１０６５およびＣＣ－１０６５類似体である。特に好ましいのは、メイタンシノイド類およびメイタンシノイド類似体であり、それらの多くが、以下に記載されている。米国特許出願公開第２００７００４８３１４号、同第２００６０２３３８１４号、同第２００８０００３６５２号、同第２００６０１５５１１０号、同第２００６０１２８９７０号、同第２００９０１８２０３８号、同第２００９００４２８３７号、同第２００８０２３３６１８号、同第２００８０１１９５５８号、同第２００６００９９２３５号、同第２００５０２７２７２７号、同第２００５０２０３１７４号、同第２００５０１１２７２６号、同第２００６０１８２７５０号、同第２００９０２０２５３６号、同第２００９０１４２３６１号、同第２００８０２４９０８５号、同第２００８０２２６６５９号、同第２００８０１７１８６５号、同第２００８０１７１８５６号、同第２００８０１７１０４０号、同第２００８０１４５３７４号、同第２００８０１１４１５３号、同第２００７０２７０５８５号、同第２００７０２６９４４７号、同第２００７０２６４２６６号、同第２００７０００９５４１号、同第２００７０００９５４０号、同第２００７０００９５３９号、同第２００６０１６７２４５号、同第２００６０１２７４０７号、同第２００６００８４１４１号、同第２００５０２７６８１２号、同第２００５０１６９９３３号、同第２００５０１５２９１３号、同第２００５０１１３５７１号、同第２００５０００３５１３号、同第２００４０２４１１７４号、同第２００４０２３５８４０号、同第２００４０１２０９４９号、同第２００４００１４９８０号、同第２００３０１５７６９４号、同第２００２０１５６３１８号、同第２００２０１５６２７４号、同第２００２０００１５８７号。これらの内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている。

【０２７０】

薬剤またはプロドラッグを抗体または機能的等価物と結合させるために、結合基を使用

して、そのような複合体を調製することができる。適切な結合基は当分野において公知であり、例えば、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸不安定基、感光性不安定基、ペプチダーゼ不安定基、およびエステラーゼ不安定基などが挙げられる。

【０２７１】

薬剤またはプロドラッグは、例えば、ジスルフィド結合により抗ＣＤ２０抗体またはその断片に結合し得る。リンカー分子または架橋剤は、抗ＣＤ２０抗体またはその断片と反応し得る反応性化学基を含む。細胞結合剤との反応のための好ましい反応性化学基は、Ｎ－スクシンイミジルエステル類およびＮ－スルホスクシンイミジルエステル類である。さらに、リンカー分子は反応性化学基、好ましくは、薬剤と反応してジスルフィド結合を形成し得るジチオピリジル基を含む。特に好ましいリンカー分子としては、例えば、Ｎ－スクシンイミジル　３－（２－ピリジルジチオ）プロピオナート（ＳＰＤＰ）（例えば、Carlsson et al., Biochem. J., 173: 723-737 (1978)を参照のこと）、Ｎ－スクシンイミジル　４－（２－ピリジルジチオ）ブタノアート（ＳＰＤＢ）（例えば、米国特許第４，５６３，３０４号を参照のこと）、Ｎ－スクシンイミジル　４－（２－ピリジルジチオ）２－スルホブタノアート（ｓｕｌｆｏ－ＳＰＤＢ）（米国特許出願公開第２００９０２７４７１３号を参照のこと）、Ｎ－スクシンイミジル　４－（２－ピリジルジチオ）ペンタノアート（ＳＰＰ）（例えば、CAS Registry number 341498-08-6を参照のこと）、２－イミノチオラン、またはアセチルコハク酸無水物、および、参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、米国特許第６，９１３，７４８号に記載されるもののような、他の反応性架橋剤が挙げられる。例えば、その開示が参照によりその全体が本明細書に組み込まれている、米国特許第４，５６３，３０４号；Carlsson et al, Biochem. J., 173:723-737 (1978); Blattler et al, Biochem., 24:1517-1524 (1985); Lambert et al, Biochem., 22:3913-3920 (1983); Klotz et al, Arch. Biochem. Biophys., 96:605 (1962); and Liu et al, Biochem., 18:690 (1979), Blakey and Thorpe, Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals, 1:1-16 (1988); Worrell et al, Anti-Cancer Drug Design, 1:179-184 (1986)を参照のこと。例えば、抗体または細胞結合剤は、架橋試薬によって改変することができ、そのようにして誘導された、抗体または細胞結合剤含有の遊離又は保護チオール基を、次いでジスルフィド含有またはチオール含有メイタンシノイドと反応させ、複合体を産生する。複合体は、ＨＰＬＣ、サイズ排除、吸着、イオン交換および親和性捕捉、透析またはタンジェント流ろ過を含む、クロマトグラフィーによって精製することができるが、これらに限定されない。

【０２７２】

本発明のもう１つの態様において、抗ＣＤ２０抗体は、免疫複合体の力価、溶解度、または有効性を強化するために、ジスルフィド結合とポリエチレングリコールスペーサーを介して細胞傷害性薬物に結合している。そのような切断可能な親水性リンカーが、国際公開第２００９／０１３４９７６号に記載されている。このリンカー設計の付加的な利点は、抗体－薬物複合体の、所望の高い単量体比率および最小の凝集である。この態様において具体的に考慮されるのは、ポリエチレングリコールスペーサー（$(CH_2CH_2O)_{n=1-14}$）を有し、薬剤負荷が２～８の狭い範囲である、ジスルフィド基（－Ｓ－Ｓ－）を介して細胞結合剤と結合した薬剤の複合体が記載されているが、それらは、がん細胞に対する比較的高い潜在生物活性を示し、最小のタンパク質凝集で高い複合収率(conjugation yield)と高い単量体の比率という、所望の生化学的性質を有する、ということである。

【０２７３】

この態様において具体的に考慮されるのは、式（Ｉ）：

$CB-[X_1-(-CH_2-CH_2O-)_n-Y-D]_m$　　（Ｉ）

で表される抗ＣＤ２０抗体薬剤複合体、または式（Ｉ’）：

$[D-Y-(-CH_2-CH_2O-)_n-X_1]_m-CB$　　（Ｉ’）

で表される複合体であって、式中、

ＣＢは抗ＣＤ２０抗体または断片を表し；

Ｄは薬剤を表し；
Ｘは、チオエーテル結合、アミド結合、カルバマート結合、またはエーテル結合を介して細胞結合剤に結合した、脂肪族、芳香族、または複素環の単位を表し；
Ｙは、ジスルフィド結合を介して薬剤に結合した、脂肪族、芳香族、または複素環の単位を表し；
ｌは０または１であり；
ｍは２～８の整数であり；および
ｎは１～２４の整数である。
より好ましくは、ｍは２～６の整数である。
また、さらにより好ましくは、ｍは３～５の整数である。

【０２７４】
また、より好ましくは、ｎは２～８の整数である。あるいは、例えば米国特許第６，４４１，１６３号、および同７，３６８，５６５号に記載されるとおり、薬剤をまず改変することにより、細胞結合剤と反応するのに適切な反応性エステルを導入することもできる。細胞結合剤をもつ活性化したリンカー部分を含むこれらの薬剤の反応は、もう一つの細胞結合剤薬剤複合体の製造方法を提供する。例えば、米国特許第６，７１６，８２１号に記載される通り、メイタンシノイド類もまた、ＰＥＧ結合基を使用して、抗ＣＤ２０抗体または断片に結合させることができる。これらの切断不可能なＰＥＧ結合基は、水および非水性溶媒のどちらにも可溶であり、１つまたは複数の細胞傷害性薬物を細胞結合剤と結合させるために使用することができる。例示的なＰＥＧ結合基としては、リンカーの両端において、一端では機能性のスルフヒドリルまたはジスルフィド基、他の一端では活性エステルを介して、細胞傷害性薬物および細胞結合剤と反応するヘテロ二機能性ＰＥＧリンカーが挙げられる。ＰＥＧ結合基を使用した、細胞毒性複合体合成の一般的な例としては、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている、米国特許第６，７１６，８２１号を再度参照されたい。合成は、細胞結合剤ををもつ反応性ＰＥＧ部分を有する、１つまたは複数の細胞傷害性薬物の反応から始まり、結果として各反応性ＰＥＧ部分の末端活性エステルが、細胞結合剤のアミノ酸残基によって置換され、ＰＥＧ結合基を介して共有結合的に細胞結合剤に結合した１つまたは複数の細胞傷害性薬物を含む細胞毒性複合体が産生される。あるいは、細胞結合を二機能性のＰＥＧ架橋剤で改変することにより、反応性のジスルフィド部分（例えばピリジルジスルフィドなど）を導入し、次いでチオール含有メイタンシノイドで処理することにより複合体を得ることができる。もう一つの方法においては、細胞結合を、二機能性のＰＥＧ架橋剤で改変することにより、チオール部分を導入し、次いで反応性ジスルフィド含有メイタンシノイド（例えばピリジルジスルフィドなど）で処理することにより、複合体を得ることができる。

【０２７５】
切断不可能な結合をもつ抗体－薬剤複合体もまた調製することができる。そのような架橋剤は、当技術分野において記述されており（例えば、それぞれが参照により本明細書にその全体が組み入れられている、ThermoScientific Pierce Crosslinking Technical Handbookおよび米国特許出願公開第２００５０１６９９３３号を参照のこと）以下を含むが、これらに限定されない。Ｎ－スクシンイミジル　４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボキシレート（ＳＭＣＣ）、ＳＭＣＣ（ＬＣ－ＳＭＣＣ）の「長鎖」類似体であるＮ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロン酸）、κ－マレイミドウンデカン酸　N-スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、β－マレイミドプロパン酸　Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＢＭＰＳ）、γ－マレイミド酪酸　Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミドカプロン酸　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド　エステル（ＭＢＳ）、Ｎ－（α－マレイミドアセトキシ）－スクシンイミドエステル（ＡＭＡＳ）、スクシンイミジル－６－（β－マレイミドプロピオンアミド）ヘキサノアート（ＳＭＰＨ）、Ｎ－スクシンイミジル　４－（ｐ－マレイミドフェニル）－ブチラート（ＳＭＰＢ）、およびＮ－（ｐ－マレイミド

フェニル）イソシアナート（ＰＭＰＩ）、Ｎ－スクシンイミジル－４－（ヨードアセチル）－アミノベンゾアート（ＳＩＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル　ヨードアセタート（ＳＩＡ）、Ｎ－スクシンイミジル　ブロモアセタート（ＳＢＡ）、およびＮ－スクシンイミジル　３－（ブロモアセトアミド）プロピオナート（ＳＢＡＰ）。好ましくは、抗体は、文献に記載される通り、１～１０の反応基をを導入するために、スクシンイミジル　４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）、スルホ－ＳＭＣＣ、マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＭＢＳ）、スルホ－ＭＢＳ　またはスクシンイミジル－ヨードアセタートなどの架橋試薬で改変される（Yoshitake et al, Eur. J. Biochem., 101:395-399 (1979); Hashida et al, J. Applied Biochem., 56-63、(1984); and Liu et al, Biochem., 18:690-697 (1979)）。次いで、改変された抗体を、チオール含有メイタンシノイド誘導体と反応させることにより、複合体を得る。複合体は、Ｓｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ２５カラムによるゲルろ過、または透析またはタンジェント流ろ過によって精製することができる。改変された抗体を、チオール含有メイタンシノイド（１～２モル当量／マレイミド基）で処理し、抗体－メイタンシノイド複合体をＳｅｐｈａｄｅｘ　Ｇ－２５カラムによるゲルろ過、セラミックハイドロキシアパタイトカラム上でのクロマトグラフィー、透析、またはタンジェント流ろ過、またはそれらの方法の組み合わせにより精製する。典型的には、抗体あたり、平均１～１０メイタンシノイド類が結合している。好ましい方法としては、抗体をスクシンイミジル　４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ）で改変してマレイミド基を導入し、次いで改変された抗体をチオール含有メイタンシノイドと反応させ、チオエーテル結合複合体を得る。再び、抗体分子あたり１～１０薬剤分子をもつ複合体が生じる。抗体、抗体断片、タンパク質ホルモン、タンパク質成長因子、および他のタンパク質のメイタンシノイド複合体を、同様にして得る。

【０２７６】

本発明のもう１つの態様においては、ＣＤ２０抗体は、ＰＥＧスペーサーの媒介を通した切断不可能な結合により薬剤と結合している。薬剤と抗ＣＤ２０抗体または断片の間のリンカーを形成する親水性ＰＥＧ鎖を含む、適切な架橋試薬もまた、当分野において公知であるか、または、市販されている（例えば、カンタナバイオデザイン社（Quanta Biodesign）、オハイオ州、パウエル、より入手可能）。適切なＰＥＧ含有架橋剤もまた、市販されているＰＥＧ自体から、当業者に公知の標準的な合成化学技術を使用して、合成することができる。薬剤を二機能性のＰＥＧ含有架橋剤と、米国特許出願公開第２００９０２７４７１３号および国際公開第２００９／０１３４９７６号に詳細に記載されている方法によって反応させることにより、以下の式、$Z\text{-}X_l\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_n\text{-}Y_p\text{-}D$で表される化合物を得、次いでその化合物を細胞結合剤と反応させることにより、複合体を得ることができる。あるいは、細胞結合を二機能性のＰＥＧ架橋剤で改変することによりチオール反応基（マレイミドまたはハロアセトアミドなど）を導入し、次いでそれをチオール含有メイタンシノイドで処理することにより、複合体を得ることができる。もう一つの方法において、細胞結合を二機能性のＰＥＧ架橋剤で改変することによりチオール部分を導入し、次いでそれをチオール反応性メイタンシノイド（マレイミドまたはハロアセトアミドを有するメイタンシノイドなど）で処理することにより、複合体を得ることができる。

【０２７７】

従って、本発明のもう一つの態様は、式（ＩＩ）または式（ＩＩ’）：

$CB\text{-}[X_l\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_n\text{-}Y_p\text{-}D]_m$　　（ＩＩ）

$[D\text{-}Y_p\text{-}(\text{-}CH_2\text{-}CH_2\text{-}O\text{-})_n\text{-}X_l]_m\text{-}CB$　　（ＩＩ’）

で表される抗ＣＤ２０抗体薬剤複合体であって、式中、

ＣＢは抗ＣＤ２０抗体または断片を表し；

Ｄは薬剤を表し；

Ｘは、チオエーテル結合、アミド結合、カルバマート結合、またはエーテル結合によって細胞結合剤に結合している、脂肪族、芳香族、または複素環の単位を表し；

Ｙは、チオエーテル結合、アミド結合、カルバマート結合、エーテル結合、アミン結合、炭素－炭素結合、およびヒドラゾン結合から成る群より選択される共有結合によって薬剤に結合している、脂肪族、芳香族、または複素環の単位を表し；
ｌは０または１であり；
ｐは０または１であり；
Ｍは、２～１５の整数であり；および
ｎは整数１から２０００の整数である。
好ましくは、ｍは２～８の整数であり；および
好ましくは、ｎは１～２４の整数である。
より好ましくは、ｍは２～６の整数である。
また、さらにより好ましくは、ｍは３～５の整数である。

【０２７８】

また、より好ましくは、ｎは２～８の整数である。適切なＰＥＧ含有リンカーの例としては、抗ＣＤ２０抗体またはその断片との反応のためのＮ－スクシンイミジルエステルまたはＮ－スルホスクシンイミジルエステル部分、ならびに化合物との反応のためのマレイミドまたはハロアセチルをベースとする部分を有するリンカーが挙げられる。ＰＥＧスペーサーは、本明細書に記載される方法によって、当分野で公知のいずれの架橋剤にも組み込むことができる。ＰＥＧスペーサーで組み込むことができるマレイミドをベースとする部分を含む架橋試薬としては、以下のものが挙げられるが、これらに限定されない。Ｎ－スクシンイミジル　４－（マレイミドメチル）シクロヘキサンカルボキシレート（ＳＭＣＣ）、ＳＭＣＣ（ＬＣ－ＳＭＣＣ）の「長鎖」類似体であるＮ－スクシンイミジル－４－（Ｎ－マレイミドメチル）－シクロヘキサン－１－カルボキシ－（６－アミドカプロン酸）、κ－マレイミドウンデカン酸　Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＫＭＵＡ）、γ－マレイミド酪酸　Ｎ－スクシンイミジルエステル（ＧＭＢＳ）、ε－マレイミドカプロン酸　Ｎ－ヒドロキシスクシンイミドエステル（ＥＭＣＳ）、ｍ－マレイミドベンゾイル－Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド　エステル（ＭＢＳ）、Ｎ－（α－マレイミドアセトキシ）－スクシンイミドエステル（ＡＭＡＳ）、スクシンイミジル－６－（β－マレイミドプロピオンアミド）ヘキサノアート（ＳＭＰＨ）、Ｎ－スクシンイミジル　４－（ｐ－マレイミドフェニル）－ブチラート（ＳＭＰＢ）、およびＮ－（ｐ－マレイミドフェニル）イソシアナート（ＰＭＰＩ）。ハロアセチルをベースとする部分を含む架橋試薬としては、Ｎ－スクシンイミジル－４－（ヨードアセチル）－アミノベンゾアート（ＳＩＡＢ）、Ｎ－スクシンイミジル　ヨードアセタート（ＳＩＡ）、Ｎ－スクシンイミジル　ブロモアセタート（ＳＢＡ）、およびＮ－スクシンイミジル　３－（ブロモアセトアミド）プロピオナート（ＳＢＡＰ）が挙げられる。

【０２７９】

硫黄原子を欠く他の架橋試薬も使用することができる。そのようなリンカーは、ジカルボン酸をベースとする部分から誘導することができる。適切なジカルボン酸をベースとする部分としては、以下に示す一般式：

$HOOC-A'_p-E'_q-(CH_2CH_2O)_n-G'_r-COOH$

で表されるα，ω－ジカルボン酸が挙げられるが、これらに限定されず、式中、Ａ’は２～２０炭素原子を有する任意の直鎖又は分枝アルキル、アルケニル、またはアルキニル基であり、Ｅ’は３～１０個の炭素原子を有する任意のシクロアルキルまたはシクロアルケニル基であり、Ｇ’は６～１０個の炭素原子を有する任意の置換または非置換の芳香族基、または置換または非置換の複素環基であり、ここで、ヘテロ原子は窒素、酸素または硫黄から選ばれ、またｐ、ｑ、およびｒはそれぞれ０または１であるが、ｐ、ｑ、およびｒがすべて同時にゼロではなく、ｎは１～２０００の整数である。

【０２８０】

本明細書に開示されるリンカーの多くは、米国特許出願公開第２００５０１６９９３３号および同第２００９０２７４７１３号、および国際公開第２００９／０１３４９７６号に詳細に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられて

いる。

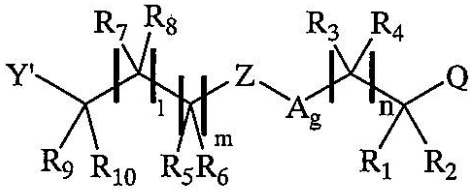
【０２８１】

本発明はまた、抗ＣＤ２０抗体またはその断片の改変後、および得られた薬剤複合体中の両方において電荷が保持される、荷電リンカーを提供する。より具体的には、本発明は、薬剤を抗ＣＤ２０抗体に結合するための荷電リンカーの使用に関する。本発明の１つの態様において、荷電リンカーは、細胞結合剤を改変し、それらを薬剤に結合するために使用される。本発明のもう１つの態様において、荷電リンカーは、薬剤を改変し、それらを抗ＣＤ２０抗体または断片に結合するために使用される。本発明のさらにもう１つの態様において、荷電リンカーは、薬剤と細胞結合剤を同時に結合するために使用される。すべての場合において、好ましい最終結果は、薬剤－荷電リンカー－細胞結合剤の複合体であり、その複合体は式、ＣＢ－（－Ｌ^{c}－Ｄ）$_{q}$で表され、式中ＣＢは抗ＣＤ２０抗体またはその断片である細胞結合剤であり、Ｌ^{c}は荷電リンカーであり、Ｄは薬剤分子であり、およびｑは１～２０の整数である。細胞結合剤－薬剤複合体中のリンカーの中の荷電基の存在は、いくつかの利点、例えば、ｉ）最終生成物のより高い水溶性、ｉｉ）より高濃度の水性溶液中で機能する能力、ｉｉｉ）細胞結合剤の分子あたり、より多くの数の薬剤分子と結合し、結果としてより高い力価をもたらす能力、ｉｖ）荷電複合体の種が標的細胞中に保持され、結果としてより高い力価をもたらす可能性、および、ｖ）荷電した薬剤種を細胞から排出することができなくなる、多剤耐性細胞の改善された感受性、などを提供する。本発明はまた、薬剤および細胞結合剤に結合することにより複合体を産生することができ、その複合体を細胞中で代謝することにより１つまたは複数の荷電部分を含む薬剤代謝産物を産生することができるリンカーについても記載している。これらのリンカーを、プロ－荷電(pro-charged）リンカーと呼ぶ。セル処理後に荷電するリンカー部分を、プロ－荷電(pro-charged）部分と呼ぶ。

【０２８２】

本発明の一つの態様において、荷電またはプロ－荷電(pro-charged）架橋剤は、以下の式（ＩＩＩ）：

【化１】



（ＩＩＩ）

で表され、式中Ｙ’は細胞結合剤と反応することができ、Ｑは細胞傷害性薬物と反応することができ；

また、Ｙ’は、抗ＣＤ２０抗体またはその断片との反応を可能にする機能基を表し；

Ｑは、ジスルフィド、チオエーテル、チオエステル、ペプチド、ヒドラゾン、エーテル、エステル、カルバミン酸またはアミド結合を介した細胞傷害性薬物の結合を可能にする機能基を表し；

Ｒ$_{1}$、Ｒ$_{2}$、Ｒ$_{3}$、Ｒ$_{4}$、Ｒ$_{5}$、Ｒ$_{6}$、Ｒ$_{7}$、Ｒ$_{8}$、Ｒ$_{9}$、およびＲ$_{10}$は、同一または異なって、水素；１～６個の炭素原子を有する直鎖アルキル；３～６個の炭素原子を有する分枝または環状アルキル；２～６個の炭素原子を有する直鎖、分枝または環状アルケニルまたはアルキニル；限定されないが、ＳＯ$_{3}^{-}$、Ｘ－ＳＯ$_{3}^{-}$、ＯＰＯ$_{3}^{2-}$、Ｘ－ＯＰＯ$_{3}^{2-}$、ＰＯ$_{3}^{2-}$、Ｘ－ＰＯ$_{3}^{2-}$、ＣＯ$_{2}^{-}$などの陰イオン；および、限定されないが、窒素含有複素環、Ｎ$^{+}$Ｒ$_{11}$Ｒ$_{12}$Ｒ$_{13}$またはＸ－Ｎ$^{+}$Ｒ$_{11}$Ｒ$_{12}$Ｒ$_{13}$、またはフェニルなどの陽イオンであり、ここで、

Ｒ$_{11}$、Ｒ$_{12}$およびＲ$_{13}$は、同一または異なって、水素、１～６個の炭素原子を有する直鎖アルキル、または３～６個の炭素原子を有する分枝または環状アルキルであり、Ｘは１～６個の炭素原子を有するフェニルまたは直鎖アルキル、または３～６個の炭素原子を有する分枝または環状アルキルを表し；

ｌ、ｍおよびｎは０または１～４の整数であり；および
Ａはフェニルまたは置換フェニルであって、ここで置換基は、１～６個の炭素原子を有する直鎖アルキル、または３～６個の炭素原子を有する分枝または環状アルキル、または限定されないがSO_3^-、Ｘ－SO_3^-、OPO_3^{2-}、Ｘ－OPO_3^{2-}、PO_3^{2-}、Ｘ－PO_3^{2-}、CO_2^-などの陰イオン、および、限定されないが窒素含有複素環、$N^+R_{11}R_{12}R_{13}$または$X-N^+R_{11}R_{12}R_{13}$などの陽イオンから選ばれる荷電した置換基であり、ここでＸは上記定義と同じであり、ｇは０または１であり；
Ｚは式（$OCH_2CH_2)_p$で表される任意のポリエチレンオキシ単位であり、式中、ｐは０または２～約１０００の整数、または、Ｅ１およびＥ２が同一または異なってＣ＝Ｏ、Ｏ、またはNR_{14}であるＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２単位であり、ここでR_{14}は水素、１～６個の炭素原子を有する直鎖アルキル、３～６個の炭素原子を有する分枝または環状アルキル、２～６個の炭素原子を有する直鎖、分枝または環状アルケニルまたはアルキニルであり；Ｐは、Ｅ１またはＥ２が、末端窒素、末端炭素を介して、またはペプチドのアミノ酸の一つの側鎖を介してペプチドに結合することができる、長さが２～２０アミノ酸のペプチド単位であり；また、Ｆ１およびＦ２は、同一または異なって、式（$OCH_2CH_2)_p$で表される任意のポリエチレンオキシ単位であり、式中、ｐは０または２～約１０００の整数であり、但し、ＺがＦ１－Ｅ１－Ｐ－Ｅ２－Ｆ２でない場合、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の少なくとも一つは荷電した置換基であり、またはｇが１の場合、Ａ、R_1、R_2、R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、およびR_{10}の少なくとも１つは荷電した置換基である。これは、荷電リンカーを有する複合体の１つの例示的な実施形態である。他の実施例は、第２００９－０２７４７１３号（Ravi、et al.）として公開された、米国特許出願第１２／４３３，６０４号に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている。適切な荷電リンカーは、当分野において公知であり、例えば、その内容が、参照によりその全体が本明細書に組み入れられている該第２００９０２７４７１３号に記載されたものを含む。

【０２８３】

本発明は、例えばメイタンシノイドなどの約２～約８個の薬剤分子（「薬剤負荷」）が抗ＣＤ２０抗体またはその断片に結合しており、同一の細胞結合剤に結合した、より少ないかまたはより多い数の薬剤の薬剤負荷と比べて、複合体の抗腫瘍効果がより一層有効である態様を包含する。本明細書で使用される「薬剤負荷」とは、細胞結合剤（例えば、抗ＣＤ２０抗体または断片）に結合し得る、薬剤分子（例えば、メイタンシノイド）の数を表す。１つの態様において、細胞結合剤に結合し得る薬剤分子の数は、平均約２～約８個（例えば、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１、７．２、７．３、７．４、７．５、７．６、７．７、７．８、７．９、８．０、８．１個）であり得る。好ましい態様において、細胞結合剤に結合し得る薬剤分子の数は、平均約２～約７個（例えば、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１、６．２、６．３、６．４、６．５、６．６、６．７、６．８、６．９、７．０、７．１）であり得る。さらにより好ましい態様において、細胞結合剤に結合し得る薬剤分子の数は、平均約２～約６個（例えば、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５

、４．６、４．７、４．８、４．９、５．０、５．１、５．２、５．３、５．４、５．５、５．６、５．７、５．８、５．９、６．０、６．１）であり得る。もっとも好ましい実施形態において、細胞結合剤に結合し得る薬剤分子の数は、平均約２～約５個（例えば、１．９、２．０、２．１、２．２、２．３、２．４、２．５、２．６、２．７、２．８、２．９、３．０、３．１、３．２、３．３、３．４、３．５、３．６、３．７、３．８、３．９、４．０、４．１、４．２、４．３、４．４、４．５、４．６、４．７、４．８、４．９、５、５．１）であり得る。本明細書で使用される「平均」という用語は、抗ＣＤ２０抗体またはその断片およびそれと結合した薬剤の吸光度の吸光分光測定により決定される。もう１つの態様において、薬剤と抗ＣＤ２０抗体またはその断片の複合体は、式（Ｄ）$_{about\ 2-about\ 8}$－Ｌ－Ａｎｔｉ－ＣＤ２０Ａｂで表され、式中、Ｄは薬剤（例えば、メイタンシノイド、タキサンまたはＣＣ１０６５類似体）、Ｌは切断可能なリンカー（例えば、ジスルフィド交換によって切断可能なリンカー）または、実質的に切断に対する耐性をもつリンカー（例えば、細胞結合剤との反応とのために、Ｎ－スクシンイミジルエステルまたはＮ－スルホスクシンイミジルエステル部分、ならびにマレイミド－またはハロアセチル－をベースとする部分を有するリンカー）から選ばれるリンカーであり、およびＡｎｔｉ－ＣＤ２０Ａｂは、本明細書に記載される、抗ＣＤ２０と結合する抗体またはその断片である。好ましい要素において、薬剤細胞結合剤複合体（例えば、免疫複合体）は式（Ｍａｙ）$_{about\ 2-about\ 8}$－Ｌ－Ａｎｔｉ－ＣＤ２０Ａｂで表され、式中、Ｍａｙはメイタンシノイドであり、Ｌはリンカーであり、ここで前記リンカーは切断可能なリンカーまたは実質的に切断に対する耐性を持つリンカーであり；およびＡｎｔｉ－ＣＤ２０Ａｂは、本明細書に記載されるＣＤ２０と結合する抗体またはその断片である。本発明における使用に適切な薬剤は、本明細書に記載される細胞結合剤と結合し得る細胞傷害性薬物である。本発明の１つの態様は、以下を含む、改変された芳香環をもつ好適なメイタンシノールの類似体である：（１）Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４，２５６，７４６号）（Ｌアンサマイトシン Ｐ２のＬＡＨ還元により調製）；（２）Ｃ－２０－ヒドロキシ（またはＣ－２０－デメチル）＋／－Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４，３６１，６５０号および同第４，３０７，０１６号）（ストレプトマイセス（Streptomyces）またはアクチノマイセス（Actinomyces）を使用した脱メチル化、またはＬＡＨを使用した脱塩素反応により調製）；および（３）Ｃ－２０－デメトキシ、Ｃ－２０－アシルオキシ（－ＯＣＯＲ）、＋／－デクロロ（米国特許第４，２９４，７５７号）（塩化アシルを使用したアシル化により調製）を含む、改変された芳香環を有するメイタンシノールの適切な類似体である。他の位置の改変を有するメイタンシノールの適切な類似体の具体例としては、（１）Ｃ－９－ＳＨ（米国特許第４，４２４，２１９号）（メイタンシノールとH_2SまたはP_2S_5の反応により調製）；（２）Ｃ－１４－アルコキシメチル（デメトキシ／CH_2OR）（米国特許第４，３３１，５９８号）；（３）Ｃ－１４－ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル（CH_2OHまたはCH_2OAc）（米国特許第４，４５０，２５４号）（ノカルディア属（Nocardia）から調製）；（４）Ｃ－１５－ヒドロキシ／アシルオキシ（米国特許第４，３６４，８６６号）（ストレプトマイセス（Streptomyces）によるメイタンシノールの変換により調製）；（５）Ｃ－１５－メトキシ（米国特許第４，３１３，９４６号および同第４，３１５，９２９号）（トレウィア・ヌディフローラ（Trewia nudiflora）より単離）；（６）Ｃ－１８－Ｎ－デメチル（米国特許第４，３６２，６６３号および第４，３２２，３４８号）（ストレプトマイセス（Streptomyces）によるメイタンシノールの脱メチル化により調製）；および（７）４，５－デオキシ（米国特許第４，３７１，５３３号）（メイタンシノールの三塩化チタン／ＬＡＨ還元により調製）。本発明において有用であるチオール含有メイタンシノイド類の合成は、米国特許第５，２０８，０２０号、同第５，４１６，０６４号、および同第７，２７６，４９７号に詳細に開示されている。Ｃ－３位置、Ｃ－１４位置、Ｃ－１５位置、またはＣ－２０位置にチオール部分を持つメイタンシノイド類はすべて有用である。Ｃ－３位置が好ましく、メイタンシノールのＣ－３位置が特に好ましい。また等しく好ましいのは、Ｎ－メチル－アラニン－含有Ｃ－３チオール部分メイタンシノイド、およびＮ－メチル－システイン

－含有Ｃ－３チオール部分メイタンシノイド、およびそれぞれの類似体である。好ましいメイタンシノイド類は、米国特許第５，２０８，０２０号；同第５，４１６，０６４号；同第６，３３３，４１０号；同第６，４４１，１６３号；同第６，７１６，８２１号；ＲＥ３９，１５１号および７，２７６，４９７号に記載されているものである。これらのうち、Ｎ$^{2'}$－デアセチル－Ｎ$^{2'}$－（３－メルカプト－１－オキソプロピル）－メイタンシン（ＤＭ１）およびＮ$^{2'}$－デアセチル－Ｎ$^{2'}$－（４－メルカプト－４－メチル－１－オキソペンチル）メイタンシン（ＤＭ４）がこのましい。本発明の本態様において、例えば、本明細書に記載されるもののような、他の薬剤も使用することができる。他の実施例が、米国仮特許出願第６１／０４９，２９６号および米国特許出願第１２／５７４，４３０号に記載されており、その内容は参照によりその全体が本明細書に組み入れられている。

【０２８４】

抗ＣＤ２０抗体またはその断片は、二機能性の架橋試薬を抗ＣＤ２０抗体またはその断片と反応させることにより改変することができ、結果として、リンカー分子の抗ＣＤ２０抗体またはその断片との共有結合が生じる。本明細書に使用される通り、「二機能性架橋試薬」は、本明細書に記載される薬剤などの、細胞結合剤を共有結合的に薬剤に結合させるあらゆる化学的な部分である。もう一つの方法において、結合部分（linking moiety）の一部は、薬剤によって提供される。この点において、薬剤は、細胞結合剤を薬剤と結合させるために使用されるより大きなリンカー分子の一部である結合部分（linking moiety）を含む。例えば、メイタンシノイドＤＭ１を形成するために、メイタンシンのＣ－３ヒドロキシル基における側鎖は、改変されて遊離スルフヒドリル基（ＳＨ）を有する。このチオラート型のメイタンシンは、改変された細胞結合剤と反応して、複合体を形成することができる。従って、最終リンカーは、二つの成分から構築されるが、そのうち１つは架橋試薬によって供給され、もう１つはＤＭ１からの側鎖によって供給される。

【０２８５】

薬剤分子は、血清アルブミンなどの中間担体分子を介して、抗体分子に結合することもできる。

【０２８６】

本明細書で使用される通り、「細胞結合剤に結合した」または「抗ＣＤ２０抗体または断片に結合した」という表現は、適切な結合基またはその前駆体を介して細胞結合剤抗ＣＤ２０抗体または断片に結合した、少なくとも１つの薬剤誘導体を含む複合体分子を表す。好ましい結合基はＳＭＣＣである。

【０２８７】

本発明において有用な特に好ましい細胞傷害性薬物は、メイタンシノイド類およびメイタンシノイド類似体である。適切なメイタンシノイド類の例としては、メイタンシノールのエステル類およびメイタンシノール類似体が挙げられる。メイタンシノールおよびメイタンシノール類似体と同様に、微小管形成を阻害し、哺乳類細胞に非常に有毒なあらゆる薬剤が含まれる。

【０２８８】

適切なメイタンシノールエステル類の例としては、改変された芳香族環を有するもの、および他の位置における改変を有するものが挙げられる。そのような適切なメイタンシノイド類は、米国特許第４，４２４，２１９号；同第４，２５６，７４６号；同第４，２９４，７５７号；同第４，３０７，０１６号；同第４，３１３，９４６号；同第４，３１５，９２９号；同第４，３３１，５９８号；同第４，３６１，６５０号；同第４，３６２，６６３号；同第４，３６４，８６６号；同第４，４５０，２５４号；同第４，３２２，３４８号；同第４，３７１，５３３号；同第５，２０８，０２０号；同第５，４１６，０６４号；同第５，４７５，０９２号；同第５，５８５，４９９号；同第５，８４６，５４５号；同第６，３３３，４１０号；同第７，２７６，４９７号および同第７，４７３，７９６号に開示されている。

【０２８９】

改変された芳香族環を有するメイタンシノールの適切な類似体の具体例としては以下が挙げられる：

（１）Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４，２５６，７４６号）（アンサミトシンＰ２のＬＡＨ還元により調製）；

（２）Ｃ－２０－ヒドロキシ（またはＣ－２０－デメチル）＋／－Ｃ－１９－デクロロ（米国特許第４，３６１，６５０号および同第４，３０７，０１６号）（ストレプトマイセス（Streptomyces）またはアクチノマイセス（Actinomyces）を使用した脱メチル化またはＬＡＨを使用した脱塩素反応により調製）；および

（３）Ｃ－２０－デメトキシ、Ｃ－２０－アシルオキシ（－ＯＣＯＲ）、＋／－デクロロ（米国特許第４，２９４，７５７号）（塩化アシル類を使用したアシル化により調製）。

【０２９０】

他の位置の改変を有するメイタンシノールの適切な類似体の具体例としては以下が挙げられる：

（１）Ｃ－９－ＳＨ（米国特許第４，４２４，２１９号）（メイタンシノールとＨ２ＳまたはＰ２Ｓ５の反応により調製）；

（２）Ｃ－１４－アルコキシメチル（デメトキシ／ＣＨ２ＯＲ）（米国特許第４，３３１，５９８号）；

（３）Ｃ－１４－ヒドロキシメチルまたはアシルオキシメチル（ＣＨ２ＯＨまたはＣＨ２ＯＡｃ）（米国特許第４，４５０，２５４号）（ノカルディア属（Nocardia）から調製）；

（４）Ｃ－１５－ヒドロキシ／アシルオキシ（米国特許第４，３６４，８６６号）（ストレプトマイセス（Streptomyces）によるメイタンシノールの変換により調製）；

（５）Ｃ－１５－メトキシ　（米国特許第４，３１３，９４６号および同第４，３１５，９２９号）　（トレウィア・ヌディフローラ（Trewia nudiflora）より単離）；

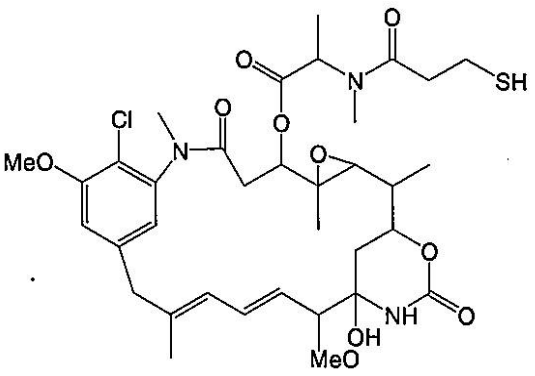
（６）Ｃ－１８－Ｎ－デメチル（米国特許第４，３６２，６６３号および同第４，３２２，３４８号）（ストレプトマイセス（Streptomyces）によるメイタンシノールの脱メチル化により調製）；および

（７）４，５－デオキシ（米国特許第４，３７１，５３３号）（メイタンシノールの三塩化チタン／ＬＡＨ還元により調製）。

【０２９１】

好ましい態様において、本発明の複合体は、公式にはＮ２’－デアセチル－Ｎ２’－（３－メルカプト－１－オキソプロピル）－メイタンシンと呼ばれる、チオール含有メイタンシノイド（ＤＭ１）を、細胞傷害性薬物として利用する。ＤＭ１は、以下の構造式（ＩＶ）：

【化２】



（ＩＶ）

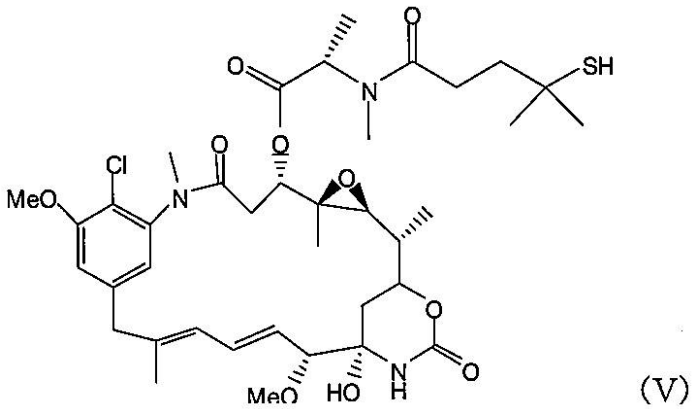
で表される。

【０２９２】

好ましい態様において、本発明の複合体は、チオール含有メイタンシノイド、Ｎ２’－デアセチル－Ｎ２’（４－メチル－４－メルカプト－１－オキソペンチル）－メイタンシ

ン（例えば、ＤＭ４）を細胞傷害性薬物として利用する。ＤＭ４は以下の構造式（Ｖ）：

【化３】



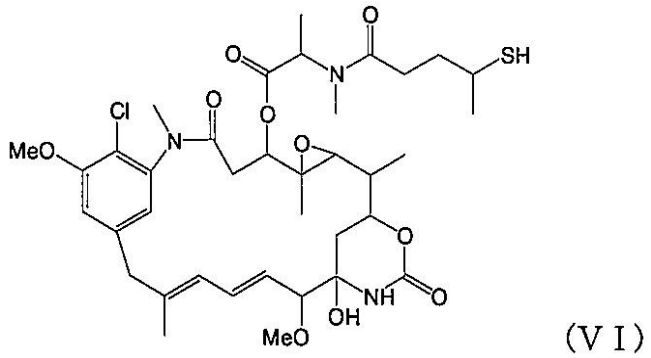
(V)

で表される。

【０２９３】

立体障害のあるチオール結合を含む側鎖を含む、他の好ましいメイタンシノイドは、以下の構造式（ＶＩ）：

【化４】



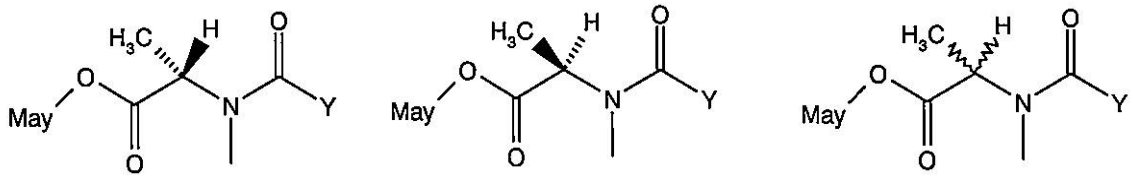
(ＶＩ)

で表される、Ｎ２’－デアセチル－Ｎ－２’（４－メルカプト－１－オキソペンチル）－メイタンシン（ＤＭ３と呼ばれる）である。

【０２９４】

付加的なメイタンシノイド類としては、式（ＶＩＩ－Ｌ）、（ＶＩＩ－Ｄ）、または（ＶＩＩ－Ｄ、Ｌ）：

【化５】



(ＶＩＩ－Ｌ)　(ＶＩＩ－Ｄ)　(ＶＩＩ－Ｄ、Ｌ)

で表される化合物が挙げられ、

式中、

Ｙは（ＣＲ$_7$Ｒ$_8$）$_1$（ＣＲ$_5$Ｒ$_5$）$_m$（ＣＲ$_3$Ｒ$_4$）$_n$ＣＲ$_1$Ｒ$_2$ＳＺを表し、

ここで、

Ｒ$_1$およびＲ$_2$はそれぞれ独立して、１～１０個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたはアルケニル、３～１０個の炭素原子を有する分枝または環状アルキルまたはアルケニル、フェニル、置換フェニル、または複素環基であり、またさらにＲ$_1$およびＲ$_2$の１つは水素であり得；

R_3、R_4、R_5、R_6、R_7およびR_8はそれぞれ独立して、水素、１～１０個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたはアルケニル、３～１０個の炭素原子を有する分枝または環状アルキルまたはアルケニル、フェニル、置換フェニル、または複素環芳香族またはヘテロシクロアルキルラジカルであり；

ｌ、ｍおよびｎはそれぞれ独立して、１～５の整数であり、さらにｎは０であり得；

Ｚは水素、ＳＲまたは－ＣＯＲであり、ここでＲは１～１０個の炭素原子を有する直鎖または分枝アルキルまたはアルケニル、３～１０個の炭素原子を有する環状アルキルまたはアルケニル、または非置換または置換アリールまたは複素環基であり；および

Ｍａｙは、Ｃ－３、Ｃ－１４ヒドロキシメチル、Ｃ－１５ヒドロキシまたはＣ－２０デスメチルに側鎖を有するメイタンシノイドを表す。

【０２９５】

式（ＶＩＩ－Ｌ）、（ＶＩＩ－Ｄ）および（ＶＩＩ－Ｄ，Ｌ）の好ましい態様は、式（ＶＩＩ－Ｌ）、（ＶＩＩ－Ｄ）および（ＶＩＩ－Ｄ，Ｌ）で表される化合物を含み、ここで、

R_1は水素であり、R_2はメチルであり、R_5、R_6、R_7、およびR_8はそれぞれ水素であり、ｌおよびｍはそれぞれ１であり、ｎは０であり、およびＺは水素である。

R_1およびR_2はメチルであり、R_5、R_6、R_7、R_8はそれぞれ水素であり、ｌおよびｍは１であり、ｎは０であり、およびＺは水素である。

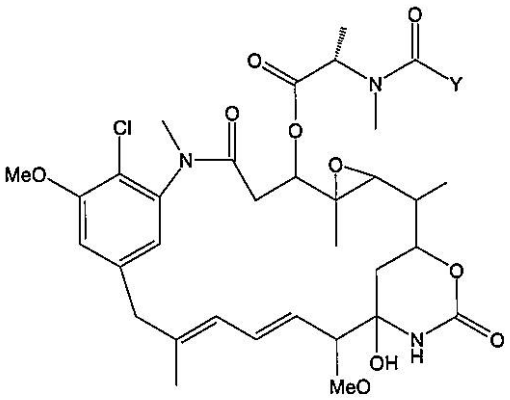
R_1は水素であり、R_2はメチルであり、R_5、R_6、R_7、R_8はそれぞれ水素であり、ｌおよびｍはそれぞれ１であり、ｎは０であり、およびＺは$-SCH_3$である。

R_1およびR_2はメチルであり、R_5、R_6、R_7、R_8はそれぞれ水素であり、ｌおよびｍは１であり、ｎは０であり、およびＺは$-SCH_3$である。

【０２９６】

付加的なメイタンシノイド類には、式（ＶＩＩＩ）：

【化６】



(ＶＩＩＩ)

で表される化合物も含まれ、

式中Ｙは式（ＶＩＩ）で定義されたものと同じである。

【０２９７】

式（ＶＩＩＩ）の好ましい態様は、式（ＶＩＩＩ）で表される化合物を含み、ここで、

R_1は水素であり、R_2はメチルであり、R_5、R_6、R_7、およびR_8はそれぞれ水素であり、ｌおよびｍはそれぞれ１であり、ｎは０であり、およびＺは水素である。

R_1およびR_2はメチルであり、R_5、R_6、R_7、およびR_8はそれぞれ水素であり、ｌおよびｍは１であり、ｎは０であり、およびＺは水素である。

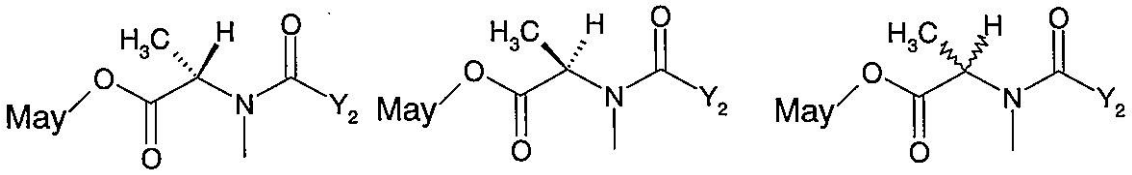
R_1は水素であり、R_2はメチルであり、R_5、R_6、R_7、およびR_8はそれぞれ水素であり、ｌおよびｍはそれぞれ１であり、ｎは０であり、およびＺは-SCH_3である。

R_1およびR_2はメチルであり、R_5、R_6、R_7、およびR_8はそれぞれ水素であり、ｌおよびｍは１であり、ｎは０であり、およびＺは-SCH_3である。

【０２９８】

付加的なメイタンシン類はさらに、式（ＩＸ－Ｌ）、（ＩＸ－Ｄ）、または（ＩＸ－Ｄ、Ｌ）：

【化７】



（ＩＸ－Ｌ）　　（ＩＸ－Ｄ）　　（ＩＸ－Ｄ、Ｌ）

で表される化合物を含み、

式中、Y_2は$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_o(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$を表し、

ここで、

R_1およびR_2はそれぞれ独立して、１～１０個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたはアルケニル、３～１０個の炭素原子を有する分枝または環状アルキルまたはアルケニル、フェニル、置換フェニルまたは複素環基であり、さらにR_1およびR_2の１つが水素であり得；

Ａ、Ｂ、およびＤはそれぞれ独立して、３～１０個の炭素原子を有するシクロアルキルまたはシクロアルケニル、単純または置換アリール、または複素環芳香族またはヘテロシクロアルキルラジカルであり；

R_3、R_4、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}およびR_{12}はそれぞれ独立して水素、１～１０個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたはアルケニル、３～１０個の炭素原子を有する分枝または環状アルキルまたはアルケニル、フェニル、置換フェニルまたは複素環基であり；

ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓ、およびｔはそれぞれ独立して０または１～５の整数であり、但し、ｌ、ｍ、ｎ、ｏ、ｐ、ｑ、ｒ、ｓおよびｔの少なくとも２つは同時に０ではなく；および

Z_2はＳＲまたは－ＣＯＲであり、ここでＲは１～１０個の炭素原子を有する直鎖アルキルまたはアルケニル、３～１０個の炭素原子を有する分枝または環状アルキルまたはアルケニル、または単純または置換アリールまたは複素環芳香族またはヘテロシクロアルキルラジカルであり；および

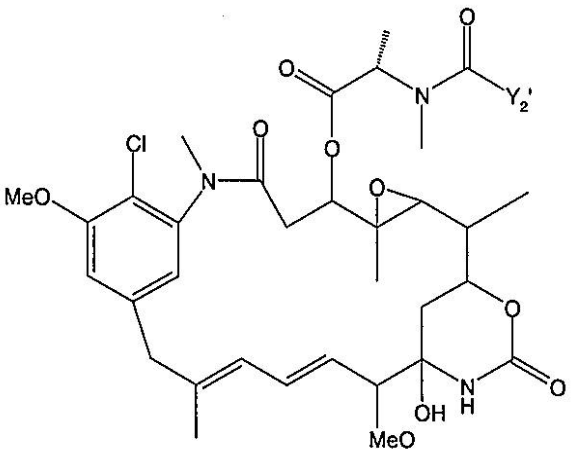
Ｍａｙはメイタンシノイドである。

式（ＩＸ）で表される化合物の好ましい態様は、R_1が水素でありR_2がメチルである、およびR_1がメチルでありR_2がメチルである化合物を含む。

【０２９９】

さらにメイタンシノイド類は、式（Ｘ）：

【化８】



(X)

で表される化合物を含み、
式中、Y_2’は式（ＩＸ）で定義されたY_2と同じである。

【０３００】

米国特許第５，２０８，０２０号および同第７，２７６，４９７号で教示された各メイタンシノイド類もまた、本発明の複合体に使用し得る。この点については、該米国特許第５，２０８，０２０号および同第７，２７６，６９７号の全開示が、参照により本明細書に組み入れられている。

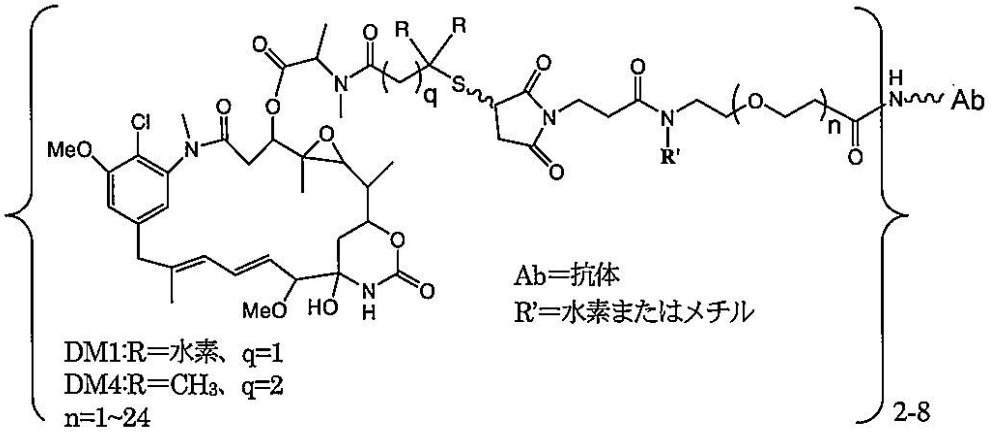
【０３０１】

メイタンシノイド類の多くの位置が、結合部分（linking moiety）を化学的に結合する位置として機能し得る。例えば、Ｃ－３位置ヒドロキシル基を有する、ヒドロキシメチルで改変されたＣ－１４位置、ヒドロキシで改変されたＣ－１５位置、およびヒドロキシ基を有するＣ－２０位置は、すべて有用であると期待される。しかし、Ｃ－３位置が好ましく、メイタンシノールのＣ－３位置が特に好ましい。

【０３０２】

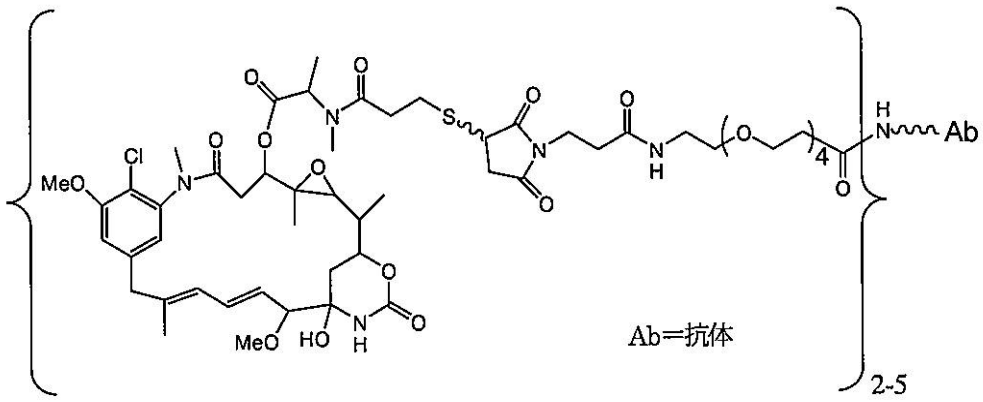
好ましい複合体の構造的表象を以下に示す。

【化９】



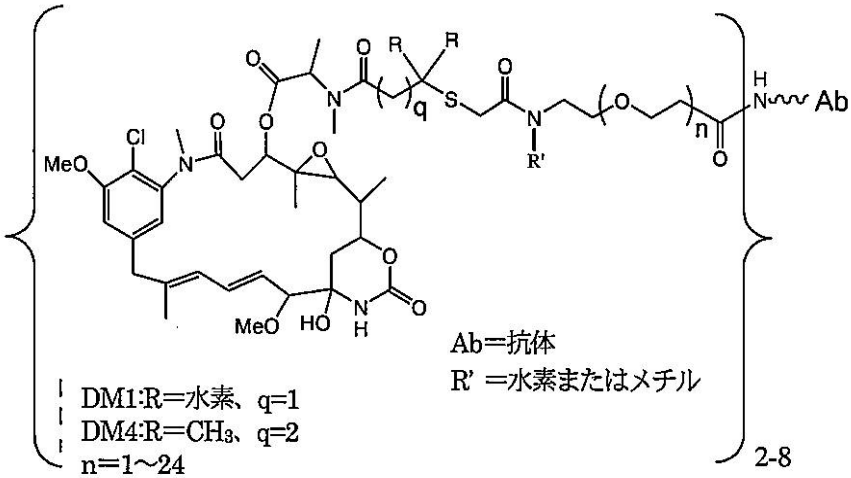
Ab-PEG-Mal-DM1/DM4 (ＸＩ)

【化１０】



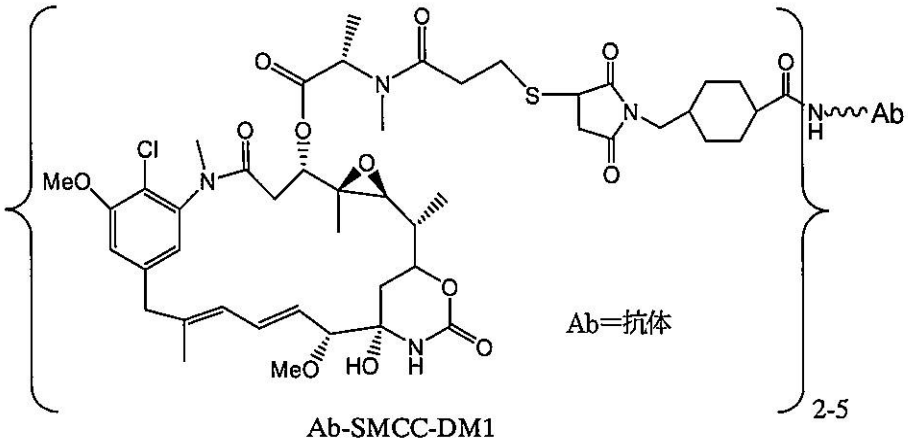
Ab-PEG4-Mal-DM1 (ＸＩＩ)

【化１１】



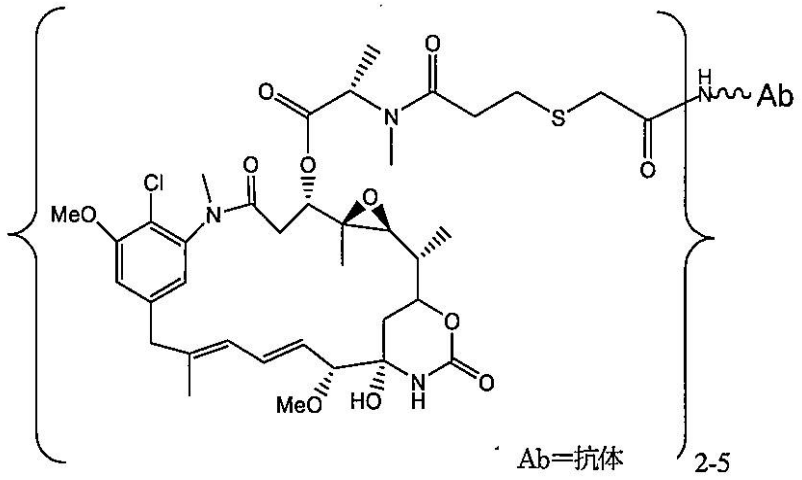
Ab-PEG-SIA-DM1/DM4 (ＸＩＩＩ)

【化１２】



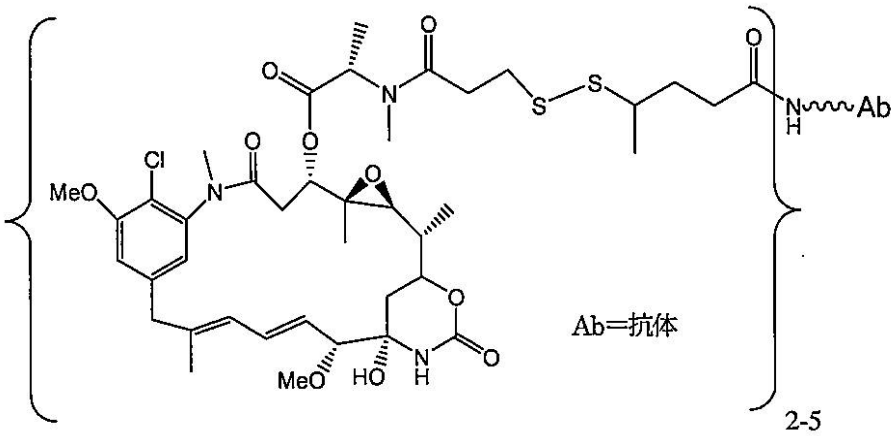
Ab-SMCC-DM1 (ＸＩＶ)

【化１３】



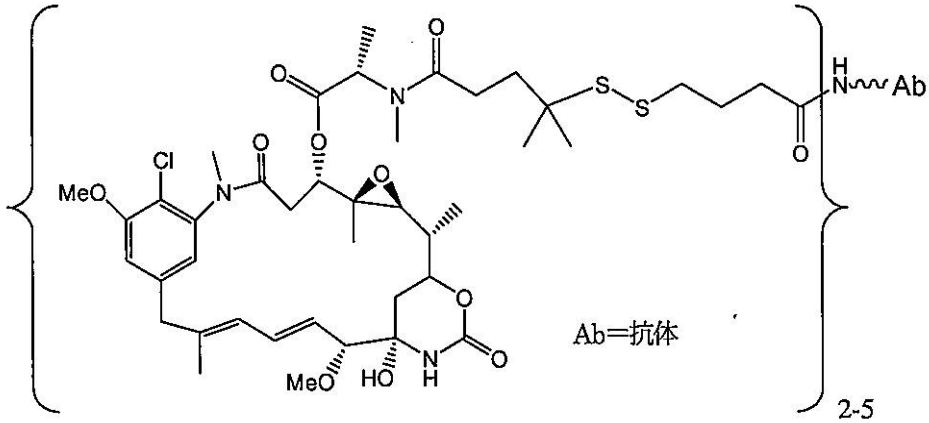
Ab-SIA-DM1 (XV)

【化１４】



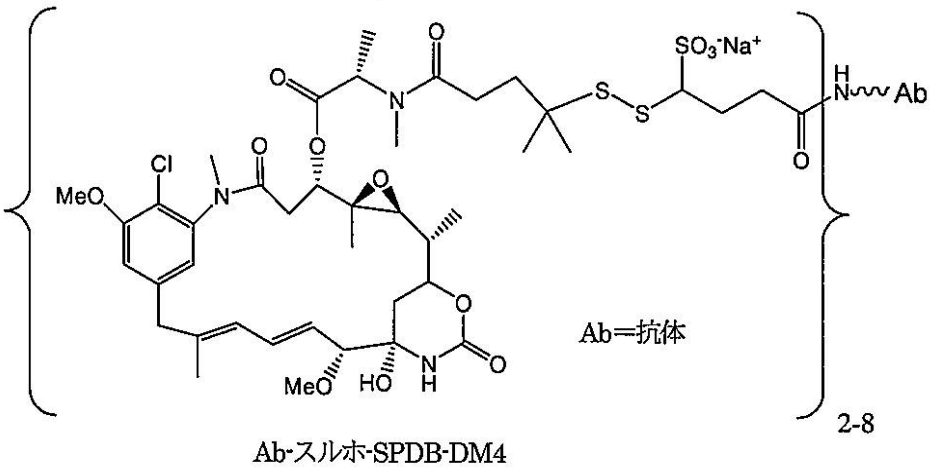
Ab-SPP-DM1 (XVI)

【化１５】



Ab-SPDB-DM4 (XVII)

【化１６】



Ab-スルホ-SPDB-DM4 (ＸＶＩＩＩ)

【０３０３】

このような抗体－メイタンシノイド複合体を製造するための、いくつかの開示は、米国特許第６，３３３，４１０号、並びに米国特許出願第０９／８６７，５９８号、第１０／１６１，６５１号及び第１０／０２４，２９０号において提供される。

【０３０４】

一般に、抗体の水性バッファー中の溶液を、反応基を有するジスルフィド部分を有する、モル過剰量のメイタンシノイドとインキュベートしてもよい。反応混合物は、過剰のアミン（例えば、エタノールアミン、タウリン等）を加えることにより、反応を停止することができる。次いで、メイタンシノイド抗体複合体をゲルろ過により精製してもよい。

【０３０５】

抗体分子あたりの結合するメイタンシノイド分子の数は、２５２ｎｍ及び２８０ｎｍにおける吸光度の比を分光光度法で測定することにより決定することができる。平均１～１０メイタンシノイド分子／抗体分子が好ましく、平均２～５が更に好ましい。

【０３０６】

抗体のメイタンシノイド薬剤との複合体は、インビトロにおける種々の好ましくない細胞系の増殖を抑制する能力について評価することができる。例えば、ヒトリンパ腫細胞系Ｄａｕｄｉ及びヒトリンパ腫細胞系Ｒａｍｏｓのような細胞系を、化合物の細胞毒性の評価のために容易に用いることができる。評価すべき細胞を化合物に４～５日間さらし、公知の方法による直接アッセイにおいて細胞の生存率を測定する。次いで、アッセイの結果からIC_{50}値を計算することができる。

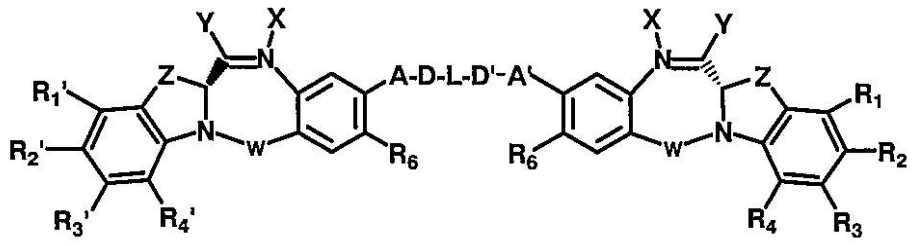
【０３０７】

米国仮出願番号６１／１５０，２０１号に開示されたベンゾジアゼピン化合物（例えば、インドリノベンゾジアゼピン類又はオキサゾリジノベンゾジアゼピン類）、それらの誘導体、それらの中間体も、抗－ＣＤ２０抗体画分又は複合体を調製するために用いることができる。

【０３０８】

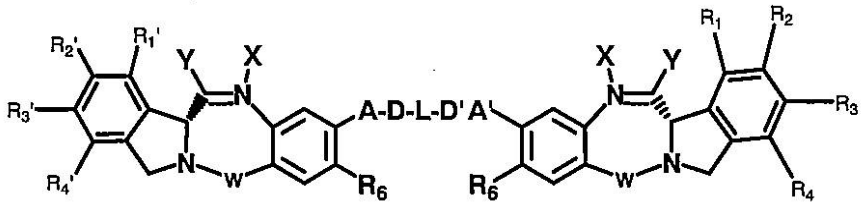
有用なベンゾジアゼピン類には、二量体化合物が、細胞結合剤との結合を可能にする連結基を有していてもよい、式（ＸＩＸ）、（ＸＸ）及び（ＸＸＩ）

【化１７】



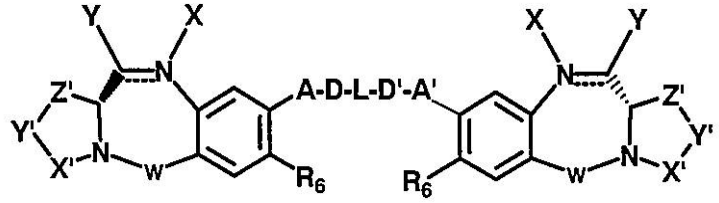
(ＸＩＸ)

【化１８】



(XX)

【化１９】



(XXI)

（式中、Ｎ及びＣの間の二重線は単結合又は二重結合を表わし、ただし、二重結合である場合にはＸは存在せず、ＹはＨであり、単結合である場合には、ＸはＨ又は化合物をプロドラッグに変換させるアミン保護部分であり；

Ｙは、－ＯＲ、－ＯＣＯＲ’により表わされるエステル、－ＯＣＯＯＲ’により表わされるカルボネート、－ＯＣＯＮＲ’Ｒ’’により表わされるカルバメート、アミン又はＮＲ’Ｒ’’により表わされるヒドロキシルアミン、－ＮＲＣＯＲ’により表わされるアミド、ＮＲＣＯＰにより表わされるペプチド（ここで、Ｐはアミノ酸、又は２～２０個のアミノ酸単位を含むポリペプチド）、ＳＲ’により表わされるチオエーテル、ＳＯＲ’により表わされるスルホキシド、－SO_2Ｒ’により表わされるスルホン、亜硫酸塩－SO_3、亜硫酸水素塩－OSO_3、ハロゲン、シアノ、アジド又はチオール（ここで、Ｒ、Ｒ’、Ｒ’’は同一であるか又は異なり、Ｈ、置換されているか又は置換されていない、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニルから選択される）、ポリエチレングリコール単位（$-OCH_2CH_2)_n$（ここで、ｎは１～２０００の整数である）、６～１０個の炭素原子を有するアリール、３～１０個の炭素原子を有する複素環（ここで、置換基は、ハロゲン、OR_7、NR_8R_9、NO_2、ＮＲＣＯＲ’、SR_{10}、ＳＯＲ’により表わされるスルホキシド、－SO_2Ｒ’により表わされるスルホン、亜硫酸塩－SO_3、亜硫酸水素塩－OSO_3、SO_2ＮＲＲ’により表わされるスルホンアミド、シアノ、アジド、－COR_{11}、$OCOR_{11}$又は$OCONR_{11}R_{12}$から選択され（ここで、R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}及びR_{12}は上記に定義された通りである。）から選択され、Ｒ’’はＯＨであってもよく；

Ｗは、Ｃ＝Ｏ、Ｃ＝Ｓ、CH_2、ＢＨ、ＳＯ又はSO_2であり；

R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’及びR_4’は、それぞれ独立して、Ｈ、置換されているか又は置換されていない、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニル、ポリエチレングリコール単位（$-OCH_2CH_2)_n$（ここで、ｎは１～２０００の整数である）、又はハロゲン、グアニジウム〔－ＮＨ（Ｃ＝ＮＨ）NH_2〕、OR_7、NR_8R_9、NO_2、ＮＲＣＯＲ’、SR_{10}、ＳＯＲ’により表わされるスルホキシド、－SO_2Ｒ’により表わされるスルホン、亜硫酸塩－SO_3、亜硫酸水素塩－OSO_3、SO_2ＮＲＲ’により表わされるスルホンアミド、シアノ、アジド、－COR_{11}、$OCOR_{11}$又は$OCONR_{11}R_{12}$から選択され（ここで、R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}及びR_{12}は、それぞれ独立して、Ｈ、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニル、ポリエチレングリコール単位（$-OCH_2CH_2)_n$（ここで、ｎは１～２０００の整数である）、６～１０個の炭素原子を有するアリール、３～１０個の炭素原子を有する複素環から選択される）、場合により、R_{10}はSR_{13}又はCOR_{13}であり（ここで、R_{13}は、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニル、ポリエチレングリコール単位（$-OCH_2CH_2)_n$（ここで、ｎは１～

２０００の整数である）、６～１０個の炭素原子を有するアリール、３～１０個の炭素原子を有する複素環から選択される）、場合により、R_{11}はOR_{14}であり（ここで、R_{14}は、Rと同じ定義を有し、場合により、R_1、R_2、R_3、R_4、R_1’、R_2’、R_3’及びR_4’の任意の１つは、共有結合により細胞結合剤と連結可能な連結基であり、又は細胞結合剤と連結可能な連結基を有していてもよい、ポリピロロ、ポリ－インドリル、ポリ－イミダゾリル、ポリピロロ－イミダゾリル、ポリ－ピロロ－インドリル又はポリイミダゾロ－インドリル単位である）；

Zは、$(CH_2)_n$（ここで、nは１、２又は３である）、$CR_{15}R_{16}$、NR_{17}、O又はSであり（ここで、R_{15}、R_{16}及びR_{17}は、それぞれ独立して、H、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐又は環状アルキル、ポリエチレングリコール単位（$-OCH_2CH_2)_n$（ここで、nは１～２０００の整数である）から選択され；

R_6は、OR、SR又はNRR’であり（ここで、R及びR’は上記に定義された通りである）；

X’は、CH_2、NR、CO、BH、SO又はSO_2から選択され（ここで、Rは上記と同じ定義を有する）；

Y’は、O、CH_2、NR又はSであり（ここで、Rは、上記と同じ定義を有する）；

Z’はCH_2又は$(CH_2)_n$であり（ここで、nは２、３又は４であり）、ただし、X’、Y’及びZ’は、全てが同時にCH_2ではなく；

A及びA’は同一であるか又は異なり、O、－CRR’O、S、－CRR’S、－NR_{15}又はCRR’NHR_{15}から選択され（ここで、R及びR’は上記と同じ定義を有し、R_{15}は、Rに対する上記と同じ定義を有する）；

D及びD’は同一であるか又は異なり、それぞれ独立して、ハロゲン、OR_7、NR_8R_9、NO_2、NRCOR’、SR_{10}、SOR’により表わされるスルホキシド、$-SO_2R$’により表わされるスルホン、亜硫酸塩－SO_3、亜硫酸水素塩－OSO_3、SO_2NRR’により表わされるスルホンアミド、シアノ、アジド、－COR_{11}、$OCOR_{11}$又は$OCONR_{11}R_{12}$から選択される（ここで、R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}及びR_{12}は、上記に定義した通りである）任意の１つで置換されていてもよい、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニル、ポリエチレングリコール単位（$-OCH_2CH_2)_n$（ここで、nは１～２０００の整数である）から選択され；

Lは、置換されていてもよい３～１０個の炭素原子を有するフェニル基又は複素環であってもよく、前記置換基は、共有結合により細胞結合剤と連結可能な連結基であり、又はハロゲン、OR_7、NR_8R_9、NO_2、NRCOR’、SR_{10}、SOR’により表わされるスルホキシド、$-SO_2R$’により表わされるスルホン、亜硫酸塩－SO_3、亜硫酸水素塩－OSO_3、SO_2NRR’により表わされるスルホンアミド、シアノ、アジド、－COR_{11}、$OCOR_{11}$又は$OCONR_{11}R_{12}$から選択される（ここで、R_7、R_8、R_9、R_{10}、R_{11}及びR_{12}は、上記に定義した通りである）の任意の１つで置換されていてもよい、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニル、ポリエチレングリコール単位（$-OCH_2CH_2)_n$（ここで、nは１～２０００の整数である）から選択され；場合により、L自体が共有結合により細胞結合剤と連結可能な連結基である）の化合物、その薬学的に許容される溶媒和物、塩、水和物又は水和塩、その光学異性体、ラセミ化合物、ジアステレオマー、エナンチオマー又はそれらの化合物の多形結晶構造が含まれる（ただし、化合物は、共有結合により細胞結合剤と連結可能な１つ又はそれ以上の連結基を有しない）。

【０３０９】

好ましい一態様においては、N及びCの間の二重線が単結合又は二重結合を表し、ただし、二重結合である場合にはXは存在せず、YがHであり、単結合である場合には、XはH又は化合物をプロドラッグに変換させるアミン保護部分であり；

Yが、－OR、NR’R’’、亜硫酸塩－SO_3、又は亜硫酸水素塩－OSO_3であり（ここで、Rは、H、１～１０個の炭素原子を有する、直鎖、分岐、又は環状アルキル、

アルケニル又はアルキニル、ポリエチレングリコール単位（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_n$（ここで、ｎは１～２０００の整数である）、６～１０個の炭素原子を有するアリール、３～１０個の炭素原子を有する複素環から選択され；

Ｗが、Ｃ＝Ｏ、ＣＨ$_2$又はＳＯ$_2$であり；

Ｒ$_1$、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$、Ｒ$_4$、Ｒ$_1$’、Ｒ$_2$’、Ｒ$_3$’及びＲ$_4$’が、それぞれ独立して、Ｈ、ＮＯ$_2$、又は共有結合により細胞結合剤と連結可能な連結基から選択され；

Ｒ$_6$がＯＲ$_{18}$であり（ここで、Ｒ$_{18}$はＲと同じ定義を有する）；

Ｚが、（ＣＨ$_2$）$_n$（ここで、ｎは１、２又は３である）、ＣＲ$_{15}$Ｒ$_{16}$、ＮＲ$_{17}$、Ｏ又はＳであり（ここで、Ｒ$_{15}$、Ｒ$_{16}$及びＲ$_{17}$は、それぞれ独立して、Ｈ、１～１０個の炭素原子を有する、直鎖、分岐又は環状アルキルである）、ポリエチレングリコール単位（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_n$（ここで、ｎは１～２０００の整数である）から選択され；

Ｘ’が、ＣＨ$_2$、又はＣ＝Ｏから選択され；

Ｙ’が、Ｏ、ＮＲ又はＳであり（ここで、Ｒは前記に定義した通りである）；

Ｚ’が、ＣＨ$_2$又は（ＣＨ$_2$）$_2$であり；

Ａ及びＡ’が、それぞれＯであり；

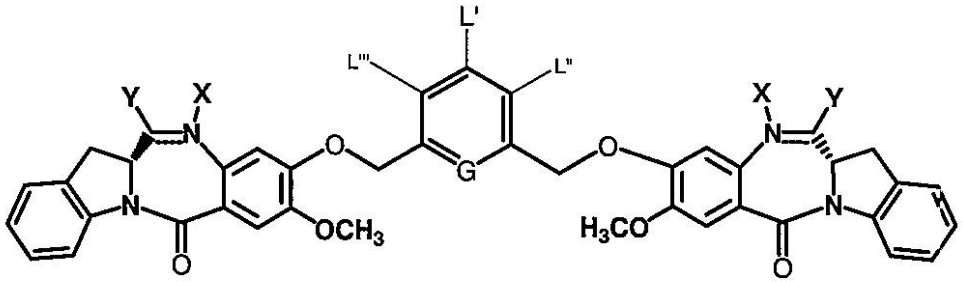
Ｄ及びＤ’が同一であるか、又は異なり、１～１０個の炭素原子を有する、直鎖、分岐、又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニルから独立して選択され；

Ｌが、置換されていてもよい３～１０個の炭素原子を有するフェニル基又は複素環であってもよく、前記置換基は、共有結合により細胞結合剤と連結可能な連結基であり、又はハロゲン、ＯＲ$_7$、ＮＲ$_8$Ｒ$_9$、ＮＯ$_2$、ＮＲＣＯＲ’、ＳＲ$_{10}$、ＳＯＲ’により表わされるスルホキシド、－ＳＯ$_2$Ｒ’により表わされるスルホン、亜硫酸塩－ＳＯ$_3$、亜硫酸水素塩－ＯＳＯ$_3$、ＳＯ$_2$ＮＲＲ’により表わされるスルホンアミド、シアノ、アジド、－ＣＯＲ$_{11}$、ＯＣＯＲ$_{11}$又はＯＣＯＮＲ$_{11}$Ｒ$_{12}$の任意の１つで置換されていてもよい、１～１０個の炭素原子を有する直鎖、分岐又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニル、ポリエチレングリコール単位（－ＯＣＨ$_2$ＣＨ$_2$）$_n$（ここで、ｎは１～２０００の整数である）から選択され；場合により、Ｌ自体が共有結合により細胞結合剤と連結可能な連結基である；の化合物、その化合物の薬学的に許容される溶媒和物、塩、水和物又は水和塩、その光学異性体、ラセミ化合物、ジアステレオマー、エナンチオマー又はそれらの多形結晶構造。

【０３１０】

本発明の化合物の他の好ましい態様は、式（ＸＸＩＩ）：

【化２０】



（ＸＸＩＩ）

（式中、Ｎ及びＣの間の二重線は単結合又は二重結合を表し、ただし、二重結合である場合にはＸは存在せず、ＹがＨであり、単結合である場合には、ＸはＨ又は化合物をプロドラッグに変換させるアミン保護部分であり；

Ｙは、ＯＨ、－ＯＲにより表わされるエーテル、亜硫酸塩－ＳＯ$_3$、又は亜硫酸水素塩－ＯＳＯ$_3$から選択され（ここで、Ｒは、１～１０個の炭素原子を有する、直鎖、分岐、又は環状アルキル、アルケニル又はアルキニルから選択され、Ｒ$_2$、Ｒ$_3$の１個は、共有結合により細胞結合剤と連結可能な連結基であり、他はＨである）；

Ｌ’、Ｌ’’又はＬ’’’の１つは、細胞結合剤と連結可能な連結基であり、他はＨであり；好ましくはＬ’は連結基であり、ＧはＣＨ又はＮである）により表わされる。他の

例は、米国特許出願第６１／１５０，２０１号に開示されており、その全体の開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【０３１１】

本発明の細胞毒性複合体において用いられる細胞傷害性薬物は、タキサン又はその誘導体であってもよい。タキサンは、癌の治療に広く用いられている２種の化合物、細胞毒性天然産物であるパクリタクセル（Ｔａｘｏｌ）、及び半合成誘導体であるドセタキセル（Ｔａｘｏｔｅｒｅ）が含まれる化合物群である。タキサン類は、チューブリンの脱重合を阻害し、その結果、細胞死をもたらす紡錘体毒である。ドセタキセル及びパクリタクセルは癌の治療において有用な薬剤であるが、それらの抗腫瘍活性は、正常細胞に対する、それらの非特異的毒性のために限界がある。更に、パクリタクセル及びドセタキセルのような化合物自体は、本発明の抗－ＣＤ２０抗体及びその断片のような細胞結合剤の複合体において有用であるほど十分に強力でない。本発明において用いるのに適したタキサン類は、米国特許第６，３７２，７３８号及び第６，３４０，７０１号に開示されている。本発明のタキサン類及び細胞結合剤の複合体は、現在公知である、又は後で開発される技術のいずれかを用いて形成することができる。多くの結合法が、米国特許第５，４１６，０６４号及び第５，４７５，０９２号に教示されている。タキサン類は、第７，５９８，２９０号、第　２００９００９９３３６号、第　２００７００３１４０２号、第２００６０２３３８１４号、第２００６０２３３８１１号、第２００５０１２３５４９号、第２００５００８５５１３号、及び第２００４００３９１７６号にも教示されており、その全体の開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【０３１２】

ＣＣ－１０６５及びその類似体も、本発明において用いるための好ましい細胞傷害性薬物である。ＣＣ－１０６５及びその類似体は、米国特許第６，３７２，７３８号；第６，３４０，７０１号；第５，８４６，５４５号；第５，５８５，４９９号に開示されている。ＣＣ－１０６５は、ストレプトマイセス・ゼレンシス（Ｓｔｒｅｐｔｏｍｙｃｅｓ　ｚｅｌｅｎｓｉｓ）の培養液から分離された、強力な抗腫瘍抗生物質である。ＣＣ－１０６５は、インビボにおいて、ドキソルビシン、メトトレキセート及びビンクリスチンのような一般に用いられている抗癌剤よりも約１０００倍以上強力である（Ｂ．Ｋ．Ｂｈｕｙａｎら．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．，４２，３５３２－３５３７（１９８２））。

【０３１３】

デュオカルマイシンは、本発明において用いられるのに適切な細胞傷害性薬物であり、先行技術、例えば、米国特許第６，２８１，３５４号；第６，０６６，７４２号；第５，７０３，０８０号；第４，９９４，５７８号；第４，９２３，９９０に開示されている。各文献は、全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【０３１４】

カリケアマイシンのようなエンジイン類は、本発明において用いられるのに適切な細胞傷害性薬物であり、先行技術、例えば、米国特許第５，４３６，３６１号；第５，０５３，３９４号；及び第２００９０１０５４６１号に開示されている。各文献は、全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【０３１５】

ドラスチン類、及びアウリスタチン類を含むドラスチン類似体は、本発明において用いられるのに適切な細胞傷害性薬物であり、先行技術、例えば、米国特許第７，０８４，１１０号；第６，７３７，４０９号；第６，６８６，４４５号；第６，６３２，７９５号；第６，４５８，７６５号；第６，３２３，３１５号；第６，２４８，８６５号；第６，２３９，１０４号；第６，１４３，７２１号；第６，１０３，６９８号；第６，０３４，０６５号；第５，９８５，８３７号；第５，９６５，５３７号；第５，８８６，１４７号；第５，５５４，７２５号；第５，１３８，０３６号；第５，０７６，９７３号；第４，９８６，９８８号；第４，９７８，７４４号；及び第４，８７９，２７８号に開示されている。各文献は、全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【０３１６】

トママイシン誘導体は、本発明において用いられるのに適切な細胞傷害性薬物であり、先行技術、例えば、米国特許第４，４２７，５８８号、Ａｒｉｍａら，”Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ”，ｖｏｌ．２５，Ｎｏ．８，ｐｐ．４３７－４４４，（１９７２）；Ｋａｒｉｙｏｎｅら，”Ｃｈｅｍ．Ｐｈａｒｍ．Ｂｕｌｌ．”，ｖｏｌ．１９，Ｎｏ．１１，ｐｐ．２２８９－２２９３，（１９７１）；及びＬｅｉｍｇｒｕｂｅｒ，”Ｊ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ．”，ｖｏｌ．９０，ｐｐ．５６４１－５６４３，（１９６８）に開示されている。各文献は、全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【０３１７】

レプトマイシン誘導体は、本発明において用いられるのに適切な細胞傷害性薬物であり、先行技術、例えば、米国特許第７，４４６，１９６号；Ｋｕｄｏら，Ｅｘｐｅｒｉｍｅｎｔａｌ Ｃｅｌｌ Ｒｅｓｅａｒｃｈ，１９９８，２４２（２），５４－５４６；Ｋｕｈｎｔら，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔａｌ Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌｏｇｙ，１９９８，６４（２），７１４－７２０；米国特許出願第１０／８５６，７０３号；Ｃａｒｌら，Ｊ．Ｍｅｄ．Ｃｈｅｍ．１９８１，２４（３），４７９－４８０，”Ａ Ｎｏｖｅｌ Ｃｏｎｎｅｃｔｏｒ Ｌｉｎｋａｇｅ Ａｐｐｌｉｃａｂｌｅ ｉｎ Ｐｒｏｄｒｕｇ Ｄｅｓｉｇｎ”；Ｃｈｅｍｉｃａｌ Ａｂｓｔｒａｃｔｓ Ｎｏ．１０５：１０２６２９（日本国特許出願公開特開昭６１－１０９７１７（Ａ２）の要約（１９８６））；Ｄｏｈｅｒｔｙら，Ｊ．Ｎａｔ．Ｃａｎｃｅｒ Ｉｎｓｔ．２００３，９５（２４），１８５９－１８６８，”Ｃｅｌｌ Ｃｙｃｌｅ Ｃｈｅｃｋｐｏｉｎｔ Ｆｕｎｃｔｉｏｎ ｉｎ Ｂｌａｄｄｅｒ Ｃａｎｃｅｒ”；Ｆｕｋｕｄａら，Ｎａｔｕｒｅ １９９７，３９０，３０８－３１１，”ＣＲＭ１は、核外搬出シグナルに介在される細胞内輸送に関与している（ＣＲＭ１ ｉｓ ｒｅｓｐｏｎｓｉｂｌｅ ｆｏｒ ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ｔｒａｎｓｐｏｒｔ ｍｅｄｉａｔｅｄ ｂｙ ｔｈｅ ｎｕｃｌｅａｒ ｅｘｐｏｒｔ ｓｉｇｎａｌ）”；Ｈａｍａｍｏｔｏら，Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ １９８３，３６（６），６３９－６４５，”レプトマイシンＡ及びＢ、新規抗真菌剤抗生物質Ｉ．生産株の分類及びその発酵、精製及び特徴づけ（Ｌｅｐｔｏｍｙｃｉｎｓ Ａ ａｎｄ Ｂ，Ｎｅｗ Ａｎｔｉｆｕｎｇａｌ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ Ｉ．Ｔａｘｏｎｏｍｙ ｏｆ ｔｈｅ Ｐｒｏｄｕｃｉｎｇ Ｓｔｒａｉｎ ａｎｄ Ｔｈｅｉｒ Ｆｅｒｍｅｎｔａｔｉｏｎ，Ｐｕｒｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｎｄ Ｃｈａｒａｃｔｅｒｉｚａｔｉｏｎ）”；Ｈａｙａｋａｗａら．，Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ １９８７，４０（９），１３４９－１３５２，”新規抗腫瘍抗生物質．アングイノマイシンＡ及びＢ（Ｎｅｗ Ａｎｔｉｔｕｍｏｒ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ，Ａｎｇｕｉｎｏｍｙｃｉｎｓ Ａ ａｎｄ Ｂ）”；Ｉｎｏｕｅら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２００２，２７７（１７），１５０５３－１５０６０，”ｐ５３関連蛋白質ｐ７３における、核内及び核外輸送のシグナル（Ｎｕｃｌｅａｒ Ｉｍｐｏｒｔ ａｎｄ Ｅｘｐｏｒｔ Ｓｉｇｎａｌｓ ｉｎ Ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ ｔｈｅ ｐ５３－ｒｅｌａｔｅｄ Ｐｒｏｔｅｉｎ ｐ７３）”；Ｋｏｂａｙａｓｈｉら，Ｅｎｓｈｏ，Ｓａｉｓｅｉ ２００４，２４（５），５７８－５８３，”皮膚炎症におけるマトリクスメタノプロテイナーゼ９の発現の役割：レプトマイシンＢの塗布による考え得る治療（Ｒｏｌｅ ｏｆ ｍａｔｒｉｘ ｍｅｔａｌｌｏｐｒｏｔｅｉｎａｓｅ－９ ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｎ ｃｕｔａｎｅｏｕｓ ｉｎｆｌａｍｍａｔｉｏｎ：ｐｏｓｓｉｂｌｅ ｔｒｅａｔｍｅｎｔ ｂｙ ｌｅｐｔｏｍｙｃｉｎ Ｂ ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎ”（要約）；Ｋｏｍｉｙａｍａら，Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ １９８５，３８（２），２２０－２２３，”新規抗腫瘍抗生物質、カズサマイシンの構造研究（Ｓｔｒｕｃｔｕｒａｌ Ｓｔｕｄｙ ｏｆ ａ Ｎｅｗ Ａｎｔｉｔｕｍｏｒ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ，Ｋａｚｕｓａｍｙｃｉｎ）”；Ｋｏｍｉｙａｍａら，Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ １９８５，３８（２），２２４－２２９，”新規抗生物質、カズサマイシンの抗腫瘍活性（Ａｎｔｉｔｕｍｏｒ Ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ａ Ｎｅｗ Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃ，Ｋａｚｕｓａｍｙｃｉｎ）”；Ｋｏｍｉｙａｍａら，Ｊ．Ａｎｔｉｂｉｏｔｉｃｓ １９８５，３８（３），４２７－４２９，”レプトマイシンＢの抗腫瘍活性（Ａｎｔｉｔｕｍｏｒ ａｃｔｉｖｉｔｙ ｏｆ ｌｅｐｔｏｍｙｃｉ

ｎ Ｂ）；Ｋｕｄｏら，Ｅｘｐ．Ｃｅｌｌ Ｒｅｓ．１９９８，２４２，５４０－５４７，”ＣＲＭ１への直接結合による、シグナル介在性核外輸送のレプトマイシンＢによる阻害（Ｌｅｐｔｏｍｙｃｉｎ Ｂ Ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ ｏｆ Ｓｉｇｎａｌ Ｍｅｄｉａｔｅｄ Ｎｕｃｌｅａｒ Ｅｘｐｏｒｔ ｂｙ Ｄｉｒｅｃｔ Ｂｉｎｄｉｎｇ ｔｏ ＣＲＭ１）”；Ｋｕｄｏら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）１９９９，９６（３），９１１２－９１１７，”レプトマイシンＢは、中央保存領域におけるシステイン残基における共有結合修飾により、ＣＲＭ１／エクスポーチンを不活性化する（Ｌｅｐｔｏｍｙｃｉｎ Ｂ ｉｎａｃｔｉｖａｔｅｓ ＣＲＭ１／ｅｘｐｏｒｔｉｎ １ ｂｙ ｃｏｖａｌｅｎｔ ｍｏｄｉｆｉｃａｔｉｏｎ ａｔ ａ ｃｙｓｔｅｉｎｅ ｒｅｓｉｄｕｅ ｉｎ ｔｈｅ ｃｅｎｔｒａｌ ｃｏｎｓｅｒｖｅｄ ｒｅｇｉｏｎ）”；Ｋｕｈｎｔ ら，Ａｐｐｌｉｅｄ Ｅｎｖｉｒｏｎ．Ｍｉｃｒｏｂｉｏｌ．１９９８，６４（２），７１４－７２０，”レプトマイシンＢによる、微生物変換生成物（Ｍｉｃｒｏｂｉａｌ Ｃｏｎｖｅｒｓｉｏｎ Ｐｒｏｄｕｃｔｓ ｏｆ Ｌｅｐｔｏｍｙｃｉｎ Ｂ）”；Ｌａｎｅら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔ’ｌ Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）２０００，９７，８５０１－８５０６，”小分子による、子宮頸癌中のｐ５３の活性化（Ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ｐ５３ ｉｎ ｃｅｒｖｉｃａｌ ｃａｒｃｉｎｏｍａ ｃｅｌｌｓ ｂｙ ｓｍａｌｌ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ）”；Ｍａｒａｂｅｓｅら．，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．２００３ ３１（２２），６６２４－６６３２，”ＤＮＡの損傷は、Ｅ２Ｆ１におけるＣ－ＥＢＰａの抑制を除去することにより、ｐ７３の転写活性化を誘導する（ＤＮＡ ｄａｍａｇｅ ｉｎｄｕｃｅｓ ｔｒａｎｓｃｒｉｐｔｉｏｎａｌ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ｐ７３ ｂｙ ｒｅｍｏｖｉｎｇ Ｃ－ＥＢＰａ ｒｅｐｒｅｓｓｉｏｎ ｏｎ Ｅ２Ｆ１）”；Ｍｅｉｓｓｎｅｒら，ＦＥＢＳ Ｌｅｔｔｅｒｓ ２００４，５７６（１－２），２７－３０，”ラトジャドン及びレプトマイシンＢは、同一のメカニズムによりＣＲＭ１－依存性核外輸送を遮断する（Ｒａｔｊａｄｏｎｅ ａｎｄ ｌｅｐｔｏｍｙｃｉｎ Ｂ ｂｌｏｃｋ ＣＲＭ１－ｄｅｐｅｎｄｅｎｔ ｎｕｃｌｅａｒ ｅｘｐｏｒｔ ｂｙ ｉｄｅｎｔｉｃａｌ ｍｅｃｈａｎｉｓｍｓ）”（要約）；Ｎｉｓｈｉら，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．１９９４，２６９（９），６３２０－６３２４，”レプトマイシンＢは、分裂酵母核蛋白質である、高次構造の染色体構造及び遺伝子発現に関与するｃｒｍ１の調節カスケードを標的とする（Ｌｅｐｔｏｍｙｃｉｎ Ｂ Ｔａｒｇｅｔｓ ａ Ｒｅｇｕｌａｔｏｒｙ Ｃａｓｃａｄｅ ｏｆ ｃｒｍ１，ａ Ｆｉｓｓｉｏｎ Ｙｅａｓｔ Ｎｕｃｌｅａｒ Ｐｒｏｔｅｉｎ，Ｉｎｖｏｌｖｅｄ ｉｎ Ｃｏｎｔｒｏｌ ｏｆ Ｈｉｇｈｅｒ Ｏｒｄｅｒ Ｃｈｒｏｍｏｓｏｍｅ Ｓｔｒｕｃｔｕｒｅ ａｎｄ Ｇｅｎｅ Ｅｘｐｒｅｓｓｉｏｎ）”；Ｐｅｅｈｌら，Ｐｒｏｓｔａｔｅ ２００３，５４，２５８－２６７，”レプトマイシンＢは、原発性前立腺上皮細胞内のｐ５３を活性化し、ＬＮｃａＰ細胞系内でアポトーシスを誘発する（Ｌｅｐｔｏｍｙｃｉｎ Ｂ Ｓｔａｂｉｌｉｚｅｓ ａｎｄ Ａｃｔｉｖａｔｅｓ ｐ５３ ｉｎ Ｐｒｉｍａｒｙ Ｐｒｏｓｔａｔｉｃ Ｅｐｉｔｈｅｌｉａｌ Ｃｅｌｌｓ ａｎｄ Ｉｎｄｕｃｅｓ Ａｐｏｐｔｏｓｉｓ ｉｎ ｔｈｅ ＬＮＣａＰ Ｃｅｌｌ Ｌｉｎｅ）”；及び２００４年１２月６日にアクセスした、Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ ｏｆ Ｄｕｎｄｅｅ，Ｄｅｐｔ．Ｓｕｒｇｅｒｙ ＆ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｏｎｃｏｌｏｇｙ，Ｌａｉｎ Ｇｒｏｕｐ のウェブサイト、ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ｄｕｎｄｅｅ．ａｃ．ｕｋ／ｓｕｒｇｅｒｙ／Ｎｏｎ－Ｇｅｎｏｔｏｘｉｃ．ｈｔｍ，”ｐ５３腫瘍抑制機能の遺伝毒性のない活性化（Ｎｏｎ－ｇｅｎｏｔｏｘｉｃ ａｃｔｉｖａｔｉｏｎ ｏｆ ｔｈｅ ｐ５３ ｔｕｍｏｒ ｓｕｐｐｒｅｓｓｏｒ ｆｕｎｃｔｉｏｎ）に開示されている。各文献は、全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【０３１８】

本発明の他の態様においては、ｓｉＲＮＡ分子は、薬剤に代わり、本発明の抗体に連結し得る。ｓｉＲＮＡｓは、オリゴヌクレオチドの修飾のために通常に用いられている方法により、本発明の抗体に連結し得る（例えば、米国特許出願公開第２００５０１０７３２５及び第２００７０２１３２９２号を参照されたい）。従って、その３’又は５’－ホス

ホラミダイト型内のｓｉＲＮＡは、ｓｉＲＮＡと架橋剤との間のエステル結合を与えるために、ヒドロキシル感応基を有する架橋剤の一方の末端と反応させることができる。同様に、ｓｉＲＮＡホスホラミダイトと末端アミノ基を有する架橋剤との反応は、アミンを介したｓｉＲＮＡへの架橋剤の連結をもたらす。また、ｓｉＲＮＡは、標準的な化学的手法により、チオ基を導入するように誘導体化され得る。このチオール含有ｓｉＲＮＡは抗体と反応し、活性なジスルフィド又はマレイミドを導入するように修飾され、開裂可能又は開裂不可能な複合体を産生し得る。１～２０個のｓｉＲＮＡ分子は、この方法により抗体と連結し得る。

【０３１９】

診断及び研究用途

【０３２０】

本明細書で議論する抗体の治療的使用に加え、本発明の抗体及び／又は断片は、多くの公知の診断及び研究用途に使用することができる。本発明の抗体及び又は断片は、例えば、インビボ及びインビボの療法の診断法に含まれる、ＣＤ２０の精製、検出及び標的化に用いることができる。例えば、抗体及び／又はその断片は、生物学的試料中の細胞により発現するＣＤ２０のレベルを定性的及び定量的に測定するための免疫アッセイにおいて用いることができる。例えば、全体が本明細書に参照として組み入れられる、Ｈａｒｌｏｗら，Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ（Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｐｒｅｓｓ，２ｎｄ ｅｄ．１９８８）を参照されたい。

【０３２１】

本発明の抗体は、例えば、競合的結合アッセイ、直接及び間接サンドウィッチアッセイ、並びに免疫沈降アッセイにおいて用いることができる（Ｚｏｌａ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ Ｍａｎｕａｌ ｏｆ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｐｐ．１４７－１５８（ＣＲＣ Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８７））。

【０３２２】

例えば、本発明は、ＣＤ２０が介在する病状を有するか、有することが疑わしいことが知られている患者におけるＣＤ２０を検出するための診断法において用いるために、後述するような、検出可能に標識された、上記抗－ＣＤ２０ペプチド及び抗体をも提供する。本発明の抗－ＣＤ２０ペプチド及び／又は抗体は、試料中のＣＤ２０又は抗－ＣＤ２０抗体を検出又は定量する免疫アッセイに有用である。ＣＤ２０のための免疫アッセイは、通常、ＣＤ２０に選択的に結合し得る、検出可能に標識された、本発明の高親和性抗－ＣＤ２０ペプチド及び／又は抗体の存在下に生物学的試料をインキュベートすること、並びに試料中で結合する標識されたペプチド又は抗体を検出することを含む。当該技術分野において、例えば、Ｉｍｍｕｎｏａｓｓａｙｓ ｆｏｒ ｔｈｅ ８０’ｓ，Ａ．Ｖｏｌｌｅｒら著，Ｕｎｉｖｅｒｓｉｔｙ Ｐａｒｋ，１９８１において開示されたような、種々の臨床的検査手技が周知である。従って、抗－ＣＤ２０ペプチド又は抗体又はその断片を、ニトロセルロース、又は細胞、細胞粒子若しくは可溶性蛋白質を固定化し得る、他の固体支持体に加えることができる。次いで、支持体を適切なバッファーで洗浄し、次いで検出可能に標識されたＣＤ２０－特異的ペプチド、又は抗体若しくはその断片で処理する。次いで、固相担体をバッファーで洗浄し、二度目には、結合していないペプチド又は抗体若しくはその断片を除去する。次いで、固相支持体上の結合したラベルの量を、公知の方法段階により検出し得る。

【０３２３】

「固体支持体」又は「担体」は、ペプチド、抗原、又は抗体若しくはその断片を結合し得る任意の担体を意味する。周知の支持体又は担体には、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然及び修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース及びマグネタイトが含まれる。担体の性質は、本発明の目的のために、ある程度可溶性であっても、不溶性であってもよい。支持体材料は、結合した分子が、ＣＤ２０、又は抗－ＣＤ２０抗体若しくはその断片に結合し得る限り、

任意の可能な構造配置を有していてもよい。従って、支持体の構造は、ビーズのような球状、試験管の内面又は棒の外面のような円筒形状であってもよい。また、表面は、シート、培養皿、試験紙等のような平面であってもよい。好ましい支持体には、ポリスチレンビーズが含まれる。当業者は、抗体若しくはその断片、ペプチド又は光源を結合するための他の多くの適切な担体を知り、所定の実験により同じものを確認することができるであろう。

【０３２４】

周知の方法段階により、所望の大量の抗－ＣＤ２０ペプチド及び／又は抗体若しくはその断片の結合活性を検出することができる。当業者は、所定の実験により、有効かつ最適なアッセイ条件を決定することができる。

【０３２５】

ＣＤ２０－特異的ペプチド及び／又は抗体若しくはその断片を検出可能に標識することは、酵素免疫測定法（ＥＩＡ）又は酵素免疫吸着測定法（ＥＬＩＳＡ）において用いるための酵素に連結することにより達成され得る。連結した酵素は、露出した基質と反応し、例えば、分光光度法、蛍光分析法又は視覚による手段によって検出し得る、化学的部分を生成する。本発明のＣＤ２０－特異的抗体若しくはその断片を検出可能に標識するための用い得る酵素には、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルター５－ステロイドイソメラーゼ、酵母アルコールデヒドロゲナーゼ、アルファ－グリセロホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、ベーターガラクトシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース－６－ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ及びアセチルコリンエステラーゼが含まれるが、これらに限定されない。

【０３２６】

ＣＤ２０－特異的抗体及び／又はその断片を放射性物質で標識することにより、放射免疫測定法（ＲＩＡ）の使用により、ＣＤ２０を検出することが可能である（例えば、Ｗｏｒｋら，Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ ａｎｄ Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｎｏｒｔｈ Ｈｏｌｌａｎｄ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｎ．Ｙ．（１９７８）を参照されたい）。放射性同位元素は、ガンマカウンター又はシンチレーションカウンターを使用する手段、又はオートラジオグラフィーにより検出することができる。本発明の目的のために特に有用な同位元素は：^{3}Ｈ、^{125}Ｉ、^{131}Ｉ、^{35}Ｓ、^{14}Ｃであり、好ましくは^{125}Ｉである。

【０３２７】

ＣＤ２０－特異的抗体及び又はその断片を、蛍光化合物により標識することも可能である。蛍光標識された抗体が適切な波長の光にさらされると、その存在は蛍光のために検出することができる。最も一般的に用いられる蛍光標識化合物は、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、フィコエリスリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、ｏ－フタルアルデヒド及びフルオレスカミンである。

【０３２８】

ＣＤ２０－特異的抗体又はその断片は、^{125}Ｅｕのような蛍光放射金属、又はランタニド系列の他のものを用いて検出可能に標識することもできる。これらの金属は、ジエチレントリアミンペンタ五酢酸（ＤＴＰＡ）又はエチレンジアミン四酢酸（ＥＤＴＡ）等の金属キレート基を用いて、ＣＤ２０－特異的抗体又はその断片に結合し得る。

【０３２９】

ＣＤ２０－特異的抗体又はその断片は、化学発光化合物との結合によって検出可能に標識することもできる。次いで、化学反応の経過の際に上昇する発光の存在を検出することにより、化学発光標識された抗体を検出する。特に有用な化学発光標識化合物の例は、ルミノール、イソルミノール、サロマティックアクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びシュウ酸エステルである。同様に、本発明のＣＤ２０－特異的抗体、

その断片若しくは誘導体を標識するために、生物発光化合物を用いることができる。生物発光は、触媒タンパク質が化学発光反応の効率を上昇させる、生体系中に見出されるタイプの化学発光である。発光の存在を検出することにより、生物発光タンパク質の存在を検出する。標識の目的のための重要な生物発光化合物は、ルシフェリン、ルシフェラーゼ及びエクオリンである。

【０３３０】

ＣＤ２０－特異的抗体、その断片若しくは誘導体の検出は、例えば、検出可能な標識が放射性ガンマ線放出体である場合はシンチレーションカウンターにより、標識が蛍光物質である場合は蛍光光度計により実施する。酵素標識の場合、検出は、酵素についての基質を使用する比色分析法により実施することができる。検出は、同様に調製した標準品と比較し、基質の酵素反応の程度の視覚的比較により実施することもできる。

【０３３１】

本発明の目的のために、上記アッセイにより検出されるＣＤ２０は、生物学的試料中に存在し得る。ＣＤ２０を含む、あらゆる試料を用いることができる。好ましくは、試料は、例えば、血液、血清、リンパ液、尿、炎症性滲出液、脳脊髄液、羊水、組織抽出物又はホモジネート等の体液である。しかし、本発明は、これらの試料を用いるアッセイに限定されず、当業者は、適切な条件を決定し、他の試料の使用を可能にすることができる。

【０３３２】

その場における検出は、患者から組織学的標本を除去し、このような標本に本発明の標識された抗体の組合せを提供することにより実施することができる。抗体又はその断片は、好ましくは、標識された抗体又はその断片を、生物学的試料に塗布又はかぶせることにより提供される。このような手段を用いることにより、ＣＤ２０の存在のみならず、検査した組織内のＣＤ２０の分布をも検出することが可能である。本発明を用いることにより、当業者は、このようなインサイチューにおける検出を実施するために、多種多様の組織学的方法（例えば、染色法）を修飾することができることを容易に理解するであろう。

【０３３３】

本発明の抗体又はその断片は、「ツーサイト」又は「サンドウィッチ」アッセイとしても知られている免疫測定法における利用に適合し得る。通常の免疫測定法においては、ある量の標識されていない抗体又はその断片を、試験を行う液体中で不溶性の固体支持体に結合させ、ある量の検出可能に標識された可溶性抗体を加え、固相抗体、抗原及び標識抗体の間に形成された三元複合体の検出及び／又は定量化を可能にする。

【０３３４】

通常、また好ましくは、免疫測定法には、固相に結合した抗体を、試験を行う試料と最初に接触させ、二成分の固相抗体－ＣＤ２０複合体の形成により、試料からＣＤ２０を抽出する、「フォワード」アッセイが含まれる。適切なインキュベーション時間の後、固体支持体を洗浄し、未反応のＣＤ２０を含む液体試料の残渣を除去し、次いで、既知量の標識抗体（「レポーター分子」として機能する）を含む溶液と接触させる。２度目のインキュベーションの後、標識抗体と、未反応の抗体又はその断片を介して固体支持体に結合したＣＤ２０との複合体を形成し、固体支持体を２度洗浄し、未反応の標識抗体又はその断片を除去した。このタイプのフォワードサンドウィッチアッセイは、ＣＤ２０が存在するか否かを決定するための簡単な「陽／陰」のアッセイであるか、又は標識抗体又はその断片の量を、既知量のＣＤ２０を含む標準試料について得られたものと比較することにより定量することができる。このような「ツーサイト」又は「サンドウィッチ」アッセイは、Ｗｉｄｅ（Ｒａｄｉｏｉｍｍｕｎｅ Ａｓｓａｙ Ｍｅｔｈｏｄ，Ｋｉｒｋｈａｍ編，Ｌｉｖｉｎｇｓｔｏｎｅ，Ｅｄｉｎｂｕｒｇｈ，１９７０，ｐｐ．１９９－２０６）により開示されている。

【０３３５】

ＣＤ２０のためにも有用であり得る１つのタイプの「サンドウィッチ」アッセイは、いわゆる「同時」及び「リバース」アッセイである。同時アッセイは、固体支持体に結合した抗体、及び標識抗体を、いずれも試験を行う試料に同時に加える、１回のインキュベー

ション工程を含む。このインキュベーションが完了した後、固体支持体を洗浄し、残りの液体試料及び複合体を形成していない標識抗体を除去する。次いで、従来の「フォワード」サンドウィッチアッセイにおけるようにして、固体支持体と結合する標識抗体の存在を検出する。

【０３３６】

「リバース」アッセイにおいては、標識抗体の溶液を最初に液体試料に滴下して加え、次いで、適切なインキュベーション時間の後に、固体支持体に結合した未標識抗体を添加することが利用される。２度目のインキュベーションの後、固相を従来の方法により洗浄し、試験を行う試料の残渣及び未反応の標識抗体の溶液を除去する。次いで、固体支持体に結合する標識抗体の検出を、「同時」及び「フォワード」アッセイにより実施する。一つの態様においては、分離エピトープについて特異的な本発明の抗体の組合せを用いて、感受性のスリーサイト免疫放射測定アッセイを構築することができる。

【０３３７】

本発明の抗体又はその断片は、インビボにおける画像処理にも有用である。放射線不透過剤又は放射性同位元素のような、検出可能な部分で標識した抗体又はその断片を被験者に、好ましくは血流に投与し、宿主内の標識抗体の存在及び位置をアッセイする。画像処理技術は、悪性腫瘍の病期診断及び治療に有用である。抗体又はその断片は、宿主内で、核磁気共鳴、放射線医学、又は当該技術分野において公知の他の検出法により、検出可能な任意の部分で標識される。

【０３３８】

標識は、直接的又は間接的に検出可能なシグナルを生成し得る、任意の検出可能な部分であってもよい。例えば、標識は、ビオチン標識、酵素標識（例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼ及びセイヨウワサビペルオキシダーゼ）、放射標識（例えば、^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ及び^{125}Ｉ）、蛍光又は化学発光化合物（例えば、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン）のようなフルオロフォア、造影剤（例えば、Ｔｃ－ｍ９９及びインジウム（^{111}Ｉｎ））及び金属イオン（例えば、ガリウム及びユーロピウム）であってもよい。

【０３３９】

抗体又はその断片を標識と結合させるための当該技術分野における、あらゆる方法を使用することができ、これらは、Ｈｕｎｔｅｒら，１９６２，Ｎａｔｕｒｅ １４４：９４５；Ｄａｖｉｄら，１９７４，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ １３：１０１４；Ｐａｉｎら，１９８１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．４０：２１９；Ｎｙｇｒｅｎ，Ｊ．，１９８２，Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．ａｎｄ Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．３０：４０７により開示された典型的な方法を含む。

【０３４０】

本発明の抗体又はその断片は、細胞内におけるＣＤ２０の機能の阻害に基づき、生物学的研究における試薬としても有用である。

【０３４１】

本発明の抗体又はその断片は、親和性生成試薬としても有用である。この過程においては、例えば、当該技術分野において周知の方法を用いて、抗体を適切な支持体、例えば、Ｓｅｐｈａｄｅｘ樹脂又はろ紙に固定化する。従って、ＣＤ２０は、生物学的試料から分離され、精製され得る。

【０３４２】

本発明は、更に、本発明の抗体若しくはその断片、又はそのエピトープ結合断片をコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを提供する。

【０３４３】

本発明は、
ＣＤ２０と結合し、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件下に、本発明の抗体又はその断片をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズし得るポリペプチドをコードするポリヌクレオチドをも包含し、前記ストリンジェントなハイブリダイゼーション条

件は、６×ＳＳＣ、０．５％　ＳＤＳ、５×デンハート溶液、及び１００μｇ／ｍＬの熱変性したサケ精子ＤＮＡ中、６０℃で２時間プレハイブリダイゼーションし；６０℃で１８時間ハイブリダイゼーションし；４×ＳＳＣ、０．５％　ＳＤＳ、０．１％　ピロリン酸ナトリウム中で３０分間、２回洗浄し、２×ＳＳＣ、０．１％　ＳＤＳ中、６０℃で３０分間、２回洗浄することを含む。

【０３４４】

ポリヌクレオチドが得られ、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列は、当該技術分野において公知の任意の方法により決定することができる。例えば、本明細書に示される抗体又はその断片のヌクレオチド配列を用い（例えば、Ｋｕｔｍｅｉｅｒら、１９９４，ＢｉｏＴｅｃｈｎｉｑｕｅｓ　１７：２４２）、化学的に合成したオリゴヌクレオチドから抗体をコードするヌクレオチドを組み立てることができる。すなわち、抗体をコードする配列の一部を含む重複オリゴヌクレオチドを合成し、これらのオリゴヌクレオチドをアニーリング及び連結し、次いでＰＣＲによる連結オリゴヌクレオチドを増幅することを含む。

【０３４５】

抗－ＣＤ２０抗体を含む組換えベクターの構築、又は配列、並びに適切な転写及び翻訳制御シグナルをコードする断片の構築のための方法は当該技術分野において周知である。これらの方法には、例えば、インビトロ組換えＤＮＡ技術、合成技術、及びインビボ遺伝子組み換えが含まれる。従って、本発明は、プロモーターに動作可能に連結した、本発明の抗体分子、又はその重若しくは軽鎖、又は重若しくは軽鎖可変領域、又はそれらのエピトープ結合断片をコードするヌクレオチド配列を含む複製可能なベクターを提供する。

【０３４６】

組換えベクターを、従来の技術により宿主細胞に形質移入し、次いで、従来の技術により形質移入細胞を培養し、本発明の抗体を生産させる。従って、本発明は、異種プロモーターに動作可能に連結した、本発明の抗体、又はそのエピトープ結合断片をコードするポリヌクレオチドを含む宿主細胞を包含する。好ましい態様においては、重及び軽鎖の両方をコードするベクターは、完全な免疫グロブリン分子を発現するために、宿主細胞内で共発現し得る。

【０３４７】

本発明の抗－ＣＤ２０抗体又は断片分子を発現させるために、種々の宿主－発現ベクター系を利用することができる。このような宿主－発現系は、興味のあるコード配列が生成され、次いで精製されるが、適切なヌクレオチドコード配列により形質転換又は形質移入された場合に、インサイチューで本発明の抗体分子を発現し得る細胞を示す、媒体を表す。これらには、抗体コード配列を含む、組換えバクテリオファージＤＮＡ、プラスミドＤＮＡ又はコスミドＤＮＡ発現ベクターで形質転換された細菌（例えば大腸菌、枯草菌）のような微生物；抗体コード配列を含む、組換え酵母発現ベクターで形質転換された酵母（例えば、サッカロミセス、ピチア）；抗体コード配列を含む組換えウィルス発現ベクター（例えばバキュロウィルス）で感染させた昆虫細胞系；組換えウィルス発現ベクター（例えばカリフラワーモザイクウィルス、ＣａＭＶ；タバコモザイクウィルス、ＴＭＶ）で感染させた、又は抗体コード配列を含む組換えプラスミド発現ベクター（例えばＴｉプラスミド）で形質転 換した植物細胞系；又は哺乳類細胞のゲノム由来のプロモーター（例えばメタロチオネインプロモーター）又は哺乳類ウィルス由来のプロモーター（例えばアデノウィルス遅発性プロモーター；ワクシニアウィルス７．５Ｋプロモーター）を含む組換え発現構築物を含む哺乳類細胞系（例えばＣＯＳ、ＣＨＯ、ＢＨＫ、２９３、３Ｔ３細胞）が含まれる。

【０３４８】

好ましくは、大腸菌のような細菌細胞、より好ましくは真核細胞が、組換え抗体分子の発現のために、特に完全な組換え抗体分子の発現のために用いられる。例えば、ヒトサイトメガロウィルスからの主要中間体初期遺伝子プロモーター要素のようなベクターと併用される、チャイニーズハムスター卵巣細胞ＣＨＯのような哺乳動物細胞が、抗体の効果的な発現系である（Ｆｏｅｃｋｉｎｇら，１９８６，Ｇｅｎｅ　４５：１０１；Ｃｏｃｋｅ

ｔｔら，１９９０，Ｂｉｏ／Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ　８：２）。

【０３４９】

組換えタンパク質の長期の高収率生産のためには、安定した発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定して発現する細胞系が作出され得る。ウィルス複製起点を含む発現ベクターを用いるよりはむしろ、宿主細胞を、適切な発現制御因子（例えばプロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位等）及び選択可能マーカーにより制御されたＤＮＡで形質転換することができる。外来ＤＮＡの導入後、作出された細胞を改良培地で１～２日間増殖し、次いで選択培地に移す。組換えプラスミドの選択可能マーカーにより、選択に耐性が付与され、細胞は、安定にプラスミドをそれらの染色体に組込むことができ、且つクローニングされ及び細胞株に拡充されうる増殖巣を形成するために増殖し得る。この方法は、抗体分子を発現する細胞株を作出するために有利に用いられる。このように作出された細胞株は、抗体分子と直接又は非直接的に相関する化合物のスクリーニング及び評価に特に有用であり得る。

【０３５０】

いったん、本発明の抗体分子が組換え的に発現されると、免疫グロブリン分子の精製について当該技術分野で公知の任意の方法、例えば、クロマトグラフィー（例えば、イオン交換、親和性、特にプロテインＡの後の特異的抗原についての親和性により、また、サイズ処理カラムクロマトグラフィー）、遠心分離、溶解度の差、又はタンパク質の精製のための任意の他の標準的技術により精製することができる。これに関し、米国特許第７，３５８，１９５号は、本発明の開示に言及し、その教示は参照により本明細書に組み入れられる。

【０３５１】

他の態様においては、本明細書に開示された、又は当該技術分野において公知の方法を用い、特定の一連のＣＤＲｓをフランクする可変及び定常領域内での、変異、欠失及び／又は挿入により、種々の抗体及び抗体断片、並びに抗体模倣体を容易に作出することができる。従って、例えば、種々のクラスのＡｂは、種々の重鎖の置換により、所定の一連のＣＤＲｓのために可能であり、これにより、例えば、ＩｇＧ１－４、ＩｇＭ、ＩｇＡ－２、ＩｇＤ、ＩｇＥ抗体型及びイソ型を産生し得る。同様に、完全な合成フレームワーク内の所定の一連のＣＤＲｓに組み込むことにより、本発明の範囲内の人工抗体を製造することができる。本明細書で用いられる場合、「可変」という用語は、抗体中の配列が異なり、その抗原についてのそれぞれ特定の抗体の結合及び特異性において用いられる、可変領域の特定の部分を意味する。しかし、可変性は、通常は、抗体の可変領域を通じて均一に分配されていない。それは、相補性決定領域（ＣＤＲｓ）と呼ばれる３つの部分、又は軽鎖及び重鎖の可変領域の両方の超可変領域に集中している。可変領域のより高度に保存されている部分はフレームワーク（ＦＲ）と呼ばれる。重及び軽鎖の可変領域は、それぞれ３つのＣＤＲｓに連結している、主としてベーターシート構造をとる４つのフレームワーク領域を含み、ある場合には、ベーターシート構造の一部を形成する。核鎖内のＣＤＲｓは、ＲＦ領域及び他の鎖からのＣＤＲｓにごく接近して一緒に保持されており、抗体の抗原結合部位の形成に寄与している（Ｅ．Ａ．Ｋａｂａｔら　Ｓｅｑｕｅｎｃｅｓ　ｏｆ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ　ｏｆ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｔｅｒｅｓｔ，第５版，１９９１，ＮＩＨ）。定常領域は、抗原の抗体との結合に直接関与していないが、抗体依存性細胞毒性における抗体の関与のような、種々のエフェクター機能を示す。

【０３５２】

ヒト化抗体、又は他の哺乳動物により拒絶されないように適合させた抗体は、再表面形成及びＣＤＲ移植のような、数種の技術を用いて製造することができる。再表面形成技術においては、分子モデリング、統計分析及び突然変異生成を組み合わせ、可変領域の非ＣＤＲ表面を、標的宿主の既知の抗体の表面に類似するように調節する。抗体を再表面形成する計画及び方法、並びに種々の宿主内の抗体の免疫原性を低下させる他の方法は、米国特許第５，６３９，６４１号に開示されており、その全体の開示は参照により本明細書に組み入れられる。

【０３５３】
本発明は、本明細書に開示した抗体の機能的同等物をも含む。機能的同等物はこれらの抗体と同程度の結合特性を有し、例えば、キメラ、ヒト化及び１本鎖抗体並びにそれらの断片を含む。このような機能的同等物を製造する方法は、ＰＣＴ出願ＷＯ９３／２１３１９、欧州特許出願第２３９，４００号；ＰＣＴ出願ＷＯ８９／０９６２２；欧州特許出願第３３８，７４５号；及び欧州特許出願第３３２，４２４号に開示されており、その全体の開示は参照により本明細書に組み入れられる。
【０３５４】
機能的同等物は、本発明の抗体の可変又は超可変領域のアミノ酸配列と実質的に同一のアミノ酸配列を有するポリペプチドを含む。アミノ酸配列に適用される「実質的に同一の」は、本明細書においては、Ｐｅａｒｓｏｎ及びＬｉｐｍａｎ，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ ８５，２４４４－２４４８（１９８８）によるＦＡＳＴＡサーチ法により決定し、他のアミノ酸配列と少なくとも約９０％、更に好ましくは少なくとも約９５％の配列同一性を有する配列として定義される。
【０３５５】
キメラ抗体は好ましくは、実質的に又は専らヒト抗体定常域に由来する定常領域及び実質的に又は専らヒト以外の哺乳動物の可変域配列に由来する可変域を有する。抗体のヒト化型は、例えば、マウス抗体の相補性決定領域をヒトフレームワークドメイン中に置換することにより製造される。例えば、ＰＣＴ公開第Ｗ０９２／２２６５３号を参照されたい。ヒト化抗体は、好ましくは、実質的に又は専ら対応するヒト抗体領域に由来する定常領域及び相補性決定領域（ＣＤＲｓ）以外の可変領域、並びに実質的に又は専らヒト以外の哺乳動物に由来するＣＤＲを有する。
【０３５６】
機能性同等物は、１本鎖抗体（ｓｃＦｖｓ）としても知られる１本鎖抗体断片をも含む。これらの断片は、１つ又はそれ以上の相互接続リンカーを用いて、又は用いずに、少なくとも１つの抗体可変軽鎖配列（V_L）の断片と連結された少なくとも１つの抗体可変重鎖配列（V_H）の断片を含む。このようなリンカーは、短いフレキシブルなペプチドであって、（V_L）と（V_H）ドメインが連結されるとそれらの適当な３次元フォールディングが起こり、１本鎖抗体断片が誘導された元の全抗体の標的分子結合特異性を維持することを確保するように選択することができる。一般に、（V_L）又は（V_H）配列のカルボキシル末端を、このようなペプチドリンカーにより相補的な（V_L）及び（V_H）配列のアミノ酸末端と共有結合で連結してもよい。１本鎖抗体断片は、分子クローニング、抗体ファージディスプレイライブラリー又は類似の技術により製造することができる。これらのタンパク質は、真核生物細胞又は細菌を含む原核生物細胞のいずれで産生させてもよい。
【０３５７】
１本鎖抗体断片は、本明細書に開示された記載の全抗体の可変又は相補性決定領域（ＣＤＲｓ）の少なくとも１つを有するが、これらの抗体の定常領域の一部又は全てを欠失している。これらの定常領域は抗原結合に必要ではないが、全抗体構造の主要部を構成する。従って、１本鎖抗体断片は、定常領域の一部又は全てを含有する抗体の利用に関連するいくつかの問題を克服し得る。例えば、１本鎖抗体断片は、生物学的分子と重鎖定常領域との間の望ましくない相互作用、又は他の望ましくない生物学的活性を有しない傾向がある。更に、１本鎖抗体フラグメントは全抗体よりかなり小さく、従って、より大きい毛細管透過性を有するので、１本鎖抗体断片が局在化して標的抗原結合部位とより効率的に結合することが可能になる。また、抗体断片は真核生物細胞において比較的大規模に生産することができるので、その生産が容易になる。更に、１本鎖抗体断片は比較的サイズが小さいので、全抗体より受容者の免疫応答を引き起す可能性が低い。
【０３５８】
本明細書に開示された抗－ＣＤ２０抗体及びそのヒト化変異体に対するアミノ酸及び核酸配列の知識を利用し、ヒトＣＤ２０とも結合する他の抗体を開発することができる。い

くつかの研究は、１又はそれ以上のアミノ酸の変異を、抗体の配列の種々の位置に導入することの影響を、１次抗体配列の知識に基づいて、例えば結合及び発現のレベルのような特性について調査している（Ｙａｎｇ，Ｗ．Ｐ．ら，１９９５，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２５４，３９２－４０３；Ｒａｄｅｒ，Ｃ．ら，１９９８，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９５，８９１０－８９１５；Ｖａｕｇｈａｎ，Ｔ．Ｊ．ら，１９９８，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１６，５３５－５３９）。

【０３５９】

これらの研究において、オリゴヌクレオチドが介在する位置指定突然変異誘発、カセット突然変異誘発、エラーが発生しやすい（ｅｒｒｏｒ－ｐｒｏｎｅ）ＰＣＲ、ＤＮＡ　シャッフリング、又は大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）の変異誘発株のような方法を用いて、ＣＤＲ１、ＣＤＲ２、ＣＤＲ３、またはフレームワーク領域の重及び軽鎖遺伝子の配列を変えることにより、１次抗体の変異体が生成されている（Ｖａｕｇｈａｎ，Ｔ．Ｊ．ら，１９９８，Ｎａｔｕｒｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，１６，５３５－５３９；Ａｄｅｙ，Ｎ．Ｂ．ら，１９９６，第１６章，ｐｐ．２７７－２９１，ｉｎ「ペプチド及びタンパク質のファージディスプレイ（Ｐｈａｇｅ　Ｄｉｓｐｌａｙ　ｏｆ　Ｐｅｐｔｉｄｅｓ　ａｎｄ　Ｐｒｏｔｅｉｎｓ）」，Ｋａｙ，Ｂ．Ｋ．ら編，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ）。１次抗体の配列を変えるこれらの方法は、２次抗体の親和性の改良をもたらしている（Ｇｒａｍ，Ｈ．ら，１９９２，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，８９，３５７６－３５８０；Ｂｏｄｅｒ，Ｅ．Ｔ．ら，２０００，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９７，１０７０１－１０７０５；Ｄａｖｉｅｓ，Ｊ．及びＲｉｅｃｈｍａｎｎ，Ｌ．，１９９６，Ｉｍｍｕｎｏｔｅｃｈｎｏｌｇｙ，２，１６９－１７９；Ｔｈｏｍｐｓｏｎ，Ｊ．ら，１９９６，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２５６，７７－８８；Ｓｈｏｒｔ，Ｍ．Ｋ．ら，２００２，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７７，１６３６５－１６３７０；Ｆｕｒｕｋａｗａ，Ｋ．ら，２００１，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６，２７６２２－２７６２８）。

【０３６０】

全体が参照として本明細書に組み入れられる、特許出願第２００９０２４６１９５号に開示された方法のような抗体の１又はそれ以上のアミノ酸残基を代える、類似の直接的方法により、本発明に開示されている抗体配列は、機能の向上した抗－ＣＤ２０抗体を開発するために用いることができる。

【０３６１】

Ｈｕｎｔｅｒ，ら，Ｎａｔｕｒｅ　１４４：９４５（１９６２）；Ｄａｖｉｄら，Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ　１３：１０１４（１９７４）；Ｐａｉｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈ．４０：２１９（１９８１）；及びＮｙｇｒｅｎ，Ｊ．Ｈｉｓｔｏｃｈｅｍ．ａｎｄ　Ｃｙｔｏｃｈｅｍ．３０：４０７（１９８２）に開示された、これらの方法を含む、検出可能な部分に抗体を連結させるための当該技術分野において公知の任意の方法を使用することができる。

【０３６２】

本発明の抗体は、競合的結合アッセイ、直接及び間接的サンドウィッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイのような、任意の公知のアッセイ法において使用することができる（Ｚｏｌａ，Ｍｏｎｏｃｌｏｎａｌ　Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｍａｎｕａｌ　ｏｆ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，ｐｐ．１４７－１５８（ＣＲＣ　Ｐｒｅｓｓ，Ｉｎｃ．，１９８７））。

【０３６３】

本発明の抗体は、放射線不透過剤又は放射性同位元素のような、検出可能な部分で標識した抗体を被験者に、好ましくは血流に投与し、宿主内の標識抗体の存在及び位置をアッセイする、インビボにおける画像処理にも有用である。画像処理技術は、悪性腫瘍の病期診断及び治療に有用である。抗体は、宿主内で、核磁気共鳴、放射線医学、又は当該技術分野において公知の他の検出法により、検出可能な任意の部分で標識される。

【０３６４】

本発明の抗体は、親和性精製剤としても有用である。この過程においては、抗体を、当該技術分野において周知の方法を用いて、Ｓｅｐｈａｄｅｘ樹脂又はろ紙のような適切な支持体に固定化支持体に固定化する。

【０３６５】

治療への適用

本発明は、ＣＤ２０を発現する細胞の増殖を阻害する方法をも含む。これらの方法は、本発明の抗体又は断片又は複合体を使用し、並びに本発明の抗体又は断片又は免疫複合体を１又はそれ以上の追加の治療薬と併用して使用する。適切な治療薬には、ＣＤ２０を発現する細胞の増殖を直接的又は間接的に阻害するものが含まれる。

【０３６６】

本明細書で用いられる場合、「阻害する」及び「阻害すること」という用語は、細胞死を含む、細胞増殖における任意の阻害効果を含むものと理解すべきである。阻害効果には、一時的な効果、持続的な効果、及び恒久的な効果が含まれる。

【０３６７】

本発明の治療的適用には、疾患を患っている被験者の治療法が含まれる。本発明の方法により治療される疾患は、ＣＤ２０の発現により特徴づけられるものである。このような疾患には、ＣＤ２０陽性Ｂ細胞が、疾患の病態生理学において役割を果たしている、非ホジキンリンパ腫、Ｂ－細胞慢性リンパ性白血病及び急性リンパ性白血病のようなＢ細胞性悪性腫瘍、並びにＲＡを含む非悪性自己免疫又は炎症性疾患が含まれる。当業者は、本発明の方法が、開示されていないが、ＣＤ２０の発現によって特徴づけられている他の疾患の治療にも用いることができることを理解するであろう。

【０３６８】

本発明の治療的適用は、インビトロ及びエクスビボにおいても実施することができる。

【０３６９】

インビトロにおける使用例には、Ｂ－細胞系列の細胞のようなＣＤ２０－陽性細胞が混入した細胞集団の精製が含まれる。この方法は、細胞毒性ｈｕＣＤ２０－７複合体の存在下に細胞集団を培養し、次いで、死滅したＣＤ２０－陽性細胞を除去することを含む。非臨床インビボにおける使用の条件は周知である（例えば、Ｕｃｋｕｎら，１９８６，Ｊ Ｅｘｐ．Ｍｅｄ．１６３，３４７－３６８；Ｕｃｋｕｎら，１９８５，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３４，３５０４－３５１５；Ｒａｍａｋｒｉｓｈｎａｎら，１９８５，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１３５，３６１６－３６２２を参照されたい）。

【０３７０】

支持体に結合した、本発明の抗体、断片及び領域、断片又は誘導体は、液体又は組織又は細胞抽出物からＣＤ２０を除去するためにも用いることができる。好ましい態様においては、それらは、血液又は血漿産物からＣＤ２０を除去するために用いられる。他の好ましい態様においては、マウス及びキメラ抗体、断片及び領域は、当該技術分野において公知の体外免疫吸着装置において有利に用いられる（例えば、Ｓｅｍｉｎａｒｓ ｉｎ Ｈｅｍａｔｏｌｏｇｙ，２６（２ Ｓｕｐｐｌ．１）（１９８９）を参照されたい）。患者の血液又は他の体液を結合抗体にさらし、循環するＣＤ２０（遊離型又は免疫複合体）の部分的又は完全な除去をもたらし、液体を身体に戻す。この免疫沈降は、細胞遠心分離工程を介入させるか、又はさせないで、連続的に流れる配置において実施することができる。例えば、Ｔｅｒｍａｎら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．１１ ７：１９７１－１９７５（１９７６）を参照されたい。

【０３７１】

本発明は、抗体又は複合体を、薬学的に許容される剤形で被験者に投与する、本発明の抗体又は複合体の治療的適用をも含む。それらは、急速静注として、又は長時間の連続注入により、筋肉内、皮下、関節内、滑膜内、くも膜下腔内、経口、局所又は吸入経路により、投与することができる。それらは、局所並びに全身的治療効果に影響を及ぼすために、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内、又は病変部周囲経路により投与してもよい。

【０３７２】

医薬製剤

治療的適用のために、本発明の抗体又は複合体を、薬学的に許容される剤形において、被験者に投与する。それらは、急速静注として、又は長時間の連続注入により、筋肉内、皮下、関節内、滑膜内、くも膜下腔内、経口、局所又は吸入経路により、投与することができる。抗体又は複合体は、局所並びに全身的治療効果に影響を及ぼすために、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内、又は病変部周囲経路により投与してもよい。適切な薬学的に許容される担体、希釈剤及び賦形剤は周知であり、臨床的症状の認可として、当業者によって決定され得る。適切な担体、希釈剤及び／又は賦形剤の例には：（１）約１ｍｇ／ｍＬ～２５ｍｇ／ｍＬのヒト血清アルブミンを含むダルベッコのリン酸緩衝生理食塩水、ｐＨ約７．４、（２）０．９％食塩水（０．９％ｗ／ｖ　ＮａＣｌ）、（３）５％（ｗ／ｖ）ブドウ糖及び（４）１０ｍＭ　ヒスチジン硫酸塩　ｐＨ５．８、６％ショ糖、０．０２％ポリソルベート２０が含まれる。

【０３７３】

凍結乾燥するよりも、液状の剤形で存在する場合、抗体又は複合体は、通常、約０．１ｍｇ／ｍＬ～１００ｍｇ／ｍＬの濃度で製剤化されるが、この範囲外の変形は許容される。疾患の治療のために、適切な抗体又は断片又は複合体の適切な用量は、治療すべき疾患のタイプ、前記に定義したように、疾患の重症度及び経過、予防又は治療目的のために抗体又は複合体を投与したかどうか、以前の治療の経過、患者の病歴及び治療に対する応答、並びに主治医の裁量に依存するであろう。抗体又は断片又は複合体は、適切には、一度に、又は一連の治療にわたって患者に投与される。

【０３７４】

疾患のタイプ及び重症度に依存し、患者の体重１ｋｇあたり約０．０１５～２５ｍｇの抗体又は複合体が、患者に対する投与についての最初の候補用量であるが、例えば、１回又はそれ以上の分割投与によるか、又は連続注入によって投与する。数日又はそれ以上にわたる繰り返し投与については、症状に依存し、書状の疾患症状の抑制が生じるまで治療を繰り返す。しかし、他の用量計画も有用であり、排除すべきでない。

【０３７５】

肺投与のためには、好ましくは、少なくとも１種の抗－ＣＤ２０抗体又は抗体断片又は複合体組成物は、肺又は血脈とうの下気道に達するために効果的な粒径で送達される。本発明によれば、少なくとも１種の抗－ＣＤ２０抗体又は抗体断片又は複合体組成物は、吸入による治療薬の投与について当該技術分野で公知の、任意の種々の吸入又は鼻内噴霧装置により送達することができる。患者の鼻腔又は胃小窩においてエアロゾル化した製剤を沈着し得るこれらの装置には、定量吸入器、噴霧器、ドライパウダー発生器、噴霧器等が含まれる。抗体の肺又は鼻投与に向けるのに適した他の装置は当該技術分野においても公知である。エアロゾルにおける抗体の投薬のための投与に適した製剤のための全てのこのような装置を用いることができる。このようなエアロゾルは、溶液（水性及び非水性の両方）又は固体粒子のいずれかを含み得る。Ｖｅｎｔｏｌｉｎ（登録商標）定量吸入器のような定量吸入器は、通常は噴射剤を用い、吸息の際に作動を必要とする（例えば、ＷＯ９４／１６９７０、ＷＯ９８／３５８８８を参照されたい）。Ｔｕｒｂｕｈａｌｅｒ（登録商標）（Ａｓｔｒａ）、Ｒｏｔａｈａｌｅｒ（登録商標）（Ｇｌａｘｏ）、Ｄｉｓｋｕｓ（登録商標）（Ｇｌａｘｏ）、Ｓｐｉｒｏｓ（登録商標）吸入器（Ｄｕｒａ）、Ｉｎｈａｌｅ　Ｔｈｅｒａｐｅｕｔｉｃｓにより市販されている装置、及びＳｐｉｎｈａｌｅｒ（登録商標）粉末吸入器（Ｆｉｓｏｎｓ）のようなドライパウダー吸入器は、混合粉末の呼吸－作動を用いる（全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第Ｎｏ．４，６６８，２１８号　Ａｓｔｒａ、ＥＰ　２３７５０７　Ａｓｔｒａ、ＷＯ　９７／２５０８６　Ｇｌａｘｏ、ＷＯ９４／０８５５２　Ｄｕｒａ、米国特許第５，４５８，１３５号　Ｉｎｈａｌｅ、ＷＯ　９４／０６４９）。ＡＥＲＸＴＭ　ＡＲＡＤＩＧＩＮ，ＴＨＥ　ＵＬＴＲＡＶＥＮＴＴＭ噴霧器（ＭＡＬＬＩＮＣＫＲＯＤＴ）、及びＡＣＯＲＮ　ＩＩＴＭ噴霧器（ＭＡＲＱＵＥＳＴ　ＭＥＤＩＣＡＬ　ＰＲＯＤＵＣＴＳ）（全体が参照により本明細書に組み入れられる米国特許第５，４０４，８７１号ＡＲＡＤＩＧＭ、ＷＯ９７／２

２３７６）のような噴霧器は溶液からエアロゾルを形成するが、定量吸入装置、ドライパウダー吸入器等は、一般に小粒子エアロゾルを形成する。市販の吸入装置の具体例は、本発明の実施に適した特定の装置の代表を意味し、本発明の範囲を限定することを意図していない。好ましくは、少なくとも１種の抗－ＣＤ２０抗体又は断片又は複合体を含む組成物は、ドライパウダー吸入器等又は噴霧器により送達される。本発明の少なくとも１種の抗体を投与するための吸入装置についていくつかの所望の特徴がある。例えば、吸入装置による送達は、有利には信頼され、再現性があり、正確である。吸入装置は、良好な呼吸のために、例えば、約１０μｍ未満、好ましくは約１～５μｍの小さい乾燥粒子を送達してもよい。

【０３７６】

粘膜表面を通した吸収のために、少なくとも１種の抗－ＣＤ２０抗体又は断片又は複合体を投与するための組成物及び方法は、エマルション粒子の粘膜接着を達成することにより粘膜表面を通した吸収を促進する、多数のサブミクロン粒子、粘膜接着性高分子、生物学的に活性なペプチド、及び水性連続相を含むエマルションを含有する（米国特許第５，５１４，６７０号）。本発明のエマルションの塗布に適した粘膜表面には、角膜、結膜、頬、舌下、膣、肺、胃、腸、及び直腸の投与経路を含み得る。膣又は直腸投与のための製剤、例えば座薬は、賦形剤、例えば、ポリアルキレングリコール、ワセリン、カカオ脂を含有してもよい。鼻内投与のための製剤は固体であってもよく、これに、例えば乳糖を賦形剤として含有させてもよく、又は鼻液滴の水性若しくはは油性溶液であってもよい。口腔投与のためには、賦形剤には、糖類、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、あらかじめゼラチン状にしたデンプン等が含まれる（米国特許第５，８４９，６９５号）。

【０３７７】

経皮投与のためには、少なくとも１種の抗－ＣＤ２０抗体を送達用デバイス、例えばリポソーム又は重合体ナノ粒子、微小粒子、マイクロカプセル又は微小球（特に明記しない限り、集合的に微小粒子と呼ぶ）の中に封じ込める。多くの適切な装置が公知であり、それには合成重合体、例えばポリヒドロキシ酸、例えばポリ乳酸、ポリグリコール酸及びこれらの共重合体、ポリオルトエステル、ポリ無水物及びポリホスファゼン等、並びに天然重合体、例えばコラーゲン、ポリアミノ酸、アルブミン及び他のタンパク質、アルギン酸塩及び他の多糖等、並びにこれらの組み合わせで製造されている微小粒子が含まれる（米国特許第 ５，８１４，５９９号）。

【０３７８】

本明細書に引用される全ての出版物又は特許は、全体が参照として本明細書に組み入れられ、当該技術分野の状態の証拠である。出版物は、任意の科学又は特許の出版物、又は全ての記録された、電子的、又は印刷された形式を含む、あらゆるメディア形式において利用できる他の任意の情報を意味する。以下の文献は、特に、本明細書に開示されたような、抗－ＣＤ２０抗体、断片、複合体、薬剤、組成物の製造に関連する内容に対して、全体が参照として本明細書に組み入れられる：Ａｕｓｕｂｅｌら編，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｂｉｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．（１９８７－２００１）；Ｓａｍｂｒｏｏｋら，Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ Ｃｌｏｎｉｎｇ：Ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，２．ｓｕｐ．ｎｄ Ｅｄｉｔｉｏｎ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）；Ｈａｒｌｏｗ ａｎｄ Ｌａｎｅ，ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ，ａ Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ Ｍａｎｕａｌ，Ｃｏｌｄ Ｓｐｒｉｎｇ Ｈａｒｂｏｒ，Ｎ．Ｙ．（１９８９）；Ｃｏｌｌｉｇａｎら編，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，Ｉｎｃ．，Ｎ．Ｙ．（１９９４－２００１）；Ｃｏｌｌｉｇａｎら，Ｃｕｒｒｅｎｔ Ｐｒｏｔｏｃｏｌｓ ｉｎ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｓｃｉｅｎｃｅ，Ｊｏｈｎ Ｗｉｌｅｙ ＆ Ｓｏｎｓ，ＮＹ，Ｎ．Ｙ．，（１９９７－２００１）。本発明の精神及び範囲を逸脱しないで、抗体及び断片に対する種々の文献は、例えば、複合体についても言及していることが当業者には明らかである。現在

、一般的に本発明を説明したが、更に、例示のみの目的のために本明細書に含まれ、特に指定のない限り限定することを意図しない、特定の実施例を参照することによって、同じことが理解されるであろう。

【実施例】

【０３７９】

細胞系及び増殖

【０３８０】

【表１】

細胞系	起源	供給源
Ramos	バーキットリンパ腫	DSMZ (ACC 603)
Raji	バーキットリンパ腫	DSMZ (ACC 319)
Daudi	バーキットリンパ腫	DSMZ (ACC 78)
BJAB	B-NHL	A gift from Elliot Kieff (Harvard)
WSU-DLCL-2	B-NHL, びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫	DSMZ (ACC 575)
RL	B-NHL, びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫	DSMZ (ACC 613)
SU-DHL-4	B-NHL, びまん性組織球性リンパ腫	DSMZ (ACC 495)
DOHH-2	難治性免疫芽細胞Ｂ細胞リンパ腫、濾胞性リンパ種	DSMZ (ACC 47)
SC-1	B-NHL, 濾胞性リンパ種	DSMZ (ACC 558)
Jeko-1	B-NHL, マントル細胞リンパ腫	DSMZ (ACC 553)
Granta-519	B-NHL, マントル細胞リンパ腫	DSMZ (ACC 342)
JVM-13	B-CLL, 慢性Ｂ細胞リンパ性白血病	DSMZ (ACC 19)
Molt-4	T-ALL, 急性Ｔ細胞リンパ性白血病	DSMZ (ACC 362)

細胞系は、特に示さない限り、適切な培地、例えば、１０％ウシ胎児血清、２ｍＭグルタミン及び１％ペニシリン－ストレプトマイシン（全ての試薬はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）を追加したＲＰＭＩ－１６４０培地内で、５％ CO_2 で加湿したインキュベーター中、３７℃で培養した。週に２回、新鮮な培地で希釈することによって細胞を継代し、０．２～１×10^6細胞／ｍＬに維持した。

【０３８１】

実施例１

【０３８２】

マウスＣＤ２０抗体の産生

【０３８３】

ヒトＣＤ２０（ＧＩ２３１１０９８９）の発現が可能な、ＸｂａＩ及びＢａｍＨＩ制限部位でフランクした完全なＣＤ２０コード配列（ＣＤＳ）を含む、発現プラスミドｐＳＲａ－ＣＤ２０を構築した。Ｂａｌｂ／Ｃマウス由来のプレ－Ｂ細胞、３００－１９細胞（Ｒｅｔｈら，Ｎａｔｕｒｅ，３１７：３５３－３５５（１９８５）に、この発現プラスミドをトランスフェクションし、高レベルの細胞表面上のヒトＣＤ２０を安定的に発現させ、Ｂａｌｂ／ｃ　ＶＡＦマウスの免疫に用いた。当業者に公知の標準免疫プロトコール、例えば、ＩｍｍｕｎｏＧｅｎ，Ｉｎｃで用いられているプロトコールにより、２～３週間毎に、マウスあたり、５×10^6個のＣＤ２０－発現３００－１９細胞で皮下に免疫した。免疫したマウスに、ハイブリドーマ生成のために犠牲にする３日前に追加免疫を行った

。標準的動物プロトコールに従い、マウスから脾臓を集め、例えば、２つの無菌のつや消しした顕微鏡用スライドガラスの間で組織を粉砕し、ＲＰＭＩ－１６４０培地中の単細胞懸濁液を得た。脾臓細胞を遠心分離し、沈殿させ、洗浄し、ポリエチレングリコール－１５０（Ｒｏｃｈｅ　７８３６４１）を用い、マウスミエローマ、例えば、Ｐ３Ｘ６３Ａｇ８．６５３細胞（Ｋｅａｒｎｅｙら，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１２３：１５４８－１５５０（１９７９））と融合させた。融合細胞を、ヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン（ＨＡＴ）（Ｓｉｇｍａ　Ｈ－０２６２）を含むＲＰＭＩ－１６４０選択培地に再懸濁し、５％　CO_2において、３７℃で、平底の９６ウェル培養プレート（Ｃｏｒｎｉｎｇ－Ｃｏｓｔａｒ　３５９６、ウェルあたり２００μＬの細胞）内で、増殖について選択した。インキュベーションの５日後、１００μＬの培養上清を各ウェルから取り除き、ヒポキサンチン－チミジン（ＨＴ）（Ｓｉｇｍａ　Ｈ－０１３７）を追加したＲＰＭＩ－１６４０培地で置換した。５％　CO_2において、３７℃でのインキュベーションを、ハイブリドーマクローンが抗体スクリーニングについて準備するまで継続した。Ｌａｎｇｏｎｅら（編集，”Ｉｍｍｕｎｏｃｈｅｍｉｃａｌ　Ｔｅｃｈｎｉｑｕｅｓ，　Ｐａｒｔ　Ｉ”，Ｍｅｔｈｏｄｓ　ｉｎ　Ｅｎｚｙｍｏｌｏｇｙ，Ａｃａｄｅｍｉｃ　Ｐｒｅｓｓ，ｖｏｌｕｍｅ　１２１，Ｆｌｏｒｉｄａ）及びＨａｒｌｏｗら（”Ａｎｔｉｂｏｄｉｅｓ：Ａ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｍａｎｕａｌ”；Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙ　Ｐｒｅｓｓ，Ｎｅｗ　Ｙｏｒｋ（１９８８））に開示されたものを含む、免疫付与及びハイブリドーマ産生のための他の技術を用いることもできる。

【０３８４】

ハイブリドーマスクリーニング及び選択

【０３８５】

ＣＤ２０発現細胞、例えば、ＣＤ２０－発現３００－１９細胞（トランスフェクションしていない３００－１９細胞ではない）と結合するマウスモノクローナル抗体のスクリーニングのため、ハイブリドーマからの培養上清をフローサイトメトリーによりスクリーニングした。１００μＬのハイブリドーマ上清を、１００μＬのＦＡＣＳバッファー（２％正常ヤギ血清を追加したＲＰＭＩ－１６４０培地）中、ＣＤ２０－発現３００－１９細胞又はトランスフェクションしていない３００－１９細胞のいずれかと（1×10^5細胞／試料）、３時間インキュベーションした。次いで、細胞を遠心分離し、沈殿させ、洗浄し、１００μＬのＰＥ－接合ヤギ抗－マウスＩｇＧ抗体（例えば、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから得られ、ＦＡＣＳバッファー中、６μｇ／ｍＬ）と１時間インキュベートした。ＨＴＳマルチウェルサンプラーを備えたＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメータ、又はＦＡＣＳアレイフローサイトメータを用いて細胞を得、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ　Ｐｒｏ（全て、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＵＳ由来である）を用いて分析した。

【０３８６】

陽性ハイブリドーマを、限界希釈によりサブクローニングした。ＣＤ２０に対し、フローサイトメトリーにより親細胞と同じ反応性を示す各ハイブリドーマからの１つのサブクローンを、以下の分析のために選択した。安定なサブクローンを培養し、抗－ＣＤ２０抗体を分泌するそれぞれのアイソタイプを、市販のアイソタイピング試薬（Ｒｏｃｈｅ　１４９３０２７）を用いて同定した。

【０３８７】

抗体の精製

標準的方法、例えば、プロテインＡ又はＧクロマトグラフィー（ＨｉＴｒａｐ　Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ａ　ｏｒ　Ｇ　ＨＰ，１ｍＬ，Ａｍｅｒｓｈａｍ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）を用いて、ハイブリドーマサブクローンの上清から抗体を精製した。すなわち、１／１０容量の１Ｍ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌバッファー、ｐＨ８．０を加えることにより、クロマトグラフィー用の上清を調製した。ｐＨを調製した上清を０．２２μｍのフィルター膜を通して濾過し、結合バッファー（ＰＢＳ、ｐＨ７．３）で平衡化したカラムに装填した。カラムを、２８０ｎｍにおける吸光度のない、安定なベースラインが得られるまで結合バッフ

ァーで洗浄した。０．５ｍＬ／分の流速を用い、０．１５Ｍ　ＮａＣｌ、ｐＨ２．８を含む０．１Ｍ酢酸バッファーで抗体を溶出させた。約０．２５ｍＬの画分を集め、１／１０容量の１Ｍ　Ｔｒｉｓ／ＨＣｌバッファー、ｐＨ８．０を加えることにより中和した。ピーク画分を、１×ＰＢＳで２回、一晩透析し、０．２μｍのフィルター膜を通してろ過することにより滅菌した。精製抗体を、Ａ２８０における吸光度により定量した。

【０３８８】

マウス抗体のための四級アンモニウム（Ｑ）クロマトグラフィーによるイオン交換クロマトグラフィー（ＩＥＸ）を用いて、プロテインＡ精製画分を更に精製した。次いで、調製した試料を、１２０ｃｍ／時の流速で結合バッファーにより平衡化したＱ高速流樹脂（ＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）に装填した。試料中の全てのＭＡｂが結合するのに十分な容量を有するように、カラムのサイズを選択した。次いで、カラムを、２８０ｎｍにおける吸光度のない、安定なベースラインが得られるまで結合バッファーで洗浄した。２０倍のカラム容量（ＣＶ）中、１０ｍＭから５００ｍＭまでの塩化ナトリウムの勾配を開始することにより、抗体を溶出させた。ピーク画分を、２８０ｎｍにおける吸光度測定（Ａ２８０）を基準にして集めた。Ａｇｉｌｅｎｔ　ＨＰＬＣ　１１００システム（Ａｇｉｌｅｎｔ，Ｓａｎｔａ　Ｃｌａｒａ，ＣＡ）を用い、ＳＷＸＬガードカラム、６．０×４０ｍｍ（Ｔｏｓｏｈ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅ，Ｍｏｎｔｇｏｍｅｒｙｖｉｌｌｅ，ＰＡ）を有するＴＳＫゲルＧ３０００ＳＷＸＬ、７．８×３００ｍｍによるサイズ排除クロマトグラフィーを用いて、単量体の割合を評価した。９５％以上の単量体含有量を有する画分を集め、ＴＦＦシステムを用いてバッファーをＰＢＳ（ｐＨ７．４）に交換し、０．２μｍのフィルター膜を通してろ過することにより滅菌した。精製抗体のＩｇＧ濃度は、１．４７の吸光係数を用いてＡ２８０により測定した。他の方法、例えば、セラミックハイドロキシアパタイト（ＣＨＴ）も、良好な選択性をもって抗体を精製するために用いられた。

４０μｍの粒径を有するＩＩ型ＣＨＴ樹脂（Ｂｉｏ－Ｒａｄ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｉｅｓ）を、ＩＥＸクロマトグラフィーについて開示されたのと類似のプロトコールにより用いた。

ＣＨＴのための結合バッファーは２０ｍＭリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０に相当し、抗体は、２０ＣＶにわたり、２０～１６０ｍＭリン酸ナトリウムの勾配を用いて溶出した。

【０３８９】

実施例２

【０３９０】

フローサイトメトリーによる結合特性

【０３９１】

結合特性は、精製抗体を用いたフローサイトメトリーにより試験した。ＣＤ２０発現３００－１０細胞に対するｍｕＣＤ２０－７及びｍｕＣＤ２０－６の結合、並びに親細胞３００－１９細胞に対して結合しないことを示すＦＡＣＳヒストグラムを図１に示す。１００μＬのＦＡＣＳバッファー（２％の正常ヤギ血清を追加したＲＰＭＩ－１６４０培地）中、ｍｕＣＤ２０－７又はｍｕＣＤ２０－６抗体を、ＣＤ２０発現３００－１９細胞又はトランスフェクションしていない３００－１９細胞（1×10^{5}細胞／試料）とインキュベートした。次いで、細胞を沈殿させ、洗浄し、１００μＬのＦＩＴＣ－連結ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体（例えば、Ｊａｃｋｓｏｎ　Ｌａｂｏｒａｔｏｒｙから入手でき、ＦＡＣＳバッファー中、６μｇ／ｍＬ）と１時間インキュベーションした。細胞を、再度沈殿させ、ＦＡＣＳバッファーで洗浄し、１％ホルムアルデヒドを含む、２００μＬのＰＢＳに再懸濁した。ＨＴＳマルチウェルサンプラーを備えたＦＡＣＳＣａｌｉｂｕｒフローサイトメータ、又はＦＡＣＳアレイフローサイトメータを用いて細胞を得、ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ　Ｐｒｏ（全て、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＵＳ由来である）を用いて分析した。

【０３９２】

ｍｕＣＤ２０－７又はｍｕＣＤ２０－６とインキュベートした、ＣＤ２０－発現３００

－１９細胞のＦＡＣＳヒストグラムは蛍光シフトを示したが、親細胞３００－１９細胞は示さなかった（図１）。また、いずれかの細胞を、ＦＩＴＣ－連結ヤギ抗マウスＩｇＧ抗体のみとインキュベートした場合には、有意な蛍光シフトは検出されなかった（図１の下部）。

【０３９３】

ＢＪＡＢリンパ腫細胞を、ｍｕＣＤ２０－７又はｍｕＣＤ２０－６とインキュベートした場合にも、蛍光シフトは観察された（図２）。ＢＪＡＢ細胞を、種々の濃度のｍｕＣＤ２０－７又はｍｕＣＤ２０－６抗体とインキュベートし、フローサイトメトリー分析について上述したようにして処理した。ＣｅｌｌＱｕｅｓｔ　Ｐｒｏ（全て、ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＵＳ）を用いてデータの分析を実施し、各試料について、ＦＬ１（ＭＦ１）についての平均蛍光強度を出力し、片対数プロットにおいて抗体濃度に対してプロットした。非線形回帰により用量反応曲線を作成し、ＢＪＡＢ細胞に対する結合についてのｍｕＣＤ２０－７又はｍｕＣＤ２０－６の見かけの解離定数（K_d）の値を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ　ｖ４（ＧｒａｐｈＰａｄ　ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて計算し、それぞれ０．３ｎＭ又は０．４ｎＭに相当する。

【０３９４】

実施例３

【０３９５】

マウス抗－ＣＤ２０抗体のプロアポトーシス活性

【０３９６】

抗－ＣＤ２０抗体、ｍｕＣＤ２０－２、ｍｕＣＤ２０－６及びｍｕＣＤ２０－７は、リンパ腫細胞系のアポトーシスを誘発した。Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３（Ｉｎｖｉｔｏ）とのＦＩＴＣ複合体を用いた染色後のフローサイトメトリー分析により、アポトーシスの程度を測定した。健康な正常細胞においては、ホスファチジルセリンは細胞膜二重層の内側にあり、原形質膜の内側から外層へのホスファチジルセリンの転移は、アポトーシスの早期に検出可能なシグナルの１つである。Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖは、無傷細胞の細胞膜二重層外側ではホスファチジルセリンと結合するが、内側では結合しない。従って、Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖの結合の程度は、アポトーシスの誘発の指標である。ＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３は、アポトーシスの後期に発生するような、膜の完全性が破壊されたときにのみ原形質膜を透過し得る、単量体シアニン核酸染色剤である。細胞の３種の集団は以下の二色フローサイトメトリーにおいて識別し得る：非アポトーシス細胞（Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陰性及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３陰性）、初期アポトーシス細胞（Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３陰性）、及び壊死細胞又は後期アポトーシス細胞（Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３陽性）。

【０３９７】

１０％ウシ胎児血清（ＦＢＳ）、２ｍＭ　Ｌグルタミン及び５０μｇ／ｍＬゲンタマイシンを追加したＲＭＰＩ－１６４０培地（以下、完全ＲＭＰＩ－１６４０培地を意味する）中、２５ウェルプレート内に、対数増殖期細胞を播種した。特に指摘しない限り、細胞は、一般にＲＭＰＩ－１６４０培地内で増殖する。５％ＣＯ２で加湿し、３７℃において、細胞を１０ｎＭの抗－ＣＤ２０抗体とインキュベートした。次いで、細胞を沈殿させ、５００μＬのＰＢＳで２回洗浄し、１００μＬの結合バッファー（１０ｍＭ　Ｈｅｐｅｓ－ＮａＯＨ、ｐＨ７．４、１４０ｍＭ　ＮａＣｌ、２．５ｍＭ　$CaCl_2$）に再懸濁し、氷上で５μＬのＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ－ＦＩＴＣにより染色した。次いで、４００μＬの結合バッファー及び１μＭのＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３を加えて混合し、ＦＩＴＣ及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３の細胞結合型蛍光を、フローサイトメトリーによりすぐに測定した。５００００のイベントが各試料について集められた。ＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３の蛍光（ＦＬ４－Ｈ；ｙ－軸）及びＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ－ＦＩＴＣ（ＦＬ１－Ｈ；ｘ－軸）のドットプロットを、ＢＤ　ＣｅｌｌＱｕｅｓｔソフトウェアを用いて作成し

た。

【０３９８】

Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞（ＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３陽性及び陰性細胞）の割合は、これらのプロットから各試料について測定し、図３に示す。抗体スクリーンから分離したいくつかの抗体を、リツキシマブと比較してプロアポトーシス活性について試験した。意外にも、ｍｕＣＤ２０－２、ｍｕＣＤ２０－６及びｍｕＣＤ２０－７は、非常に強いプロアポトーシス活性を示した。未処理細胞のたったの約５％と比較し、ｍｕＣＤ２０－６、ｍｕＣＤ２０－７又はｍｕＣＤ２０－２のいずれかにさらしたＲａｍｏｓ細胞の７０％以上はＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性であった。抗－ＣＤ２０抗体、リツキシマブによる処理により、たったの１３％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞がもたらされた。同様に、抗体ｍｕＣＤ２０－５による処理により、１２％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞がもたらされた。

【０３９９】

同様に、未処理細胞の５％と比較し、ｍｕＣＤ２０－７又はｍｕＣＤ２０－２で処理したＲａｊｉ細胞の６０％以上がＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞であった。この予想外の活性は、４２％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞をもたらす、以前に分離されたＩＩ型抗体、Ｂ１よりも、更に強い。リツキシマブとのインキュベーションにより、１４％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞がもたらされた。ｍｕＣＤ２０－５抗体は、未処理細胞と比較し、高い割合のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を誘発しなかった。

【０４００】

実施例４

【０４０１】

脂質ラフト

【０４０２】

抗体結合に続く脂質ラフトへのＣＤ２０の再変性は、抗体が効果的に補体因子を補充し、ＣＤＣの活性を誘発する能力と関連している。抗体の測定は脂質ラフトにＣＤ２０の再分布を誘発するので、我々は、Ｃｒａｇｇら（２００３）（上記参照）から修飾された方法に基づくフローサイトメトリーを使用した。このアッセイの原理は、低温における脂質ラフト区画のＴｒｉｔｏｎＸ－１００の不溶性に基づいている。

【０４０３】

遠心分離により細胞を集め、洗浄し、１％ＢＳＡを含むＲＰＭＩ－１６４０に再懸濁した。２．５×１０^{6}細胞、０．２ｍＬを、二連におけるそれぞれのアッセイに用いた。１０μｇ／ｍＬで抗－ＣＤ２０抗体を加え、試料を３７℃で１５分間インキュベートした。試料を遠心分離し、２回洗浄し、２ｍＬのＦＡＣＳバッファー（１×ＰＢＳ、１％　ＢＳＡ、２０ｍＭ　Ｎａ－アジド）に再懸濁した。氷上で試料を冷却し、この時点から冷却を維持した。抗体処理に応答して脂質ラフトと関連する抗原の画分を決定するため、試料を、氷上で０．５％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００により１５分インキュベートした。試料をＦＡＣＳバッファー内で２回洗浄し、１：２００に希釈した、ＦＩＴＣを結合したヤギ抗マウスＡｂを用いて、氷上で１時間染色した。試料を遠心分離し、ＦＡＣＳバッファーで２回洗浄し、固定のために、２００μＬ　ＢＰＳ、１％ホルムアルデヒドに細胞を再懸濁した。試料は、ＦＬ－１の平均値として、結合する抗－ＣＤ２０抗体を測定するため、フローサイトメトリーにより試料を得た。ＴｒｉｔｏｎＸ－１００のインキュベーションの非存在（未処理）又は存在（Ｔｒｉｔｏｎ処理）における各試料について平均蛍光強度（ＭＦＩ）をプロットした。

【０４０４】

我々は、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００が不溶性の脂質ラフトにＣＳ２０を効率的に移動させることが既に示されている、Ｉ型抗体の例である、リツキシマブをコントロールとして用いた。予想されるように、リツキシマブで処理した細胞は、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００処理されたものとされていないもので、同じ傾向レベルを示した。一方、ｍｕＣＤ２０－２で染色した細胞のＭＦＩは、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で処理していないものより、処理した

ものが、より低い。これは、既に開示されたＩＩ型ＣＤ２０抗体の特徴、脂質ラフトにＣＤ２０を再分配するｍｕＣＤ２０－２の無力と一致している。意外にも、ｍｕＣＤ２０－７で染色した細胞のＭＦＩは、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で処理していないものと類似している。更に、我々は、脂質ラフトの活性について、ｍｕＣＤ２０－５及びｍｕＣＤ２０－６についても試験を行った。ｍｕＣＤ２０－７について見られるように、ｍｕＣＤ２０－５又はｍｕＣＤ２０－６で染色した細胞のＭＦＩは、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で処理した、又はしていないものと類似している。このデータは、ｍｕＣＤ２０－５、ｍｕＣＤ２０－６及びｍｕＣＤ２０－７が、リツキシマブと同様、ＣＤ２０を、リンパ腫細胞膜の脂質ラフト区画に効率的に移動し得ることを示す。Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖアッセイからの結果と一緒に、これは、ｍｕＣＤ２０－２がＩＩ型抗体の特徴を有することを示す。それは強力にアポトーシスを誘発するが、脂質ラフトへＣＤ２０を再分配することができない。胃法、ｍｕＣＤ２０－５はＩ型抗体の特徴を有する。それは脂質ラフトへＣＤ２０を再分配し得るが、プロアポトーシス活性を有していない。

【０４０５】

この意外な結果は、ｍｕＣＤ２０－６及びｍｕＣＤ２０－７が特有かつ意外な機能特性の組合せを有していることを示す：それらは、Ｉ型抗体の脂質ラフト活性、及びＩＩ型抗体に典型的に見られる、強力なプロアポトーシス活性の両者を有している。

【０４０６】

実施例５

【０４０７】

ＣＤ２０－７及びＣＤ２０－６抗体のＶＬ及びＶＨ領域のクローニング及び配列決定

【０４０８】

ＲＮｅａｓｙキット（ＱＩＡｇｅｎ）を用い、製造業者のプロトコールに従い、ＣＤ２０－７及びＣＤ２０－６ハイブリドーマの細胞５×１０^{6}個から総細胞内ＲＮＡを調製した。次いで、ＳｕｐｅｒＳｃｒｉｐｔＩＩｃＤＮＡ合成キット（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を用いて、総ＲＮＡからｃＤＮＡを合成した。

【０４０９】

ハイブリドーマ細胞に由来するｃＤＮＡにおける第一ラウンドの変性ＰＣＲ反応のための工程は、Ｗａｎら（（２０００）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．Ｊａｎ １３；２３３（１－２）：１６７－７７）及びＣｏら（（１９９２）Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｆｅｂ １５；１４８（４）：１１４９－５４）に開示された方法に基づいていた。以下の変性プライマーを用い、ＰＣＲによりＶＨ配列を増幅した：ＥｃｏＭＨ１ ＣＴＴＣＣＧＧＡＡＴＴＣＳＡＲＧＴＮＭＡＧＣＴＧＳＡＧＳＡＧＴＣ（配列番号：３７）、ＥｃｏＭＨ２ ＣＴＴＣＣＧＧＡＡＴＴＣＳＡＲＧＴＮＭＡＧＣＴＧＳＡＧＳＡＧＴＣＷＧＧ（配列番号：４８）及びＢａｍＩｇＧ１ ＧＧＡＧＧＡＴＣＣＡＴＡＧＡＣＡＧＡＴＧＧＧＧＧＴＧＴＣＧＴＴＴＴＧＧＣ（配列番号：３８）。以下の変性プライマーを用い、ＰＣＲによりＶＬ配列を増幅した。ＳａｃＩＭＫ ＧＧＡＧＣＴＣＧＡＹＡＴＴＧＴＧＭＴＳＡＣＭＣＡＲＷＣＴＭＣＡ（配列番号：３９）及びＨｉｎｄＫＬ ＴＡＴＡＧＡＧＣＴＣＡＡＧＣＴＴＧＧＡＴＧＧＴＧＧＧＡＡＧＡＴＧＧＡＴＡＣＡＧＴＴＧＧＴＧＣ（配列番号：４０）。（混合塩基は、以下のように定義される：Ｎ＝Ｇ＋Ａ＋Ｔ＋Ｃ、Ｓ＝Ｇ＋Ｃ、Ｙ＝Ｃ＋Ｔ、Ｍ＝Ａ＋Ｃ、Ｒ＝Ａ＋Ｇ、Ｗ＝Ａ＋Ｔ）。

【０４１０】

次いで、ＰＣＲ反応混合物を１％の低融点アガロースゲルで電気泳動し、３００～４００塩基対のバンドを切り取り、Ｚｙｍｏ ＤＮＡミニカラムを用いて精製し、配列決定のためにＡｇｅｎｃｏｕｒｔ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓに送った。５’及び３’それぞれのＰＣＲプライマーを、シークエンシングプライマーとして用い、両方向から可変領域のｃＤＮＡを生成した。ＶＨ及びＶＬ領域のアミノ酸配列は、ＤＮＡ配列決定の結果から推測した。

【０４１１】

抗体の配列が由来する、マウス生殖細胞の配列についてのＮＣＢＩ ＩｇＢｌａｓｔサ

イト（ｗｗｗ．ｎｃｂｉ．ｎｌｍ．ｎｉｈ．ｇｏｖ／ｉｇｂｌａｓｔ／）を調査するために予備的ｃＤＮＡ配列を用いた。次いで、ＰＣＲプライマーを、マウスの抗体のリーダー配列に連結する生殖細胞系列にアニーリングし、この新たなＰＣＲ反応が、ＰＣＲプライマーによって変更されない完全な可変領域のｃＤＮＡ配列をもたらすように設計した。更に、ＣＤ２０－７重鎖の完全な可変領域の配列を決定するために、ＲＡＣＥＷ　ＰＣＲ胞を、Ｃｏら（上述）に記載された通りに実施した。ＰＣＲ反応、バンド精製及び配列決定は上述した通りに実施した。

【０４１２】

配列確認のための質量決定

完全長抗体ｃＤＮＡ配列を得るために、可変領域についてのｃＤＮＡ配列情報を、生殖細胞の定常領域と連結させた。次いで、重鎖及び軽鎖の分子量を計算し、ＣＤ２０－７及びＣＤ２０－６抗体のＬＣ／ＭＳ分析により得られた分子量と比較した。分子量測定は、ＣＤ２０－７及びＣＤ２０－６の軽及び重鎖の両方についてのｃＤＮＡ配列と一致する。

【０４１３】

キメラ化

軽鎖可変領域についての可変配列を、ｐｃｈＣＤ２０－７ＬＣＺプラスミド内のＥｃｏＲＩ及びＢｓｉＷＩ部位にクローニングする。重鎖可変領域を、重鎖可変領域を、ｐｃｈＣＤ２０－７ＨＣＮプラスミド内のＨｉｎｄＩＩＩ及びＡｐａＩ部位にクローニングする。ｃｈＣＤ２０－２、ｃｈＣＤ２０－９について、対応するプラスミドを構築した。標準的リン酸カルシウム法（ＢＤ　Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ，ＣａｌＰｈｏｓ　Ｍａｍｍａｌｉａｎ　Ｔｒａｎｓｆｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ，Ｃａｔ番号６３１３１２）を用い、ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞内でキメラ抗体を発現するために、これらのプラスミドを用いた。上述したような、標準的プロテインＡクロマトグラフィー法を用いて上清を精製したが、カルボキシメチル（ＣＭ）高速流イオン交換（ＩＥＸ）樹脂（ＧＥ　Ｌｉｆｅｓｃｉｅｎｃｅｓ）及び１０ｍＭリン酸カリウム、１０ｍＭ塩化ナトリウム結合バッファー（ｐＨ７．５）又は上述した他のＣＨＴ法のいずれかを用い、ポリッシングクロマトグラフィーを実施した。

【０４１４】

実施例６

【０４１５】

キメラＣＤ２０－７のプロアポトーシス活性

Ｒａｍｏｓ細胞においてアポトーシスを誘導する、キメラ抗体の能力を、上記実施例においてマウス抗体について記載されたような、Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３染色を用いることにより測定した。それぞれ１０ｎＭのキメラ抗体を、Ｒａｍｏｓ細胞と２０時間インキュベートし、次いでＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ染色及びフローサイトメトリー分析を実施し、結果を図５に示す。未処理の試料における、たったの１１％と比較し、ｃｈＣＤ２０－７処理は、５９％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞をもたらした。ｃｈＣＤ２０－７処理は、４３％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を誘発したが、リツキシマブ処理は、未処理細胞と同等のレベルのＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ染色をもたらした。従って、ＣＤ２０－７は、キメラ化後のＲａｍｏｓ細胞における、著しく強力なアポトーシスを誘発する能力を維持していた。

【０４１６】

キメラＣＤ２０－７のＣＤＣ活性

キメラ抗－ＣＤ２０抗体の補体依存性細胞傷害（ＣＤＣ）を評価するため、公開された方法（Ｇａｚｚａｎｏ－Ｓａｎｔｏｒｏ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．Ｍｅｔｈｏｄｓ，２０２（２）：１６３－１７１（１９９７））に従い、細胞に基づくアッセイを実施した。種々の濃度、通常、ＲＨＢＰ（ＲＰＭＩ－１６４０、２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、０．１％　ＢＳＡ、１％ペニシリン－ストレプトマイシン）培地中に５μｇ／ｍＬ（＝３．３×１０$^{-8}$Ｍ）～２．３ｎｇ／ｍＬ（＝１．５×１０$^{-11}$Ｍ）の範囲で、抗体を、平底の９６ウェルの組織培養プレートに５０μＬ／ウェルになるように、二連で一定量ずつ入れた。標的

細胞を、ウェルあたり１００μＬのＲＨＰＢ培地中、５×１０^{4}細胞になるように、抗体に加えた。凍結乾燥したヒト補体（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，Ｓｔ．Ｌｏｕｉｓ，ＵＳ）を、バイアル当たり１ｍＬの滅菌精製水を用いて再構築し、使用直前に、ＲＨＢＰ培地を用いて２０％ストックに５倍希釈した。プレートを５％ ＣＯ$_{2}$中、３７℃で加湿したインキュベーター中、２時間インキュベートし、補体が介在する溶解を可能にした。このインキュベーション時間の後、各ウェルに、最終濃度が１０％になるようにＡｌａｍａｒ Ｂｌｕｅ試薬（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）を加え、残った細胞の生存度を測定した。プレートを３７℃で１６～２０時間インキュベートし、ＥＸ５４０／ＥＭ５９０ｎｍで蛍光（相対蛍光単位、ＲＦＵ）を測定した。コントロールは、培地及び補体を含むが細胞を含まない（培地のみ、０％生存）ウェル、及び細胞及び補体を含むが抗体を含まない（細胞のみ、１００％生存）ウェルを含む、三連のウェルを含有する。各試料についての細胞生存の割合を、以下の式により決定した：生存割合＝（試料－培地のみ）／（細胞のみ－培地のみ）。

【０４１７】

意外にも、図６に示すように、ｃｈＣＤ２０－７抗体は、Ｄａｕｄｉ及びＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２リンパ腫細胞において、リツキシマブと類似のＣＤＣ活性を有していた。ｃｈＣＤ２０－７は、Ｄａｕｄｉ細胞において１．０ｎＭ、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞において２．２ｎＭのＥＣ$_{50}$をもって両方の細胞系において細胞生存率を完全に低下させた。リツキシマブは、Ｄａｕｄｉ細胞において１．１ｎＭ、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞において２．８ｎＭのＥＣ$_{50}$のＣＤＣ活性を有していた。ＩＩ型抗体について予想されるように、ｃｈＣＤ２０－２は、Ｄａｕｄｉ又はＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞のいずれかに対し、ＣＤＣ活性を有していなかった。

【０４１８】

実施例７

【０４１９】

抗体のヒト化

【０４２０】

ＣＤ２０－８抗体は、例えば、全体が参照として本明細書に組み入れられる、Ｒｏｇｕｓｋａら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．，ＵＳＡ，９１（３）：９６９－９７３（１９９４）及びＲｏｇｕｓｋａら，Ｐｒｏｔｅｉｎ Ｅｎｇ．９（１０）：８９５－９０４（１９９６）において既に開示されている、以下の再表面形成法に従ってヒト化された。再表面形成は、一般に、軽及び重鎖中の可変領域表面を同定すること、並びにそれらをヒトの同等物と置換することを含む。例示的なＣＤＲｓは、表１に示すように定義される。

【０４２１】

【表２】

表１

例示的な再表面形成ＣＤ２０－７　ＣＤＲｓ

軽鎖

CDR1: ＲＡＳＧＳＶＤＳＦＧＮＳＦＭＨ （配列番号：１７）
CDR2: ＲＡＳＮＬＥＳ （配列番号：１８）
CDR3: ＱＱＳＹＥＤＰＦＴ （配列番号：１９）

重鎖

CDR1: ＮＹＧＭＮ （配列番号：２０）
CDR2: ＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳ （配列番号：２１）
CDR3: ＧＡＹＹＲＹＤＬＧＭＤＹ （配列番号：２２）

Kabat の定義 CD20-7 HC CDR2

マウス HC CDR2: ＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＤＤＦＫＧ （配列番号：２３）
ヒト HC CDR2: ＷＩＮＴＹＴＧＥＰＳＹＡＡＰＦＫＧ （配列番号：２４）

【０４２２】

再表面形成について定義されるような、ＣＤ２０－７の軽及び重鎖ＣＤＲは、例示の目的のために表１に与えられる。重鎖ＣＤＲ２についてのＫａｂａｔの定義も、マウス及びヒトＣＤ２０－７について与えられる。下線を引いた配列は、再形成のためにＣＤＲと考えられないＫａｂａｔの重鎖ＣＤＲの部分を示す。

【０４２３】

表面残基の位置は、３０％以上の相対的な接近しやすさを有する任意の位置として定義される（Ｐｅｄｅｒｓｅｎら，Ｊ．Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．，２３５（３）：９５９－９７３（１９９４））。表面残基は、最も相同的なヒトの表面配列を識別するために、ヒトの生殖細胞の表面配列と一致している。ＣＤ２０－７について、交換用表面として用いられるヒトの生殖細胞配列は、$Ｖ_{Ｌ}$及び$Ｖ_{Ｈ}$について、それぞれＩＧＫＶ７－３＊０１及びＩＧＨＶ３－１５＊０４である。図７中の一覧からわかるように、軽鎖中の４つの表面残基及び重鎖中の９つの表面残基の全てはヒトの対応物と置換された。重鎖の残基Ｓ２８はＣＤＲ－Ｈ１に接近しており、そのヒトＴ２８への置換は結合親和性の低下をもたらすので、第二の再表面形成バージョンは、維持されたマウスのＳ２８残基を用いて生成された。図８は、マウスの対応物を有する、軽鎖及び重鎖の両方のＣＤ２０－７可変領域について再表面形成された配列の配置を示す。

【０４２４】

ｈｕＣＤ２０－７抗体の組換え発現

【０４２５】

ｈｕＣＤ２０－７についての可変領域配列をコドン最適化し、Ｂｌｕｅ　Ｈｅｒｏｎ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙにより合成した。配列は、１本鎖哺乳動物用発現プラスミド内のそれぞれの定常配列を用い、インフレームクローニングのための制限酵素部位によりフランクされる。軽鎖可変領域を、ｐｈＣＤ２０－７ＬＣＺプラスミド内のＥｃｏＲＩ及びＢｓｉＷＩ部位にクローニングする。重鎖可変領域を、ｐｈＣＤ２０－７ＨＣＮプラスミド内のＨｉｎｄＩＩＩ及びＡｐａＩ部位にクローニングする。哺乳動物細胞内で、一時的又は安定的のいずれかのトランスフェクションにおいて、ｈｕＣＤ２０－７を発現するために、これらのプラスミドを用いることができる。ＨＥＫ－２９３Ｔ細胞内でｈｕＣＤ

２０－７を発現するための一時的トランスフェクションは、修飾されたＰＥＩ法（Ｄｕｒｏｃｈｅｒ，Ｙ．ら，Ｎｕｃｌｅｉｃ Ａｃｉｄｓ Ｒｅｓ．３０（２）：Ｅ９（２００２））により実施した。キメラ抗体について上述した、プロテインＡ及びポリッシングクロマトグラフィー工程により、上清を精製した。

【０４２６】

基準抗体の発現

【０４２７】

ｈｕＣＤ２０－７の活性を比較するため、以前に同定した抗－ＣＤ２０抗体をクローニングし、発現させた。２Ｆ２抗体（オファツムマブ）のＨＣ及びＬＣ可変領域についてのアミノ酸配列は、ＨＣ可変領域についてはＷＯ２００４／０３５６０７の配列番号：２、ＬＣ可変領域についてはＷＯ２００４／０３５６０７の配列番号：４を用い、ＷＯ２００４／０３５６０７（Ｔｅｅｌｉｎｇら（２００４）、上述）に由来した。同様に、ＧＡ１０１抗体（アフツズマブの基礎）のＨＣ及びＬＣ可変領域についてのアミノ酸配列は、ＷＯ２００５／０４４８９５９（Ｕｍａｎａ，米国特許第５，６３９，０４１号（２００５））に由来した。開示されたＢ－ＨＨ６構築物に対応する、ＷＯ２００５／０４４８９５９の配列番号：４０は、ＨＣ可変領域のために用いられ、開示されたＢ－ＫＶ１構築物に対応する、ＷＯ２００５／０４４８９５９の配列番号：７６は、ＬＣ可変領域のために用いられた。

【０４２８】

両方の抗体についての可変領域配列をコドン最適化し、Ｂｌｕｅ Ｈｅｒｏｎ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙにより合成した。配列は、１本鎖哺乳動物用発現プラスミド内のそれぞれの定常配列を用い、インフレームクローニングのための制限酵素部位によりフランクされる。クローニング、発現及び精製は、上記ｈｕＣＤ２０－７について記載された通りに実施した。得られたＧＡ１０１－Ｆ抗体は、定常領域において典型的なフコシル化を示し、その結果、アフツズマブについて用いられる、脱フコシル化バージョンではなかった。

【０４２９】

実施例８

【０４３０】

ｈｕＣＤ２０－７の結合親和性

【０４３１】

実施例２に記載した通りに、ＢＪＡＢ細胞と、ｍｕＣＤ２０－７、ｃｈＣＤ２０－７又はｈｕＣＤ２０－７抗体とを用いるフローサイトメトリー結合アッセイを実施し、分析した。図９は、各抗体について非線形回帰により生成した用量反応曲線である。各抗体の見かけの解離定数（K_d）の値をＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ｖ４（ＧｒａｐｈＰａｄ ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いて計算した。キメラ化又はヒト化は、ｍｕＣＤ２０－７、ｃｈＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７についてのK_dが、それぞれ０．４ｎＭ、０．５ｎＭ及び０．５ｎＭであるように、ＣＤ２０－７の結合親和性に影響しなかった。

【０４３２】

ＥＬＩＳＡによる結合特性

ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞（例えば、ＣＤ２０抗原の起源）から粗細胞を調製し、ＥＬＩＳＡにより結合親和性を測定した。１０％ウシ胎児血清、２ｍＭグルタミン及び１％ペニシリン－ストレプトマイシン（全ての試薬はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）を追加したＲＰＭＩ－１６４０培地中、ローラーボトル内で、５％ CO_2 で加湿したインキュベーター中、３７℃で増殖させた。細胞を遠心分離により集め、細胞ペレットを冷却した１×ＰＢＳで２回洗浄し、次いで、溶解バッファー（５０ｍＭ Ｔｒｉｓ，ｐＨ ８，１５０ｍＭ ＮａＣｌ，５ｍＭ ＥＤＴＡ，１％ ＮＰ－４０，０．２５％デオキシコール酸ナトリウム，２５ｍＭオクチルグルコシド）中に溶解した。１ｍＬの容量の溶解バッファーを、1×10^7 細胞の溶解液を得集めるために用いた。２２ゲージの注射針を１０回通過させ

ることによって細胞溶解物を均質化し、溶解物を４℃で４５分間回転させた。１０，０００ｇで、４℃、４５分間遠心分離することにより、溶解物を澄ませた。上清を、０．２２ミクロンのフィルターでろ過し、一定量ずつ分け、液体窒素で急速冷凍し、－８０℃に保存した。総タンパク質濃度をＢＣＡアッセイ（例えば、Ｍｉｃｒｏ ＢＣＡ Ｐｒｏｔｅｉｎ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ，ＰＩＥＲＣＥ，ＵＳ）により測定した。

【０４３３】

ＥＬＩＳＡ実験のために、溶解物調製物をコーティングバッファー（１５ｍＭ Na_2CO_3，３５ｍＭ $NaHCO_3$，ｐＨ ９．６）中、総タンパク質５μｇ／ｍＬまで希釈し、４℃で、Ｉｍｍｕｌｏｎ ２ＨＢプレートに、１００μＬ／ウェルで１８～２４時間コーティングした。次いで、プレートを洗浄バッファー（ＴＢＳＴ：０．１％ Ｔｗｅｅｎ－２０／ＴＢＳ，ｐＨ ７．４）を用い、２００μＬ／ウェルで３回洗浄した。プレートを、２００μＬ／ウェルのブロッキングバッファー（１％カゼイン／ＴＢＳ，ｐＨ７．４）を用いて、室温で１時間ブロッキングした。プレートを前述と同様に洗浄し、次いで一連の抗体希釈物をプレートに、１００μＬ／ウェルで加えた。プレートを室温で３時間インキュベートし、次いで前述と同様に洗浄した。ブロッキングバッファー中、１：５０００希釈したヤギ抗ヒトＨＲＰを二次抗体として１００μＬ／ウェルで加え、室温で１時間インキュベートした。プレートを前述と同様に洗浄し、ＴＭＢ１基質（ＢｉｏＦＸ）を１００μＬ／ウェルで加えた。反応を２０分間実施し、４５０ｎｍ停止試薬（ＢｉｏＦＸ）を１００μ／ウェル用いて反応を停止した。４５０ｎｍにおける吸光度を読み取り、各試料について抗体濃度に対してプロットした。シグモイド用量反応曲線は、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ ｖ４（ＧｒａｐｈＰａｄ ｓｏｆｔｗａｒｅ，Ｓａｎ Ｄｉｅｇｏ，ＣＡ）を用いた結合曲線に一致した。見かけの解離定数（K_d）の値を、図１０に示すｈｕＣＤ２０－７についての結合曲線から計算し、０．８ｎＭに相当する。

【０４３４】

実施例９

【０４３５】

ｍｕ及びｈｕＣＤ２０－７のプロアポトーシス活性

ｈｕＣＤ２０－７のプロアポトーシス活性を、ｍｕＣＤ２０－７の活性と比較した。Ｒａｍｏｓ細胞を１０ｎＭ、１ｎＭ又は０．１ｎＭ濃度のｍｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７又はｈｕＩｇＧアイソタイプコントロール抗体と、２０時間、次いで、Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ－ＦＩＴＣ及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３染色剤とインキュベートし、フローサイトメトリー分析を行った。各条件についてのＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞の割合を図１１に示す。ｈｕＣＤ２０－７は、ｍｕＣＤ０－７の強いプロアポトーシス活性を維持していた。約６０％のＲａｍｏｓ細胞は、６％のアイソタイプコントロール処理細胞と比較し、１０ｎＭのいずれかの抗体による処理後にＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性である。

【０４３６】

ｈｕＣＤ２０－７のプロアポトーシス活性

Ｒａｍｏｓ細胞に対するｈｕＣＤ２０－７のプロアポトーシス活性を、他のＣＤ２０抗体と比較した。リツキシマブ及び２Ｆ２は、既に開示された限定的なプロアポトーシス活性を有するＩ型抗体であるが、ＧＡ１０１及びＢ１は、公知の強力なプロアポトーシス活性を有するＩＩ型抗体である。「Ｂ１」は、ＢｅｘｘａｒＴＭ（Ｃｏｕｌｔｅｒ）の未標識型に相当する；しかし、「ＧＡ１０１－Ｆ」は、アフツズマブ又はＧＡ１０１（Ｒｏｃｈｅ）のフコシル化バージョンに相当し；「２Ｆ２」はオファツムマブ（Ｇｅｎｍａｂ）に相当する。種々の量の各抗体を、Ｒａｍｏｓ細胞と、２０時間、次いで、Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ－ＦＩＴＣ及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３染色剤とインキュベートし、フローサイトメトリー分析を行った。Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞の割合を、図１２の片対数プロットにおいて抗体濃度に対してプロットし、非線形回帰分析を用いて適合した曲線から、EC_{50}を計算した。ｈｕＣＤ２０－７は、５０％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞の最大割合、及び０．２ｎＭのEC_{50}を有し、強力なプロアポトーシス活性を有する。それは、０．８ｎＭのEc_{50}を有し、３４％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞をもたらすＢ１

よりも更に強力である。ＧＡ１０１－Ｆはあまり効果的でなく、１．７ｎＭのＥＣ$_{50}$を有し、２２％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞をもたらす。リツキシマブは、Ｒａｍｏｓ細胞のアポトーシスについて限られた効果を有し、１．７ｎＭのＥＣ$_{50}$を有し、たったの１２％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞をもたらす。２Ｆ２処理した試料及び未処理の両方の試料は、２％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を含み、これは、２Ｆ２がＲａｍｏｓ細胞のアポトーシスを誘発しないことを示す。未処理のコントロール値を引いた後、これは、Ｂ１による３２％、ＧＡ１０１－Ｆによる２０％、及びリツキシマブによる１０％と比較し、ｈｕＣＤ２０－７により誘発される４８％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性Ｒａｍｏｓ細胞に相当する。

【０４３７】

細胞系のパネルに対するプロアポトーシス活性

ｈｕＣＤ２０－７のプロアポトーシス活性を、更に細胞系の拡張パネルに対するリツキシマブ及びＢ１と比較した。各細胞系を１０ｎＭ又は１．５μｇ／ｍＬのｈｕＣＤ２０－７又はリツキシマブと２０時間、次いでＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３染色剤とインキュベートし、フローサイトメトリー分析を行った。各抗体及び未処理試料について、Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞の割合をプロットし、図１３Ａ～１３Ｅに示す。ｈｕＣＤ２０－７抗体は、Ｒａｍｏｓ及びＲａｊｉリンパ腫細胞系内でリツキシマブ及びＢ１よりも活性であった。ｈｕＣＤ２０－７は、Ｂ１についての２９％、リツキシマブについての９％及び未処理細胞についての６％と比較し、Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞内で６０％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を誘発した。未処理のコントロール値を引いた後、これは、Ｂ１による２３％、リツキシマブによる３％と比較し、ｈｕＣＤ２０－７により誘発される５４％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性Ｒａｍｏｓ細胞に相当する。ｈｕＣＤ２０－７は、Ｂ１についての４２％、リツキシマブについての１４％及び未処理細胞についての５％と比較し、Ｒａｊｉリンパ腫細胞内で５８％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を誘発した。未処理のコントロール値を引いた後、これは、Ｂ１による３７％、リツキシマブによる９％と比較し、ｈｕＣＤ２０－７により誘発される５３％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性Ｒａｊｉ細胞に相当する。更に、ｈｕＣＤ２０－７は、リツキシマブについての２６％及び未処理細胞についての５％と比較し、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２　ＤＬＢＣＬ細胞内で３９％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を誘発した。未処理のコントロール値を引いた後、これはｈｕＣＤ２０－７により誘発される３４％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞、及びリツキシマブによる２１％に相当する。ｈｕＣＤ２０－７は、リツキシマブについての９％及び未処理細胞についての８％と比較し、Ｊｅｋｏ－１　ＭＣＬ細胞内で２０％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を誘発した。未処理のコントロール値を引いた後、これはｈｕＣＤ２０－７により誘発される１２％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性Ｊｅｋｏ－１細胞、及びリツキシマブによるたったの１％に相当する。最終的に、ｈｕＣＤ２０－７は、リツキシマブについて２３％、及び未処理細胞について１８％と比較し、Ｇｒａｎｔａ－５１９　ＭＣＬ細胞内で５８％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を誘発した。未処理のコントロール値を引いた後、これはｈｕＣＤ２０－７により誘発される４０％、及びリツキシマブによる２１％によるたったの５％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞に相当する。

【０４３８】

実施例１０

【０４３９】

ヒト抗体を用いた脂質ラフトアッセイ

Ｒａｍｏｓ細胞に対する脂質ラフトアッセイを、他のＣＤ２０抗体と比較し、前述した通りに、ｈｕＣＤ２０－７について実施した。リツキシマブ及び２Ｆ２抗体は、既に開示されている脂質ラフト活性を有するＩ型抗体であるが、ＧＡ１０１－Ｆ及びＢ１は、脂質ラフトを欠き、その結果としてＣＤＣ活性を欠いているＩＩ型抗体である。予想通り、リツキシマブ及び２Ｆ２で処理した細胞は、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００処理したもの、及びしないもので同じレベルの蛍光を示す（図１４）。一方、Ｂ１又はＧＡ１０１－Ｆで染色し

た細胞の平均蛍光は、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で処理しないよりもした方が低く、これは、脂質ラフト内へのＣＤ２０の再分解能力と一致する。意外にも、ｈｕＣＤ２０－７で染色した細胞の平均蛍光は、ＴｒｉｔｏｎＸ－１００で処理したもの、又はしないもので同様である。従って、ｈｕＣＤ２０－７は、リツキシマブ及び２Ｆ２と同様、Ｂ細胞膜の脂質ラフト区画へＣＤ２０を効率的に移行し得る。

【０４４０】

ｈｕＣＤ２０－７のＣＤＣ活性

リツキシマブ及びＧＡ１０１－Ｆと比較したｈｕＣＤ２０－７のＣＤＣ活性を、実施例６のキメラ抗体について記載された通りに測定した。意外にも、ｈｕＣＤ２０－７抗体は、図１５Ａに示すように、Ｄａｕｄｉリンパ腫細胞においてリツキシマブと類似のＣＤＣ活性を有していた。リツキシマブ又はｈｕＣＤ２０－７の処理は、それぞれ０．２３及び０．２５μｇ／ｍＬのEC_{50}をもって、Ｃａｕｄｉ細胞の生存度を完全に低下させた。予想通り、典型的なＩＩ型抗体であるＧＡ１０１－Ｆは、Ｄａｕｄｉ細胞に対してＣＤＣ活性をなんら示さなかった。図１５Ｂに示すように、Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞について同様の結果が示された。リツキシマブ又はｈｕＣＤ２０－７の処理は、それぞれ０．０９及び０．０１４μｇ／ｍＬのEC_{50}をもって、Ｒａｍｏｓ細胞の生存度を完全に低下させた。予想通り、典型的なＩＩ型抗体であるＧＡ１０１－Ｆは、Ｒａｍｏｓ細胞に対して最小のＣＤＣ活性を有していた。

【０４４１】

更に、ｈｕＣＤ２０－７は、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２及びＲＬリンパ腫に対し、リツキシマブよりも、強力なＣＤＣ活性を有していた。リツキシマブは、１．９μｇ／ｍＬのEC_{50}で、最高濃度において、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞の細胞生存度を３４％まで低下させた。一方、ｈｕＣＤ２０－７は、０．５８μｇ／ｍＬのEC_{50}で、最高濃度において、ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞の細胞生存度を１１％まで低下させた（図１６Ａ）。リツキシマブは、４．３μｇ／ｍＬのEC_{50}で、最高濃度において、ＲＬ細胞の細胞生存度を５６％まで穏やかに低下させた。一方、ｈｕＣＤ２０－７は、より低い０．６７μｇ／ｍＬのEC_{50}で、最高濃度において、ＲＬ細胞の細胞生存度を１１％まで低下させた。

【０４４２】

実施例１１

【０４４３】

ｈｕＣＤ２０－７のＡＤＣＣ活性

エフェクター細胞として、新しく分離したヒトナチュラルキラー（ＮＫ）細胞を用い、腫瘍細胞系の抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）を測定するために、ラクテートデヒドロゲナーゼ（ＬＤＨ）リリースアッセイを用いた（例えば、Ｓｈｉｅｌｄｓ，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．，２７６（９）：６５９１－６６０４（２００１））。ＮＫ細胞は、ＮＫ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔ ＩＩ（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ，１３０－０９１－１５２）を用い、正常供与者（Ｒｅｓｅａｒｃｈ Ｂｌｏｏｄ Ｃｏｍｐｏｎｅｎｔｓ，Ｉｎｃ．，Ｂｒｉｇｈｔｏｎ，ＭＡ）由来のヒト血液から最初に分離された。血液を１×ＰＢＳで２倍に希釈した。２５ｍＬの希釈した血液を、５０ｍＬの円錐管中の２５ｍＬのＦｉｃｏｌｌ Ｐａｑｕｅに注意深く積層し、室温で、４００ｇで４５分間遠心分離した。接触面から末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を集め、新しい５０ｍＬの円錐管に移し、１×ＰＢＳで１回洗浄した。ＰＢＭＣを２ｍＬのＮＫ－分離バッファー（１×ＰＢＳ、０．５％ ＢＳＡ、２ｍＭ ＥＤＴＡ）に再懸濁し、次いで、細胞懸濁液に５００μＬのビオチン－抗体混合物を加えた。ビオチン－抗体混合物は、ＮＫ細胞を除いてリンパ球と結合するビオチニル化抗体を含み、ＮＫ細胞の陰性選択をもたらす。混合物を４℃で１０分間インキュベートし、次いで１．５ｍＬのＮＫ－分離バッファー及び１ｍＬの抗－ビオチンミクロビーズを加えた。細胞－抗体混合物を４℃で更に１５分間インキュベートした。次いで、細胞を５０ｍＬのＮＫ－分離バッファーで１回洗浄し、３ｍＬのＮＫ－分離バッファーに再懸濁した。次いで、ＭＡＣＳ ＬＳカラムを自動ＭＡＣＳ分離器（Ｍｉｌｔｅｎｙｉ Ｂｉｏｔｅｃｈ）に積層し、３ｍＬのＮＫ－分離バッファーで予備洗浄した。細胞

懸濁液をカラムに自動的に積層し、洗浄し、未標識ＮＫ細胞を含む溶出画分を、新しい５０ｍＬの円錐管に集めた。得られたＮＫ細胞を、３０ｍＬの完全ＲＰＭＩ培地（５％ウシ胎児血清、１％　ペニシリン－ストレプトマイシン、１ｍＭ　ＨＥＰＥＳ、１ｍＭピルビン酸ナトリウム、１％の１００×ＭＥＭ非必須アミノ酸溶液を追加したＲＰＭＩ－１６４０）内に一晩まいた。次のアッセイ及び全ての希釈は、ＲＨＢＰ培地（２０ｍＭ　ＨＥＰＥＳ　ｐＨ７．４、０．１％　ＢＳＡ、１％ペニシリン－ストレプトマイシンを追加したＲＰＭＩ－１６４０）で実施した。

【０４４４】

ＲＨＢＰ培地内の種々の濃度の抗体を、丸底型の９６ウェルプレートに、５０μＬ／ウェルになるように、二連で一定量ずつ加えた。標的細胞を、ＲＨＢＰ培地内に、10^6細胞／ｍＬで再懸濁し、抗体希釈物を含む各ウェルに１００μＬ／ウェルで加えた。標的細胞及び抗体希釈物を含むプレートを３７℃で３０分間インキュベートした。次いで、ＮＫ細胞を、標的細胞を含むウェルに５０μＬ／ウェルで加えた。通常の比は、３～４個のＮＫ細胞に対して約１個の標的細胞であった。各実験について、少なくとも以下のコントロールを設定した：ＮＫ細胞のみ、標的細胞のみ（自発的なＬＤＨ遊離）、標的細胞及びＮＫ細胞（抗体依存ＬＤＨ遊離）、標的細胞及び１０％　ＴｒｉｔｏｎＸ－１００（最大のＬＤＨ遊離）。混合物を３７℃で４時間インキュベートし、細胞を溶解させた。プレートを１２００ｒｐｍで１０分間遠心分離し、１００μＬの上清を、新しい丸底型の９６ウェルプレートに注意深く移した。Ｃｙｔｏｔｏｘｉｃｉｔｙ　Ｄｅｔｅｃｔｉｏｎ　Ｋｉｔ（Ｒｏｃｈｅ　１　６４４　７９３）由来のＬＤＨ反応混合物（１００μＬ／ウェル）を各ウェルに加え、室温で５～３０分間インキュベートした。試料の吸光度は４９０ｎｍで測定した（ＯＤ４９０）。各試料の特異的溶解の割合は、以下の式を用いて決定した：特異的溶解の割合＝（試料の値－自発的な遊離）／（最大遊離－自発的な遊離）＊１００。

【０４４５】

ｈｕＣＤ２０－７とのインキュベーションは、ヒトＮＫエフェクター細胞の存在下に、Ｒａｍｏｓリンパ腫及びＪＶＭ－１３慢性リンパ球性白血病に対して良好なＡＤＣＣ活性をもたらす。Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞におけるＡＤＣＣ活性を、ｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、ＧＡ１０１－Ｆ及び２Ｆ２と比較した（図１７）。ｈｕＣＤ２０－７を用いた処置は、他のＣＤ２０抗体を用いて観察される活性と同様、約８０％のＲａｍｏｓ細胞溶解をもたらした。ｈｕＣＤ２０－７によるＡＤＣＣ活性は１．１ｎｇ／ｍＬのEC_{50}を有し、リツキシマブは３．５ｎｇ／ｍＬ、２Ｆ２は１．２ｎｇ／ｍＬ、ＧＡ１０１－Ｆは０．５９ｎｇ／ｍＬのEC_{50}を有していた。ＪＶＭ－１３　ＣＬＬ細胞におけるｈｕＣＤ２０－７のＡＤＣＣ活性を、リツキシマブ及び２Ｆ２と比較した。ｈｕＣＤ２０－８の処置は、リツキシマブ又は２Ｆ２と同様、４０％のＪＶＭ－１３細胞の溶解を起こした。ｈｕＣＤ２０－７によるＡＤＣＣ基アッセイは０．２３ｎｍ／ｍＬのEC_{50}を、リツキシマブは０．２９ｎｇ／ｍＬ、２Ｆ２は０．１７ｎｇ／ｍＬのEC_{50}を有していた。

【０４４６】

実施例１２

【０４４７】

エピトープマッピング

【０４４８】

ＣＤ２０の細胞外ドメインは２子の細胞外ループを含む。大きいループは、第三及び第四の膜透過性ドメインの間に約４４個のアミノ酸からなる。従って、開示されたほとんどのＣＤ２０抗体は、効果的な結合のために、より大きいループ内にアミノ酸残基を必要とする。突然変異分析は、抗体結合のための重要な残基として、少なくともアラニン１７０（Ａ１７０）及びプロリン１７２（Ｐ１７２）を識別する（Ｐｏｌｙａｋ，Ｂｌｏｏｄ，９９：３２５６－３２６２（２００２）；及びＰｏｌｙａｋ，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ．，１６１：３２４２－３２４８（１９９８））。マウスＣＤ２０のこの位置に見られる、Ａ１７０及びＰ１７２残基をセリンに変換すると、Ｂ１のようなＣＤ２０抗体結合を無効にする。同様に、マウスの大きな細胞外ループを含むＣＤ２０にＡ１７０及びＰ１７２残基を

導入すると、Ｂ１及びリツキシマブを含むほとんどのＣＤ２０抗体の結合を可能にする。一方、２Ｆ２を含む、独特な一連の抗体は、ＣＤ２０　Ａ１７０Ｓ　Ｐ１７２Ｓ変異体と結合することが報告されていることが開示された（Ｔｅｅｌｉｎｇら，（２００６）上述）。更に、残基アスパラギン１６３（Ｎ１６３）又はアスパラギン１６６（Ｎ１６６）をアスパラギン酸に変換すると、２Ｆ２の結合を低下させるが、Ｂ１又はリツキシマブを含む他の抗ＣＤ－２０抗体の結合には影響しなかった（Ｔｅｅｌｉｎｇら、（２００６）Ｂｌｏｏｄ．１７７：３６３－３７１）。この新規なエピトープは、強力なＣＤＣ活性が種湯細胞に対する限定的な直接プロアポトーシス活性を伴う、それらの生物学的活性と連結していることを示唆している。ＣＤ２０－７及びＣＤ２０－６を更に特徴づけるため、我々は、ＣＤ２０変異体への結合を分析した。

【０４４９】

ＣＤ２０変異体のクローニング及び発現

発現プラスミドｐＳＲａ－ＣＤ２０は、ｐＳＲａベクターへのクローニングのためのＸｂａＩ及びＢａｍＨＩ制限部位によりフランクされる、Ｂｌｕｅ　Ｈｅｒｏｎ　Ｂｙｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓによりコドン最適化及び合成された、完全ヒトＣＤ２０　ｃＤＮＡ配列を含む。ＣＤ２０－Ａ１７０Ｓ　Ｐ１７２Ｓ変異体（ＣＤ２０－ＡＰ）は、Ａ１７０Ｓ　Ｐ１７２Ｓ突然変異を含む、ｐＳＲａ－ＣＤ２０プラスミドのＳａｃＩからＭｆｅ１断片を増幅するため、５’プライマーｈＣＤ２０ｓａｃＡＰ－ＳＳ　（ＡＴＴＡＧＡＧＣＴＣＡＣＡＣＡＣＣＡＴＡＴＡＴＴＡＡＣＡＴＡＴＡＣＡＡＣＴＧＴＧＡＡＣＣＡＴＣＧＡＡＴＴＣＣＴＣＴＧＡＧＡＡＡＡＡＣＴ（配列番号：４１））を、３’末端逆方向プライマーＳＲａＭｆｅ１Ｒ（ＡＡＴＧＣＡＡＴＴＧＴＴＧＴＴＧＴＴＡＡＣＴ（配列番号：４２）を用いて、ＰＣＲにより生成した。ＰＣＲ産物を、ｐＳＲａ－ＣＤ２０プラスミドのＳａｃＩ及びＭｆｅ１部位にクローニングした。突然変異生成は、得られたクローン中に、ＥｃｏＲＩ部位及びＣＤ２０配列変化を導入し、これは、制限酵素消化、それに続くＤＮＡ配列決定により証明された。５’末端プライマー内の特定のコドンを修飾することにより、同じＳａｃＩからＭｆｅ１断片のＰＣＲ突然変異生成により、ＣＤ２０　Ｎ１６３Ｄ　Ｎ１６６Ｄ二重（ＣＤ２０－ＮＮＤＤ）及びＣＤ２０　Ｎ１６３Ｄ（ＣＤ２０－Ｎ１６３Ｄ）単一突然変異を生成した。Ｔｈｅ　ＣＤ２０　Ｎ１６３Ｄ　Ｎ１６６Ｄ変異断片は、ｈＣＤ２０ｓａｃＮＮ－ＤＤ　５’末端プライマー（ＡＴＴＡＧＡＧＣＴＣＡＣＡＣＡＣＣＡＴＡＴＡＴＣＧＡＴＡＴＡＴＡＣＧＡＴＴＧＴＧＡＡＣＣＡ（配列番号：４３）を用いて増幅し、ＣＤ２０　Ｎ１６３Ｄ断片は、ｈＣＤ２０ｓａｃＮ１６３Ｄ　５’末端プライマー（ＡＴＴＡＧＡＧＣＴＣＡＣＡＣＡＣＣＡＴＡＴＡＴＴＧＡＴＡＴＣＴＡＣＡＡＣＴＧＴＧＡ（配列番号：４４）を用いて増幅した。ＳａｃＩからＭｆｅ１断片を、ｐＳＲａ－ＣＤ２０のＳａｃＩ及びＭｆｅ１部位にクローニングし、構築物は、それぞれ導入されたＣｌａ１又はＥｃｏＲｖ部位についてスクリーニングした。ＤＮＡ配列決定により、陽性クローンを更に確認した。

【０４５０】

公知のエレクトロポレーション法を用い、３００－１９細胞にＣＤ２０変異体発現プラスミドをトランスフェクションすることにより、安定な細胞を作成した。すなわち、５×10^6個の３００－１９細胞を、２６０Ｖ及び９６０μＦにセットしたＢｉｏＲａｄ　Ｇｅｎｅ　Ｐｕｌｓｅｒを用い、低温のＲＰＭＩ－１６４０培地にエレクトロポレートした。次いで、細胞を希釈し、１０％　ＦＢＳ及び５０μＭ　β－メルカプトエタノールを追加したＲＰＭＩ－１６４０培地を入れた９６ウェルプレートに播種した。２４時間後、Ｇ４１８（例えば、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎから入手できる）を最終濃度２ｍｇ／ｍＬになるように加え、トランスフェクト細胞を選択した。２週間後、単一のコロニーを分離して広げた。

【０４５１】

ＣＤ２０変異体への抗体結合

【０４５２】

ヒトＣＤ２０野生型及び変異体を発現するＣＤ２０　ＡＰに対する種々のＣＤ２０抗体の

結合をフローサイトメトリーにより分析した。図１８Ａ及び１８Ｂに示し得るように、ＣＤ２０－７及びＣＤ２０－６を含む全ての抗体は野生型のＣＤ２０発現細胞と結合する。ＣＤ２０ＡＰ変異体について得られたデータを図１９に示す。予想通りに、リツキシマブ及びＧＡ１０１－ＦはＣＤ２０ＡＰ変異体と結合しなかったが、Ｂ１は最小の結合を示した。それに対し、２Ｆ２は、既に報告されているように（Ｔｅｅｌｉｎｇら（２００６），上述）、ＣＤ２０ＡＰ変異体と結合することができる。意外にも、ｈｕＣＤ２０－７は、ＣＤ２０ＡＰ変異体と結合する（図１９Ａを参照されたい）。同様に、ｍｕＣＤ２０－６及びｍｕＣＤ２０－７も、ＣＤ２０ＡＰ変異体と結合し得る（図１９Ｂ）。Ｎ１６３Ｄ及びＮ１６６Ｄ変異体は、２Ｆ２の結合を低下させることが示されたが、Ｂ１又はリツキシマブのような他の抗－ＣＤ２０抗体の結合に影響しない。予想通り、リツキシマブ及びＧＡ１０１－ＦはＣＤ２０－Ｎ１６３Ｄ変異体と結合するが、２Ｆ２は、結合の低下を示す（図２０Ａ）。一方、ｈｕＣＤ２０－７、ｍｕＣＤ２０－７及びｍｕＣＤ２０－６は、ＣＤ２０Ｎ１６３Ｄに対する結合を欠失していた。同様に、リツキシマブ及びＧＡ１０１－ＦはＣＤ２０－Ｎ１６３ＤＮ１６６Ｄ変異体と結合するが、２Ｆ２は最小の結合を示した（図２１）。また、ｈｕＣＤ２０－７、ｍｕＣＤ２０－７及びｍｕＣＤ２０－６は、ＣＤ２０　Ｎ１６３Ｄ　Ｎ１６６Ｄに対する結合を欠失していた。

【０４５３】

この予想外の結果は、ｈｕＣＤ２０－７が、ＧＡ１０１及びＢ１のようなＩＩ型抗体と機能的に関連しているが、これらの抗体とは異なるエピトープを明らかに必要とすることを示す。他のほとんどの抗体と同様、ｈｕＣＤ２０－７は、ＣＤ２０のＡ１７０及びＰ１７２残基に依存しない。従って、ｈｕＣＤ２０－７は、物理的及び機能的特徴の組合せを実現されていない組合せを備えた、新しいＣＤ２０抗体である。

【０４５４】

実施例１３

【０４５５】

ＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１の調製

Ｎ－スクシニミジル４－（２－ピリジルジチオ９ペンタノエート（ＳＰＰ）をエタノールに溶解した。ｈｕＣＤ２０－７抗体を、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ及び５％エタノールを含む５０ｍＭリン酸カリウムバッファー（ｐＨ６．５）内で、室温で約１００分間、７倍のモル過剰のＳＰＰリンカーと８ｍｇ／ｍＬでインキュベートした。前述したリン酸カリウムバッファーで平衡化した、ＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ２５Ｆを用いて反応混合物を精製した。抗体含有画分を集め、次の工程で用いた。

【０４５６】

典型的なメイタンシノイドＤＭ１をジメチルアセトアミドに溶解し（ＤＭＡ、最終濃度は３％）、リンカーに対して１．７倍モル過剰をＳＰＰ修飾抗体に滴下して加えた。室温で一晩インキュベーションした後、連結抗体を、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ）、ｐＨ６．５で平衡化したＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ２５Ｆによるクロマトグラフィーにより精製した。次いで、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１複合体を、１０ｍＭヒスチジン、２５０ｍＭグリシン、１％ショ糖、ｐＨ５．５を含むバッファーで透析した。抗体分子あたりに連結したＤＭ１分子の数を、既に報告されている、抗体及びＤＭ１についての吸光係数（Ｌｉｕら，Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．ＵＳＡ，９３，８６１８－８６２３（１９９６））を用いて決定した。複合反応後に存在する遊離のメイタンシノイドの割合を、１００ｍＭ酢酸アンモニウムバッファー、ｐＨ７．０中、２５％アセトニトリルで平衡化し、アセトニトリル中で溶出する、ＨｉＳｅｐ（商標）カラムに２０～５０μｇの複合体を注入することにより測定した。遊離のメイタンシノイドの全ピーク面積（勾配により溶出し、既知の標準品との溶出時間の比較により同定）を、２５２ｎｍの波長に設定した吸光度検出器を用いて測定し、結合型メイタンシノイド（カラムを通過する画分中の複合体ピーク内の溶出）に対するピーク面積と比較し、全ての遊離のメイタンシノイド種の割合を計算した。ｈｕＣＤ２０－７抗体あたり３．５～４個のＤＭ１分子を有する複合体を、未連結メイタンシノイドとして＜１％で得た。

【０４５７】
ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１の調製
【０４５８】
（スクシニミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１－カルボキシレート（ＳＭＣＣ、Ｐｉｅｒｃｅ　Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌｏｇｙ，Ｉｎｃ）リンカーをＤＭＡに溶解した。５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ６．５中で、８ｍｇ／ｍＬの抗体を、７．５～１０倍モル過剰量のＳＭＣＣとインキュベートすることにより、抗体中にマレイミドを導入し、ＳＭＣＣによりｈｕＣＤ２０－７抗体を修飾した。室温で、アルゴン雰囲気下、２～４時間撹拌した後、反応混合物を、同じリン酸カリウムバッファーで平衡化したＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ２５カラムを用いて精製した。抗体含有画分を集め、次の工程で用いた。
【０４５９】
ＳＭＣＣ修飾抗体を、マレイミドリンカーに対して１．７倍モル過剰量で、ＤＭ１の１０ｍＭ溶液と反応させた。反応物を、アルゴン雰囲気下、室温で４～約１６時間撹拌した。連結反応混合物を、ｐＨ６．５で、１×ＰＢＳで平衡化したＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ２５カラムでろ過した。次いで、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体を、１ｍＭヒスチジン、２５０ｍＭグリシン、１％ショ糖、ｐＨ５．５を含むバッファーで透析した。抗体分子あたりに連結したＤＭ１分子の数及び遊離の全メイタンシノイドの割合を、上述した通りに測定した。ｈｕＣＤ２０－７抗体あたり３．５～４個のＤＭ１分子を有する複合体を、未連結メイタンシノイドとして＜１％で得た。
【０４６０】
ｈｕＣｄ２０－７－ＳＰＤＢ－ＤＭ４の調製
【０４６１】
典型的なＮ－スクシニミジル４－（２－ピリジルジチオ）ブタノエート（ＳＰＤＢ）リンカーをエタノールに溶解した。５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、及び３％エタノールを含む５０ｍＭリン酸カリウム（ｐＨ６．５）中、ｈｕＣＤ２０－７抗体を、８ｍｇ／ｍＬで５倍モル過剰量のＳＰＤＢリンカーと約１０分間、室温でインキュベートした。反応混合物を、上述のリン酸カリウムバッファーで平衡化したＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ２５Ｆカラムを用いて精製した。抗体含有画分を集め、次の工程で用いた。
【０４６２】
メイタンシノイドＤＭ４をジメチルアセトアミド（ＤＭＡ、最終濃度は３％）に溶解し、リンカーに比較して１．７倍モル過剰量をＳＰＤＢ修飾抗体に滴下して加えた。室温で一晩インキュベーションした後、連結抗体を、１×ＰＢＳ　ｐＨ６．５で平衡化したＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ２５Ｆカラムによるクロマトグラフィーにより精製した。次いで、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＤＢ－ＤＭ４複合体を、１０ｍＭヒスチジン、２５０ｍＭグリシン、１％ショ糖　ｐＨ５．５を含むバッファーで透析した。抗体分子あたりに連結したＤＭ４の数を、抗体及びメイタンシノイドについて既に報告されている吸光係数（Ｗｉｄｄｉｓｏｎ，ＷＣら、Ｊ　Ｍｅｄ　Ｃｈｅｍ，４９：４３９２－４４０８（２００６））を用いて測定した。全ての遊離のメイタンシノイド種の割合を上述の通りに計算した。ｈｕＣＤ２０－７抗体あたり３．５～４個のＤＭ４分子を有する複合体を、未連結メイタンシノイドとして＜１％で得た。
【０４６３】
ｈｕＣＤ２０－７－ＰＥＧ４－ｍａｌ－ＤＭ４の調製
【０４６４】
ＤＭ４－ｍａｌ－ＰＥＧ４－ＮＨＳ試薬をＤＭＡに溶解し、１２ｍＭ貯蔵液を調製した。５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５及び１０容量％ＤＭＡ中、４ｍｇ／ｍＬの抗体濃度で、ｈｕＣＤ２０－７抗体を、１５当量のＤＭ４－ｍａｌ－ＰＥＧ４－ＮＨＳを用いて修飾した。アルゴン雰囲気下、室温で２～４時間撹拌した後、反応混合物を、同じリン酸カリウムバッファーで平衡化したＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ２５カラムを用いて精製した。

【０４６５】
次いで、ｈｕＣＤ２０－７－ＰＥＧ４－ｍａｌ－ＤＭ４複合体を、１０ｍＭヒスチジン、２５０ｍＭグリシン、１％ショ糖　ｐＨ５．５を含むバッファーで透析した。抗体分子あたりに連結するＤＭ４分子の数、及び遊離の全メイタンシノイド種の割合を、既に開示された通りにして測定した。ｈｕＣＤ２０－７抗体あたり３．５～４個のＤＭ４分子を有する複合体を、未連結メイタンシノイドとして＜１％で得た。
【０４６６】
ｈｕＣＤ２０－７－スルホ－ｍａｌ－ＤＭ４の調製
６０％　ＤＭＡ／４０％　２００ｍＭコハク酸バッファー　ｐＨ５中、３－フルオロ－ｍａｌ－ＮＨＳリンカーを１．６当量のＬ－ＤＭ４－ＳＨと、室温で２時間反応させることにより、ＤＭ４－ｍａｌ－３－スルホ－ＮＨＳをインサイチューで生成した。５０ｍＭリン酸カリウム、５０ｍＭ　ＮａＣｌ、２ｍＭ　ＥＤＴＡ、ｐＨ７．５及び１０容量％ＤＭＡ中、ｈｕＣＤ２０－７抗体（５ｍｇ／ｍＬ）あたり、８当量の反応混合物（４ｍＭリンカー濃度）を加えた。アルゴン雰囲気下、室温で２～４時間撹拌した後、反応混合物を、同じリン酸カリウムバッファーで平衡化したＳＥＰＨＡＤＥＸ（商標）Ｇ２５カラムを用いて精製した。
【０４６７】
次いで、ｈｕＣＤ２０－７－スルホ－ｍａｌ－ＤＭ４複合体を、１０ｍＭヒスチジン、２５０ｍＭグリシン、１％ショ糖　ｐＨ５．５を含むバッファーで透析した。抗体分子あたりに連結したＤＭ４分子の数、及び遊離の全メイタンシノイド種の割合を、上述した通りにして測定した。ｈｕＣＤ２０－７抗体あたり３．５～４個のＤＭ４分子を有する複合体を、未連結メイタンシノイドとして＜１％で得た。
【０４６８】
実施例１４
複合体の結合親和性
ＳＭＣＣ－ＤＭ１又はＳＰＰ－ＤＭ１と連結した後のｈｕＣＤ２０－７の結合親和性を、前記実施例に記載された通りにＥＬＩＳＡによりアッセイした。見かけの解離定数（K_d）の値は図２２に示す結合曲線から計算し、ｈｕＣＤ２０－７について０．７ｎＭ、ＳＭＣＣ－ＤＭ１について０．９ｎＭ、及びＳＰＰ－ＤＭ１複合体について１．１ｎＭに相当する。この結果は、例えば、ＳＭＣＣ－ＤＭ１又はＳＰＰ－ＤＭ１の連結が抗体の親和性を著しく変化させないことを証明する（例えば、ＣＤ２０－７）。
【０４６９】
更に、例えばスルホ－ｍａｌ－ＤＭ４に連結後のｈｕＣＤ２０－７の結合親和性を、上記実施例に記載された通りにアッセイした。見かけの解離定数（K_d）の値は、図２２Ｂに示す結合曲線から計算し、ｈｕＣＤ２０－７について０．８ｎＭ、スルホ－ｍａｌ－ＤＭ４複合体について１．３ｎＭに相当する。この結果は、スルホ－ｍａｌ－ＤＭ４の連結が抗体の親和性を著しく変化させないことを証明する（例えば、ＣＤ２０－７）。
【０４７０】
複合体のプロアポトーシス活性
【０４７１】
ＳＭＣＣ－ＤＭ１又はＳＰＤＢ－ＤＭ４へと連結した後のｈｕＣＤ２０－７のプロアポトーシス活性を、例えば、上記に記載したようなＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖアッセイにより、Ｒａｍｏｓ細胞によりアッセイした。Ｒａｍｏｓ細胞を、種々の濃度のｈｕＣＤ２０－７抗体又は複合体と２０時間インキュベートし、次いでＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ－ＦＩＴＣ及びＴＯ－ＰＲＯ（登録商標）－３染色し、フローサイトメトリー分析を行った。Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞の割合を、図２３の片対数プロットにおいて抗体濃度に対してプロットした。ｈｕＣＤ２０－７による処理は、未処理細胞についての３％と比較し、Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖの５１％の最大をもたらす。リツキシマブによる処理は、たったの１０％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞を誘発した。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体による処理は、Ａｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞の７３％までの増加をもたらしたが、ｈｕＣＤ２０－

７－ＳＭＣＣ－ＤＭ４は、８２％までの更なる増加をもたらした。一方、非結合アイソタイプコントロール抗体のＳＭＣＣ－ＤＭ１又はＳＰＤＢ－ＤＭ４複合体は、それぞれ、４％又は８％のＡｎｎｅｘｉｎ－Ｖ陽性細胞をもたらした。例えば、Ｒａｍｏｓ細胞に対するｈｕＣＤ２０－７のプロアポトーシス活性は、メイタンシノイド連結により増強する。

【０４７２】

複合体のＣＤＣ活性

【０４７３】

例えば、連結後のｈｕＣＤ２０－７のＣＤＣ活性を、前述した通りに、ヒト補体の存在下におけるリンパ腫細胞においてアッセイした。Ｄａｕｄｉリンパ腫細胞について図２４Ａに示すように、例示的な、ｈｕＣＤ２０－７のＳＰＤＢ－ＤＭ４及びＰＥＧ４－ｍａｌ－ＤＭ４複合体は、未連結抗体として、類似のＣＤＣ活性、及び約０．４μｇ／ｍＬのＥＣ$_{50}$を有していた。

【０４７４】

ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２びまん性Ｂ細胞リンパ腫（図２４Ｂ）においては、ｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＤＢ－ＤＭ４及びｈｕＣＤ２０－７－ＰＥＧ４－ｍａｌ－ＤＭ４は、同様のＣＤＣ活性、及び約０．５μｇ／ｍＬのＥＣ$_{50}$を有していた。ＷＳＵ－ＤＬＣＬ－２細胞について図２５Ａに示すように、ｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、－ＳＰＰ－ＤＭ１及びスルホ－ｍａｌ－ＤＭ４は同様のＣＤＣ活性及び約０．５μｇ／ｍＬのＥＣ$_{50}$を有していた。Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞（図２５Ｂ）においては、ｈｕＣＤ２０－７、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、－ＳＰＰ－ＤＭ１及びスルホ－ｍａｌ－ＤＭ４は同様のＣＤＣ活性及び約０．２μｇ／ｍＬのＥＣ$_{50}$を有していた。従って、例えば、ｈｕＣＤ２０－７のＣＤＣ活性は、メイタンシノイド連結の後に維持されている。

【０４７５】

複合体のＡＤＣＣ活性

例えば、ＳＭＣＣ－ＤＭ１と連結後のｈｕＣＤ２０－７のＡＤＣＣ活性を、前述したような、ＬＤＨリリースアッセイにより、ヒトＮＫエフェクター細胞の存在下に、Ｒａｍｏｓ及びＧｒａｎｔａ－５１９細胞において評価した。図２６に示すように、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、Ｒａｍｏｓ細胞において未連結のｈｕＣＤ２０－７抗体と同様のＡＤＣＣ活性、４０％の最大細胞溶解、並びにそれぞれ１．８ｎｇ／ｍＬ及び１．４ｎｇ／ｍＬのＥＣ$_{50}$を有する。標的細胞として他の細胞（例えば、Ｇｒａｎｔａ－５１９　ＭＣＬ細胞）を用いて同様の結果が得られた。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞において、未連結のｈｕＣＤ２０－７抗体と、同程度のＡＤＣＣ活性を有し、約２５％の最大細胞溶解、並びにそれぞれ０．２２ｎｇ／ｍＬ及び０．１４ｎｇ／ｍＬのＥＣ$_{50}$を有する。ＣＤＣについて見られるように、ｈｕＣＤ２０－７のＡＤＣＣ活性は、メイタンシノイド連結後に維持されている。

【０４７６】

実施例１５

【０４７７】

インビトロにおける細胞毒性アッセイ

【０４７８】

例示的なｈｕＣＤ２０－７複合体の、細胞増殖を阻害する能力を、インビトロ細胞毒性アッセイを用いて測定した。通常、標的細胞を、１００μＬの完全ＲＰＭＩ培地（ＲＰＭＩ－１６４０、１０％ウシ胎児血清、２ｍＭグルタミン、１％　ペニシリン－ストレプトマイシン、全ての試薬はＩｎｖｉｔｒｏｇｅｎ製）中、ウェルあたり５，０００細胞に播種した。抗体及び複合体を、３倍希釈系列を用いて、完全ＲＰＭＩ培地で希釈し、ウェルあたり１００μＬを加えた。最終濃度は、通常は3×10^{-8}Ｍ～4.6×10^{-12}Ｍの範囲であった。細胞を、加湿した５％CO_2インキュベーター内で、３７℃で４～５日間インキュベートした。残存する細胞の生存度を、比色分析ＷＳＴ－８アッセイ（Ｄｏｊｉｎｄｏ　Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．，Ｒｏｃｋｖｉｌ

ｌｅ，ＭＤ，ＵＳ）により測定した。ＷＳＴ－８は、組織培養培地内で可溶性であるオレンジ色のホルマザン産物に対して、生細胞内のデヒドロゲナーゼにより減少する。ホルマザン産物の量は、生細胞の数に直接比例する。ＷＳＴ－８を、最終容積の１０％で加え、プレートを、加湿した５％CO_2インキュベーター中で、更に２～４時間、３７℃でインキュベートした。マルチウェルプレートリーダー内で、４５０ｎｍの吸光度（A_{450}）を測定することにより、プレートを分析した。培地及びＷＳＴ－８のみを含むウェルのバックグラウンドのA_{450}の吸光度を全ての値から引いた。生存度の割合は、処理した、各試料の値を、未処理の細胞を含むウェルの平均値で割ることにより計算した。生存度の割合＝１００＊（処理した試料のA_{450}－バックグラウンドのA_{450}）／（未処理の試料のA_{450}－バックグラウンドのA_{450}）。生存度の割合の値を、各処理について、片対数プロットにおいて、抗体又は複合体濃度に対してプロットした。

【０４７９】

Ｒａｍｏｓ細胞における、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロにおける細胞毒性

Ｒａｍｏｓ細胞に対する、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロにおける細胞毒性を、リツキシマブ及び非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の活性と比較した。図２７Ａに示すように、ｈｕＣＤ２０－７のインキュベーションは、生存度の６０％までの低下をもたらしたが、リツキシマブは生存度を８０％まで低下させた。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、生存度を完全に低下させ、０．６８ｎＭのEC_{50}を有していたが、非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は２０ｎＭのEC_{50}を有しており、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１について、予想外の有意な２９倍の特異性ウインドウをもたらした。

【０４８０】

Ｒａｍｏｓ細胞に対するｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロにおける細胞毒性を、リツキシマブ及び非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の活性と比較した。図２７Ａに示すように、ｈｕＣＤ２０－７のインキュベーションは、生存度の６０％までの低下をもたらしたが、リツキシマブは８０％まで生存度を低下させた。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、生存度を完全に低下させ、０．６８ｎＭのEC_{50}を有していたが、非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は２０ｎＭのEC_{50}を有しており、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１について、予想外の有意な２９倍の特異性ウインドウをもたらした。

【０４８１】

Ｄａｕｄｉ細胞における、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性

【０４８２】

Ｄａｕｄｉ細胞に対する、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性を、リツキシマブ及び非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の活性と比較した。図２７Ｂに示すように、ｈｕＣＤ２０－７のインキュベーションは、最大濃度において、生存度の６５％までの低下をもたらしたが、リツキシマブは８０％まで穏やかに生存度を低下させた。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、試験した最大濃度で、生存度を完全に低下させ、０．７７ｎＭのEC_{50}を有していたが、非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、１２ｎＭのEC_{50}を有し、Ｄａｕｄｉ細胞に対して、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１について予想外の有意な１６倍の特異性ウインドウをもたらした。

【０４８３】

Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞における、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性

【０４８４】

Ｇｒａｎｔａ－５１９　ＭＣＬ細胞に対する、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性を、リツキシマブ及び非特異的ｈｕＩｇＧ－Ｓ

ＭＣＣ－ＤＭ１複合体の活性と比較した。図２８Ａに示すように、ｈｕＣＤ２０－７のインキュベーションは、最大濃度において、生存度の４５％までの低下をもたらしたが、リツキシマブは６０％まで穏やかに生存度を低下させた。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、試験した最大濃度で、生存度を完全に低下させ、０．０３ｎＭのＥＣ$_{50}$を有していたが、非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、１３ｎＭのＥＣ$_{50}$を有し、Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞に対して、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１について予想外の有意な４１９倍の特異性ウインドウをもたらした。

【０４８５】

ＳＣ－１細胞における、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性

ＳＣ－１　ＦＬ細胞に対する、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性を、リツキシマブ及び非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の活性と比較した。図２８Ｂに示すように、ｈｕＣＤ２０－７のインキュベーションは、最大濃度において、生存度の３５％までの低下をもたらしたが、リツキシマブは７５％まで穏やかに生存度を低下させた。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、試験した最大濃度で、生存度を完全に低下させ、０．３９ｎＭのＥＣ$_{50}$を有していたが、非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、３１ｎＭのＥＣ$_{50}$を有し、ＳＣ－１細胞に対して、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１について予想外の有意な７９倍の特異性ウインドウをもたらした。

【０４８６】

ＤＯＨＨ－２細胞におけるｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性

【０４８７】

ＤＯＨＨ－２　ＦＬ細胞に対する、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性を、リツキシマブ及び非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の活性と比較した。図２９Ａに示すように、ｈｕＣＤ２０－７のインキュベーションは、最大濃度において、生存度の２０％までの低下をもたらしたが、リツキシマブは２５％まで生存度を低下させた。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、試験した最大濃度で、生存度を完全に低下させ、０．１２ｎＭのＥＣ$_{50}$を有していたが、非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、３５ｎＭのＥＣ$_{50}$を有し、ＤＯＨＨ－２細胞に対して、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１について予想外の有意な２９２倍の特異性ウインドウをもたらした。

【０４８８】

Ｍｏｌｔ－４細胞に対するｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性

ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１細胞毒性の特異性を更に検証するため、その活性を、非ＣＤ２０発現Ｍｏｌｔ－４　Ｔ－細胞急性リンパ性白血病細胞系に対する非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体と比較した。本実験においては、相対的に低い非特異的細胞毒性をとらえるために、濃度の高い、両複合体を用いた。図２９Ｂに示すように、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及び非特異的複合体は、３３ｎＭのＥＣ$_{50}$を有しており、同じ細胞毒性を示した。

【０４８９】

ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性の概要

例えば、意外にも、ｈｕＣＤ２０－７は、Ｒａｍｏｓ、Ｄａｕｄｉ、Ｇｒａｎｔａ－５１９、ＳＣ－１及びＤＯＨＨ－２細胞に対し、リツキシマブよりも活性である。標的細胞の生存度の低下は、ｈｕＣＤ２０－７とのインキュベーション後の、リツキシマブとの処理よりも大きい。更に、例えば、ｈｕＣＤ２０－７のＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、抗体に対して強力な細胞毒性活性をもたらす。腫瘍細胞の生存度は、抗体処理のみと比較し、複合体処理に応答し、より完全に低下した。非標的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の効力に対してｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１の効力を比較した場合、各ＣＤ２０発現細胞系について、有意な特異性ウインドウが観察され、これは、細胞毒性が、ｈｕＣＤ

２０－７抗体標的細胞と結合した結果であることを示す。更に、例えば、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及び複合体は、抗原陰性のＭｏｌｔ－４細胞に対して同一の低い細胞毒性を示した。従って、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１について観察された細胞毒性は、ＣＤ２０の発現に依存する。

ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体についてのＥＣ$_{50}$

【０４９０】

【表３】

	Ramos	Daudi	Granta-519	SC-1	DOHH-2	Molt-4
huCD20-7-SMCC-DM1	0.68 nM	0.77 nM	0.03 nM	0.39 nM	0.12 nM	33 nM
huIgG1-SMCC-DM1	20 nM	12 nM	13 nM	31 nM	35 nM	33 nM
特異性ウインドウ	29	16	419	79	292	1

【０４９１】

実施例１６

【０４９２】

ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１は、Ｒａｍｏｓ細胞に対して、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１よりも活性である

【０４９３】

例えば、Ｒａｍｏｓリンパ腫細胞に対する、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性を、リツキシマブ、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及び非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の活性と比較した。図３０Ａに示すように、ｈｕＣＤ２０－７によるインキュベーションは、最大濃度において、生存度の５５％までの低下をもたらしたが、リツキシマブは大幅に生存度を低下しなかった。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、生存度を完全に低下させ、０．７２ｎＭのＥＣ$_{50}$を有していたが、非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、２２ｎＭのＥＣ$_{50}$を有していた。リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、３．３ｎＭのＥＣ$_{50}$をもって細胞毒性をもたらした。従って、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１よりもインビトロにおける強力な細胞毒性活性を有していた。

【０４９４】

ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１は、Ｄａｕｄｉ細胞に対して、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１よりも活性である

例えば、Ｄａｕｄｉリンパ腫細胞に対する、ｈｕＣＤ２０－７及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１のインビトロ細胞毒性を、リツキシマブ、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及び非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体の活性と比較した。図３０Ｂに示すように、ｈｕＣＤ２０－７によるインキュベーションは、最大濃度において、生存度の５０％までの低下をもたらしたが、リツキシマブは６５％まで生存度を低下させた。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、生存度をなくし、１．０ｎＭのＥＣ$_{50}$を有していたが、非特異的ｈｕＩｇＧ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、１５ｎＭのＥＣ$_{50}$を有していた。リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、２．６ｎＭのＥＣ$_{50}$をもって細胞毒性をもたらした。従って、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１よりもインビトロにおける強力な細胞毒性活性を有していた。

【０４９５】

実施例１７

【０４９６】

放射性標識複合体の調製

【０４９７】
ｈｕＣＤ２０－７及びリツキシマブの放射標識複合体は、トリチウム標識ＤＭ１（［^{3}Ｈ］ＤＭ１）を用いることを除き、非標識複合体についてＷｉｄｄｉｓｏｎら（Ｗｉｄｄｉｓｏｎら、Ｊ Ｍｅｄ Ｃｈｅｍ ２００６；４９：４３９２－４０８）に開示されたのと基本的に同一の方法を用いて調製した。この方法は、Ｅｒｉｃｋｓｏｎら（Ｅｒｉｃｋｓｏｎら Ｂｉｏｃｏｎｊｕｇ Ｃｈｅｍ ２０１０；２１：８４－９２）にも詳細に開示されている。

【０４９８】
すなわち、最初に、抗体を、そのリジン残基を、Ｎ－スクシニミジル４－（Ｎ－マレイミドメチル）シクロヘキサン－１カルボキシレート（ＳＭＣＣ）で修飾し、ゲルろ過により精製し、トリチウムを、そのＣ－２０－メトキシ基に安定に導入し、ＤＭ１と連結させた。トリチウム標識ＤＭ１は、アンサミトシンＰ－３から調製した。細菌株ストレプトマイセス・プラテンシスとインキュベートすることにより、アンサミトシンＰ－３のＣ２０メトキシ基を除去し、アンサミトシンＰＤＭ－３を得た（Ａｓａｉら、米国特許第４，３０７，０１６号）。次いで、アンサミトシンＰＤＭ－３のＣ－２０－ＯＨ部分を、Ｓａｗａｄａ（Ｓａｗａｄａら．Ｂｉｏｃｏｎｊ Ｃｈｅｍ １９９３；４：２８４－２８９）に開示された方法により、トリチウム標識ヨウ化メチルを用いてメチル化した。抗体分子あたりの連結メイタンシノイド分子の比（Ｄ／Ａ）及び比放射能を以下の通りであった：リツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１（３．５Ｄ／Ａ、１．９Ｃｉ／ミリモル）及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１（３．４Ｄ／Ａ、１．８ｃｉ／ミリモル）。

【０４９９】
リツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１の活性

【０５００】
２種の複合体及び関連未修飾抗体が、ＣＤ２０陽性ＳＵ－ＤＨＬ－４細胞に対する類似の結合親和性を有することがわかった（図３１Ａ）。ＣＤ２０－陽性ＳＵ－ＤＨＬ－４細胞及びＣＤ２０－陰性ＣＯＬＯ２０５についての２種の複合体の細胞毒性の効力を、実施例１５に開示されたような、細胞に基づく生存度アッセイを用いて評価した。両方の複合体は、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１及びリツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１複合体、それぞれについて、約０．１ｎＭ及び０．２４ｎＭのＩＣ$_{50}$値をもって強力であることがわかった（図３１Ｂ）。予想通り、両方の複合体は、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１及びリツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１複合体、それぞれについて３４ｎＭ及び１１ｎＭのＥＣ$_{50}$値を有し、抗原－陰性ＣＯＬＯ２０５大腸癌に対して効力は弱かった。これは、これら２種の複合体による細胞死滅がＣＤ２０－依存的であることを示す。Ｒａｍｏｓ及びＤａｕｄｉ細胞について実施例１６に示すように、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１複合体は、ＳＵ－ＤＨＬ－４細胞に対して、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－ＤＭ１よりも強力な細胞毒性活性を有していた。

【０５０１】
リツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１の標的細胞代謝産物

放射標識複合体に標的細胞をさらした後に形成される代謝産物の量及びタイプを評価するために、１０％ ＦＢＳを追加した２１ｍＬのＲＰＭＩ－１６４０培地内のＳＵ－ＤＨＬ－４細胞の培養物（１７×１０^{6}）を、３７℃、６％ＣＯ$_{2}$中、４０ｎＭの^{3}Ｈ－複合体に３０分間さらした。細胞をＲＭＰＩ－１６４０培地で３回洗浄し、あらゆる未結合複合体を除去し、新鮮な培地に再懸濁し（８×１０^{5}細胞／ｍＬ）、３７℃、６％ＣＯ$_{2}$で２２時間インキュベートした。細胞を集め、０．３ｍＬのＴｒｉｓ緩衝生理食塩水、ｐＨ７．５に懸濁した。アセトン（４：３ｖ／ｖ）を加え、試料を混合し、－８０℃で１時間凍結し、タンパク質を沈殿させた。試料を解凍し、２，０００×ｇで１５分間遠心分離し、再懸濁し、沈殿物を分離した。真空遠心分離（ｅｖａｃｕａｔｅｄ ｃｅｎｔｒｉｆｕ

ｇｅ）を用いて、タンパク質を含まないメイタンシノイド代謝産物を含む上清を蒸発して乾燥した。抽出物を、０．０２５％のトリフルオロ酢酸を含む２０％アセトン水溶液（０．１２ｍＬ）に溶解し、メイタンシノイドについて分離されたメイタンシノイド代謝産物を、分析用Ｃ－１８カラム（Ｖｙｄａｃ，０．４６×２５ｃｍ）（Ｅｒｉｃｋｓｏｎら．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２００６；６６：４４２６－３３）により分離した。溶出物を１ｍＬの画分に集め、各画分についての放射活性を、各バイアルを４ｍＬのＵｌｔｉｍａ　Ｇｏｌｄ液体シンチレーションカクテルと混合し、Ｔｒｉ－Ｃａｒｂ　２９００Ｔ液体シンチレーションカウンターでカウントすることにより測定した。

【０５０２】

アセトン沈殿物を０．３ｍＬの水に再懸濁し、１ｍＬのＳｏｌｖａｂｌｅ試薬（Ｐｅｒｋｉｎ　Ｅｌｍｅｒ）を加えることにより溶解した。次いで、試料を５０℃の水浴中で一晩インキュベートした。インキュベーションから試料を取り除き、０．１ｍＬの０．１Ｍ　ＥＤＴＡ及び０．３ｍＬの３０％過酸化水素を各試料に加え、次いで室温で１５分間インキュベートした。次いで、試料を５０℃で１時間インキュベートした。０．２ｍＬの１Ｎ　ＨＣｌを各試料に加え、１５ｍＬのＵｌｔｉｍａ　Ｇｏｌｄシンチレーション液を加えた。試料を激しく撹拌し、暗所に一晩置き、ＬＳＣによりカウントした。

【０５０３】

ＳＵ－ＤＨＬ－４細胞を、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１及びリツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１に短時間さらすことにより、細胞あたりに結合する同様の高レベルの複合体が得られた（図３２Ａ）。細胞あたりに結合する各複合体の量を、複合体への初期暴露及び洗浄工程後の細胞に関連する全放射活性から測定した。アセトン抽出及び放射線測定を伴うＨＰＬＣ分離により、暴露の２２時間後に、メイタンシノイド代謝産物を定量した。両方の複合体にさらした２２時間後の細胞に観察されるたった１種の代謝産物はリシン－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１であることがわかった。他の代謝産物は観察されなかった。リシン－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１代謝産物は、ｈｕＣ２４２－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１のたった１種の標的細胞代謝産物であると、すでに同定されていた（ＥｒｉｃｋｓｏｎらＣａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ　２００６；６６：４４２６－３３）。細胞をｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１複合体にさらした２２時間後のリシン－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１のレベルは、約０．６ピコモル／１０^{6}細胞であることがわかった。一方、細胞をリツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１複合体にさらした２２時間後のリシン－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１のレベルは、約０．３ピコモル／１０^{6}細胞であることがわかった。従って、細胞を、リツキシマブ－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１にさらした後よりも、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－［^{3}Ｈ］ＤＭ１複合体にさらした後に２倍多いレベルの代謝産物が形成される（図３２Ｂ）。この、ｈｕＣＤ２０－７複合体により形成される代謝産物のレベルの上昇は、ｈｕＣＤ２０－７複合体のインビトロにおける活性を増大させる。従って、例えば、ｈｕＣＤ２０－７は、インビトロで非開裂複合体として、より効果的な、独特の物理的及び機能的特性を有する抗体である。

【０５０４】

実施例１８

【０５０５】

種々のリンカーを有するｈｕＣＤ２０－７複合体のインビトロ細胞毒性

【０５０６】

ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１の細胞毒性を、種々のリンカーを用いて調製した複合体のものと比較した。図３３Ａに示すように、例えば、ｈｕＣＤ２０－７のＳＰＤＢ－ＤＭ４及びＰＥＧ４－ｍａｌ－ＤＭ４複合体は、Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞に対して、ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体と類似の細胞毒性活性を有する。いずれの複合体も、細胞生存度の完全な低下をもたらし、０．０６ｎＭのＥＣ$_{50}$を有する。図３３Ｂに示すように、例えば、ｈｕＣＤ２０－７のＳＰＰ－ＤＭ１及びスルホ－ｍａｌ－ＤＭ４複合体も、Ｇｒａｎｔａ－５１９細胞に対して、ＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体と類似の細胞毒性活性を有する。全ての複合体は、細胞生存度の完全な低下をもたらし、０．１ｎＭのＥＣ$_{50}$を有する

。

実施例１９

【０５０７】

ＳＵ－ＤＨＬ－４異種移植片モデル内におけるｈｕＣＤ２０－７抗体のインビボ効果

【０５０８】

典型的なｈｕＣＤ２０－７抗体は、確立された、ＳＣＩＤマウスに皮下移植するＳＵ－ＤＨＬ－４びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫細胞の異種移植モデルを用いて試験した。マウスを体重により無作為に処理群に分け、１０又は１ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７又はリツキシマブのいずれかを用いて、接種の１４、２１及び２８日後に、週に３回処理した。種々の処理群の平均腫瘍容積を、図３４においてプロットする。１ｍｇ／ｋｇ用量より強力な１０ｍｇ／ｋｇの用量を有する両方の用量のＰＢＳコントロールと比較し、リツキシマブによる処理は、腫瘍容積の減少をもたらした。１ｍｇ／ｋｇにおけるｈｕＣＤ２０－７による処理は、同じ用量におけるリツキシマブよりも、ＰＢＳと比較し、平均腫瘍容積において、言明される減少をもたらした。１０ｍｇ／ｋｇにおけるｈｕＣＤ２０－７による処理は、リツキシマブに関して劇的な腫瘍増殖の減少をもたらした。試験の６６日に、ｈｕＣＤ２０－７処理は１０個中７個の生存（ＴＦＳ）をもたらしたが、リツキシマブ処理は１０個中たったの１個のＴＦＳをもたらした。ＰＢＳコントロール、また１ｍｇ／ｋｇの処理分のいずれにもＴＦＳは観察されなかった。

【０５０９】

実施例２０

【０５１０】

Ｄａｕｄｉ異種移植片モデルにおける、ｈｕＣＤ２０－７抗体、－ＳＰＰ－ＤＭ１、ＳＭＣＣ－ＤＭ１及びＢＭＰＳ－ＤＭ１複合体のインビボにおける効果

【０５１１】

ＳＣＩＤマウス内に静脈注射により移植したＤａｕｄｉリンパ腫細胞を用いた異種移植片モデルにおいて、ｈｕＣＤ２０－７抗体及びその複合体を試験した。マウスを、体重により無作為に処理群に分け、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、又は５ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１のいずれかを用いて細胞接種の７日後に１回処理した。種々の処理群中の生存マウスの数を図３５Ａにプロットする。マウスのＰＢＳ処理群についての平均生存期間は２７日であった。ｈｕＣＤ２０－７処理は、平均生存期間を４５日に増大した。複合体は両者とも、抗体と比べ、平均生存期間を更に増大した。ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及びｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１は、それぞれ６４日及び５８日の平均生存期間をもたらした。

【０５１２】

ＳＣＩＤマウスに静脈注射により移植したＤａｕｄｉリンパ腫細胞を用いた、同様の異種移植片モデルにおいては、細胞接種７日に、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７、リツキシマブ、ｈｕＣＨ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１又はｈｕＣＨ２０－７－ＢＭＰＳ－ＤＭ１のいずれかでマウスを処理した。種々の処理群の生存マウスの数を、図３５Ｂにおいてプロットする。ＰＢＳ処理したマウスの群についての平均生存期間は３１日であり、ｈｕＣＨ２０－７による処理は、平均生存期間を４９日に増大した。一方、リツキシマブによる処理は、平均生存期間を４０日に増大した。ｈｕＣＤ２０－７－をベースとする両者の複合体は、抗体と比較して生存期間の更なる増大をもたらし、ｈｕＣＨ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１及びｈｕＣＨ２０－７－ＢＭＰＳ－ＤＭ１は、それぞれ、５日における９０％及び１００％の生存をもたらした。

【０５１３】

ＤＯＨＨ－２異種移植片モデルにおける、ｈｕＣＤ２０－７抗体及び－ＳＰＰ－ＤＭ１及びＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体のインビボにおける効果

【０５１４】

ＳＣＩＤマウスに皮下移植したＤＯＨＨ－２濾胞性リンパ腫細胞を用いて、予め容易に

触知できる異種移植片モデルにおいて、典型的なｈｕＣＤ２０－７抗体及びその複合体の試験を行った。マウスを、体重により無作為に処理群に分け、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７、１０ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１、又は５ｍｇ／ｋｇのｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１のいずれかを用いて細胞接種の３日後に１回処理した。種々の処理群の平均腫瘍容積を図３６にプロットする。ｈｕＣＤ２０－７抗体による処理は、ＰＢＳコントロールと比べ、平均腫瘍容積の減少をもたらした。未連結抗体と比べ、ｈｕＣＤ２０－７複合体については更に良好な効果が見られた。９０日の試験の終わりに、ｈｕＣＤ２０－７による処理は、１０頭中２頭の腫瘍のない生存マウス（ＴＦＳ）をもたらしたが、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＭＣＣ－ＤＭ１による処理は、１０頭中６頭のＴＦＳ、ｈｕＣＤ２０－７－ＳＰＰ－ＤＭ１による処理は、１０頭中１０頭のＴＦＳをもたらした。ＰＢＳコントロール群にはＴＦＳは観察されなかった。

【０５１５】

ｈｕＣＤ２０－７－をベースとする複合体のインビボにおける効果の概要

【０５１６】

ＣＤ２０抗体の複合体は既に開示されている。１つのケースにおいて、抗－ＣＤ２０抗体の開裂不可能なＳＭＣＣ－ＤＭ１複合体は、未連結抗体と同じ効果を示したが、同じ抗体の開裂可能なＳＰＰ－ＤＭ１複合体は、ＳＣＩＤマウスにおけるＧｒａｎｔａ－５１９異種移植片モデルにおいて、向上した効果を示した（Ｐｏｌｓｏｎら、上述）。同様に、酸安定アミドリンカーを用いて製造されたリツキシマブのカリケアマイシン複合体は、ヌードマウスにおけるＲａｍｏｓ異種移植片モデルにおいて、向上したインビボ効果を示さなかった。酸に不安定なジメチルヒドラジドＡｃ－Ｂｕｔリンカーを用いて製造されたリツキシマブのカリケアマイシン複合体のみが、本研究において向上したインビボ効果を示した（ＤｉＪｏｓｅｐｈら、上述）。

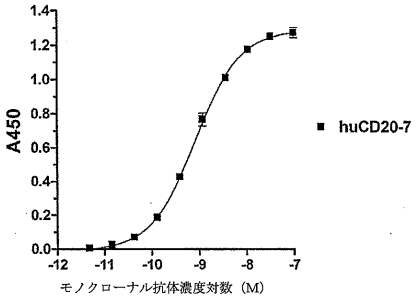
【０５１７】

意外にも、例えば、ＳＭＣＣ－ＤＭ１又はＢＭＰＳ－ＤＭ１複合体のようなｈｕＣＤ２０－７の開裂不可能な複合体は、未連結抗体と比較し、２種の異種移植片モデルにおいて劇的に向上したインビボ効果を示す。更に、例えばＳＰＰ－ＤＭ１複合体のような、ｈｕＣＤ２０－７の開裂可能な複合体は、未連結抗体と比べ、同様に向上したインビボ効果を示す。例えば、ｈｕＣＤ２０－７は、インビボにおける開裂不可能な複合体のように効果的なものとする、独特な物理的及び機能的特性を有する抗体である。

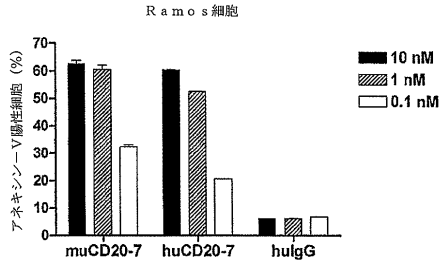
【０５１８】

本発明を詳細に、また特定の態様を参照して説明したが、本発明の精神及び範囲を逸脱することなく、種々の変形及び修飾をなし得ることは当業者には明らかである。

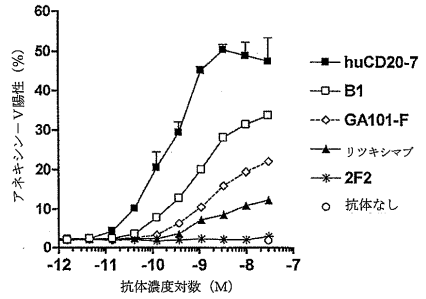
【図１０】



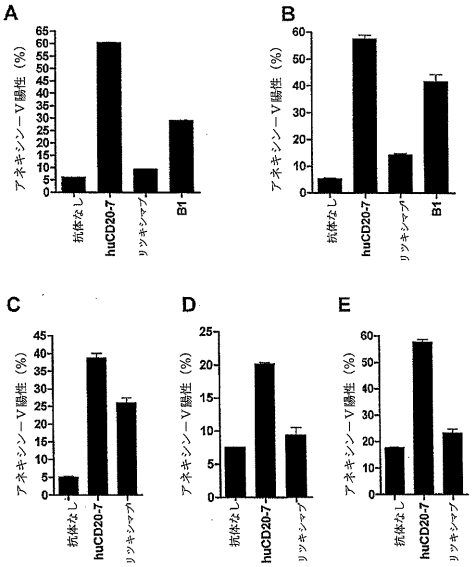
【図１１】



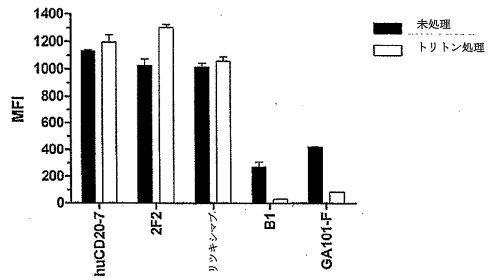
【図１２】



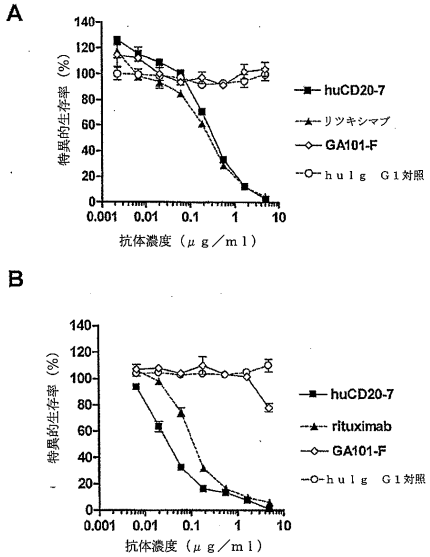
【図１３】



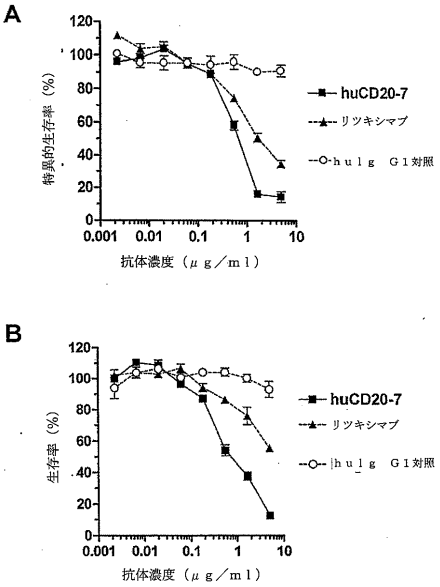
【図１４】



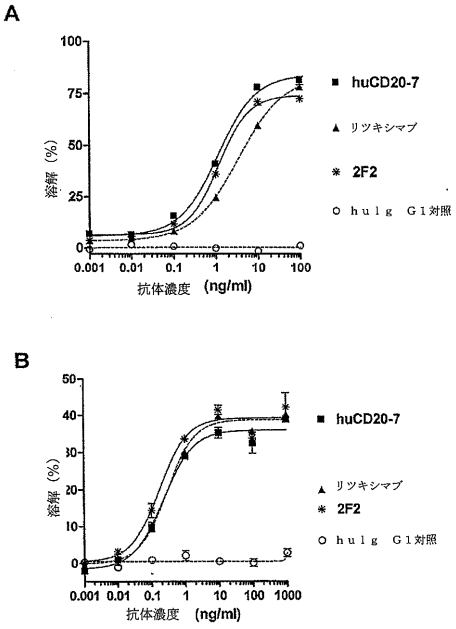
【図１５】



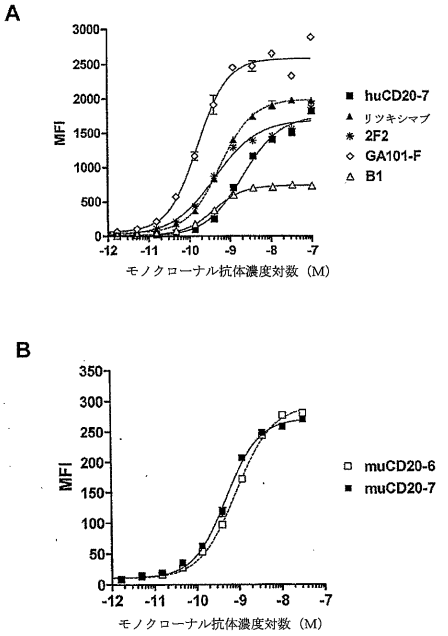
【図１６】



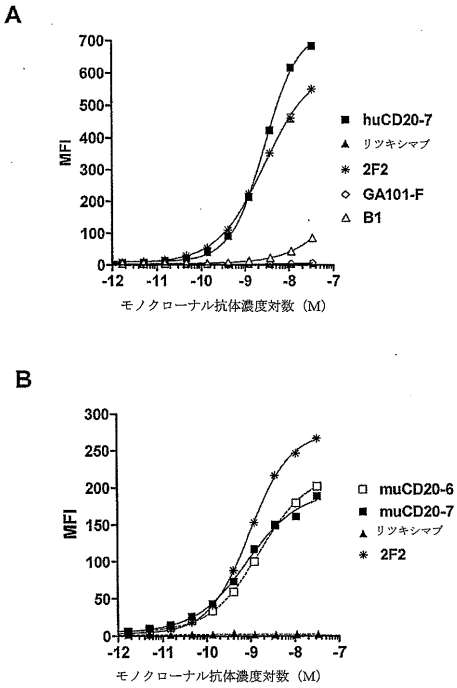
【図１７】



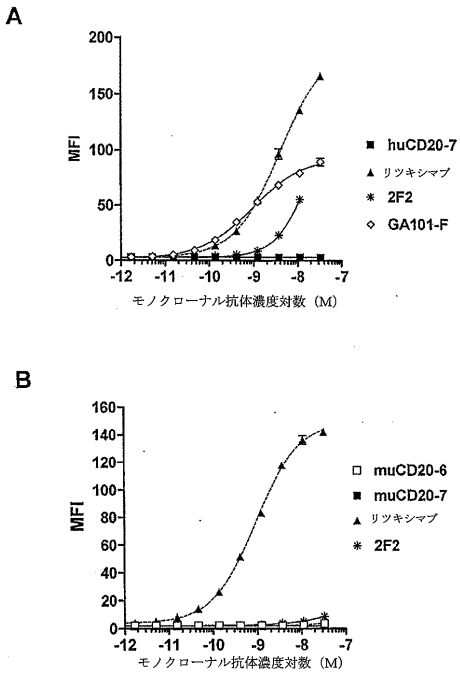
【図１８】



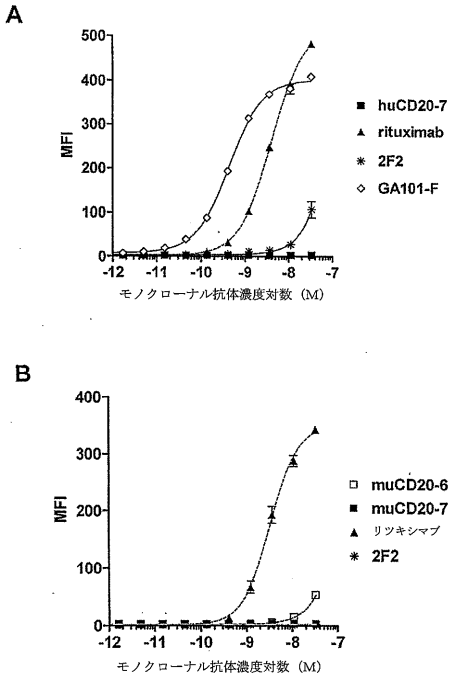
【図１９】



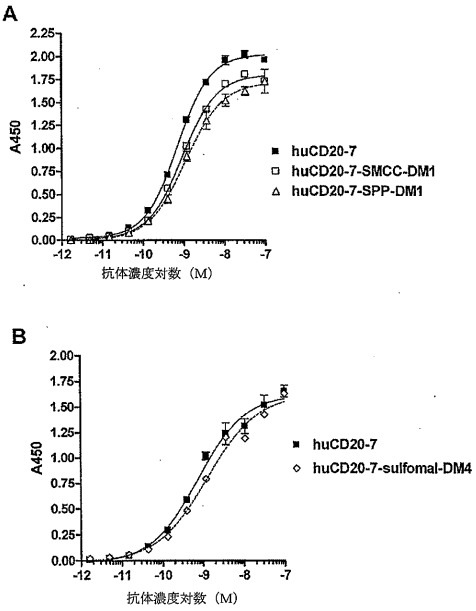
【図２０】



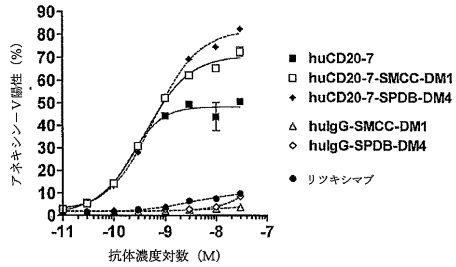
【図２１】



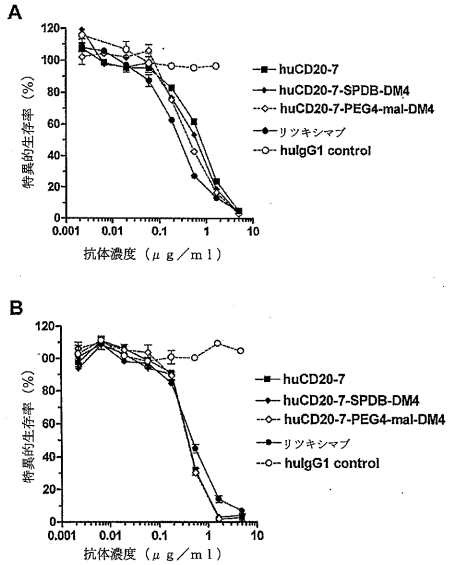
【図２２】



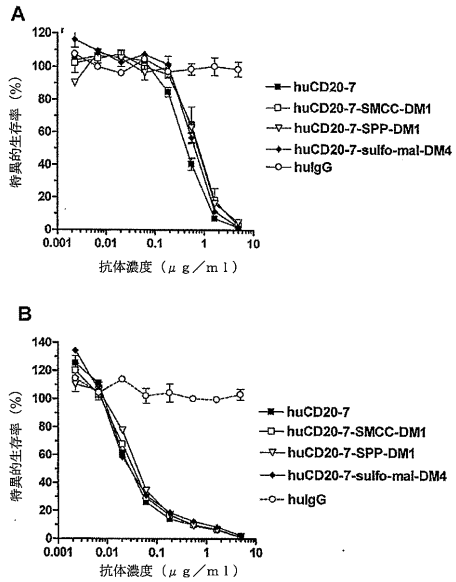
【図２３】



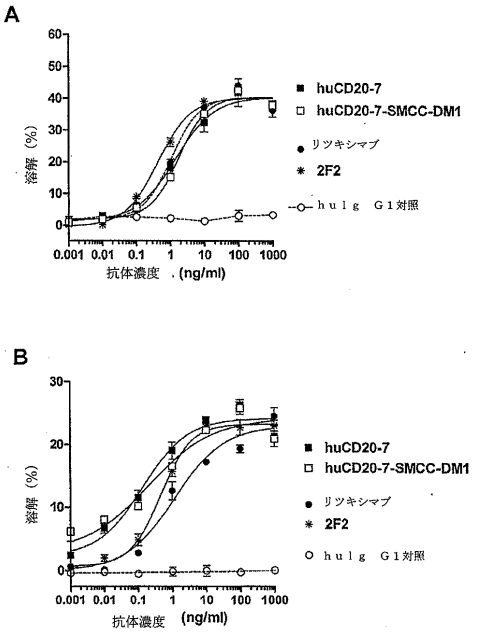
【図２４】



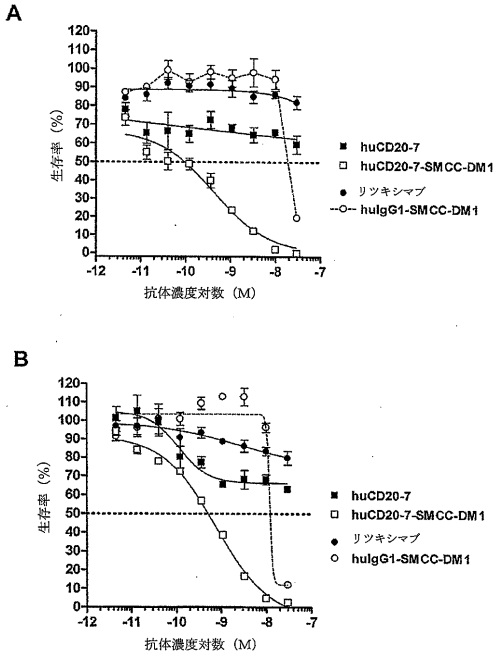
【図２５】



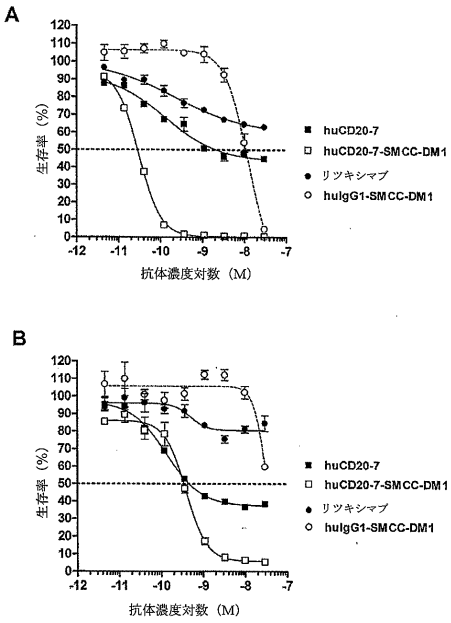
【図２６】



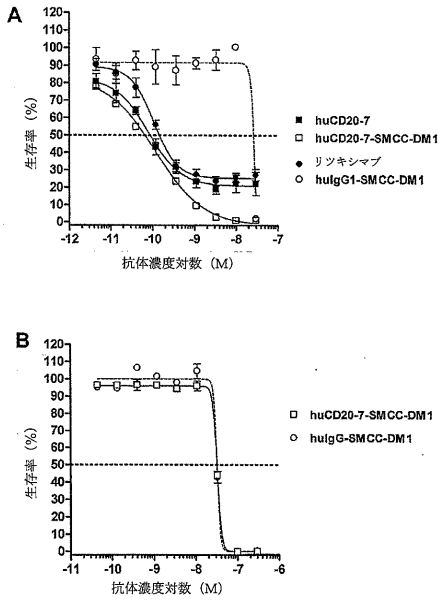
【図２７】



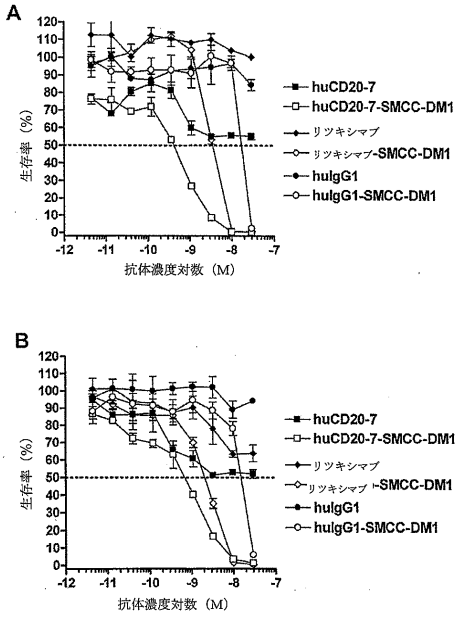
【図２８】



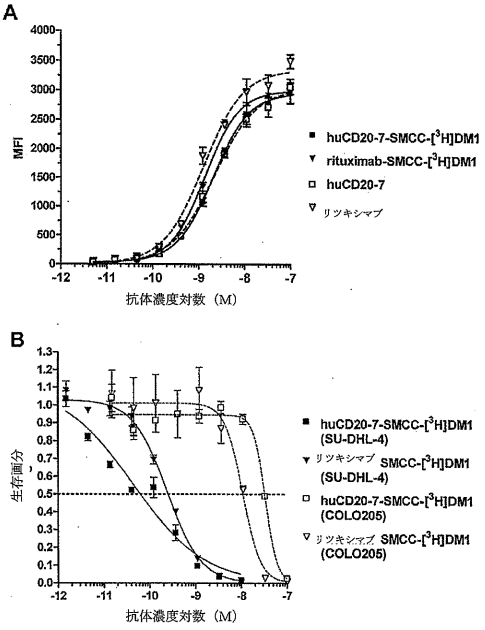
【図２９】



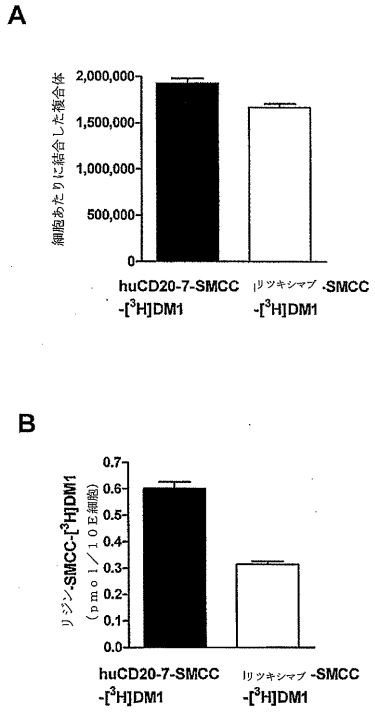
【図３０】



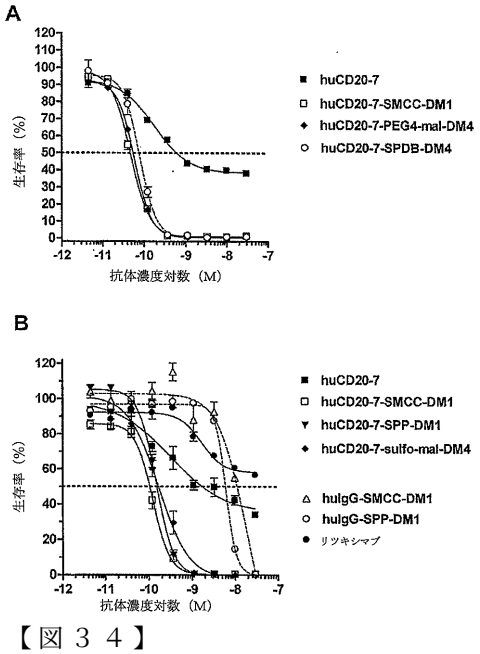
【図３１】



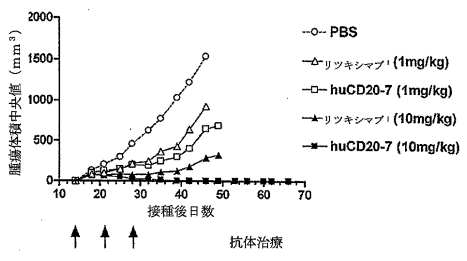
【図３２】



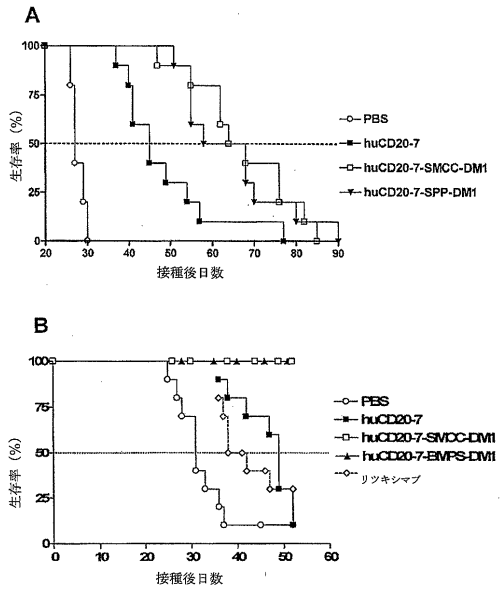
【図３３】



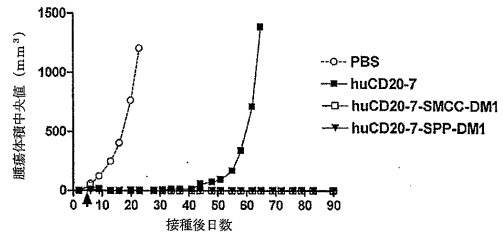
【図３４】



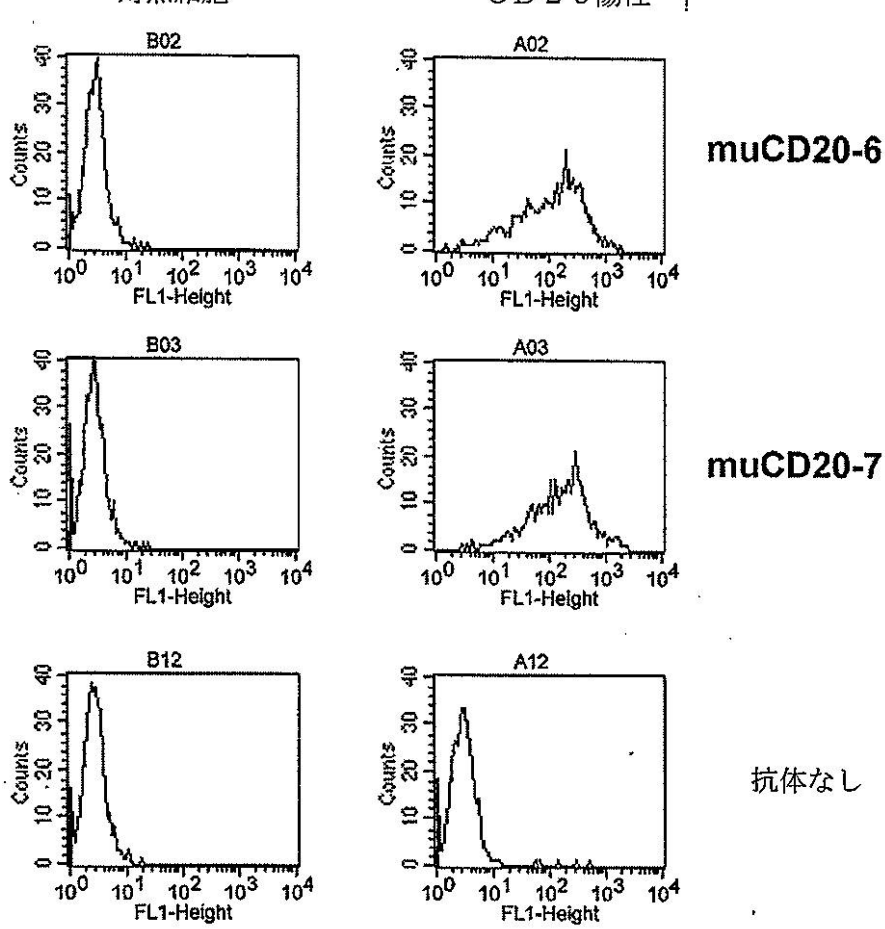
【図３５】


A
生存率（%）
100
75
50
25
0
20
30
40
50
60
70
80
90
接種後日数
PBS
huCD20-7
huCD20-7-SMCC-DM1
huCD20-7-SPP-DM1
B
生存率（%）
100
75
50
25
0
0
10
20
30
40
50
60
接種後日数
PBS
huCD20-7
huCD20-7-SMCC-DM1
huCD20-7-BMPS-DM1
リツキシマブ

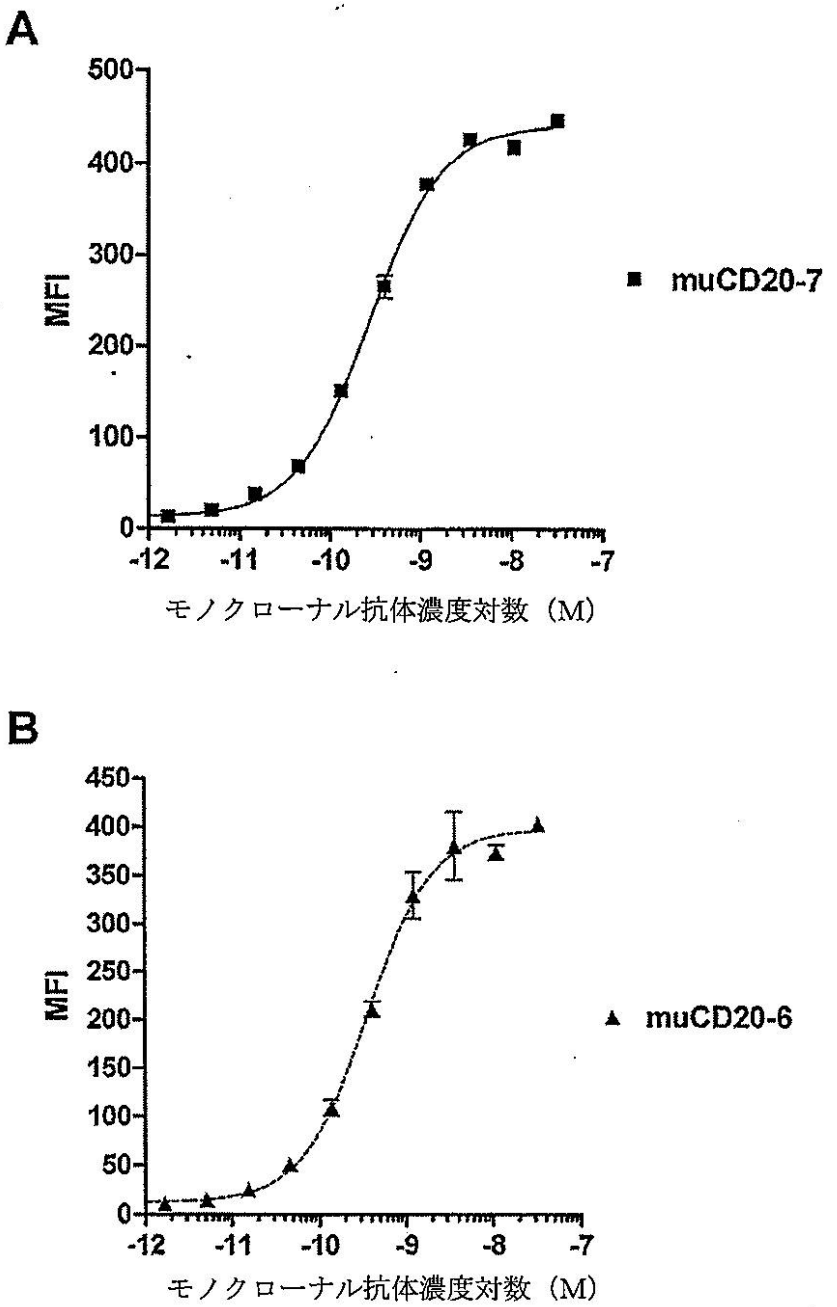
【図３６】


腫瘍体積中央値（mm³）
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
接種後日数
PBS
huCD20-7
huCD20-7-SMCC-DM1
huCD20-7-SPP-DM1

【図１】

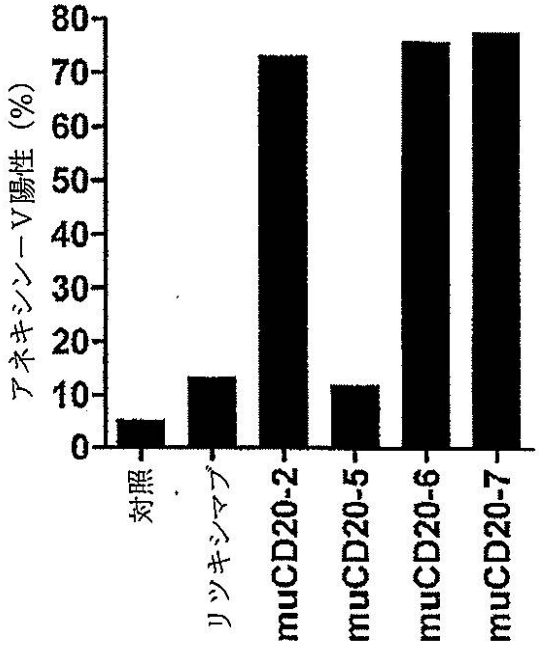

対照細胞
ＣＤ２０陽性
B02
A02
muCD20-6
B03
A03
muCD20-7
B12
A12
抗体なし
Counts
FL1-Height

【図２】

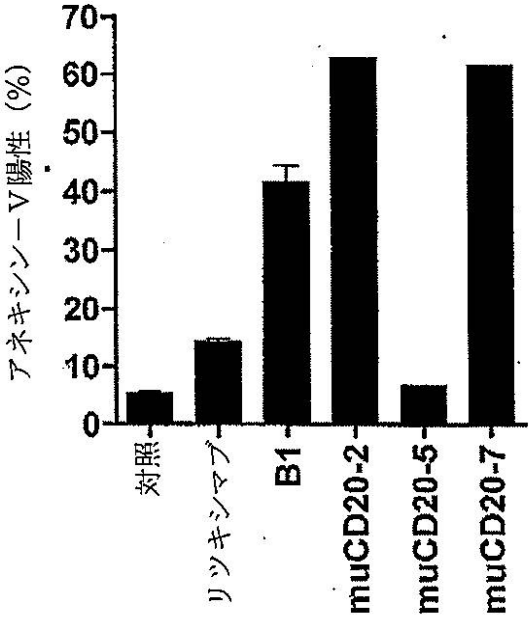

A
500
400
300
200
100
0
MFI
-12
-11
-10
-9
-8
-7
モノクローナル抗体濃度対数（M）
muCD20-7
B
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
MFI
-12
-11
-10
-9
-8
-7
モノクローナル抗体濃度対数（M）
muCD20-6

【図３】

A

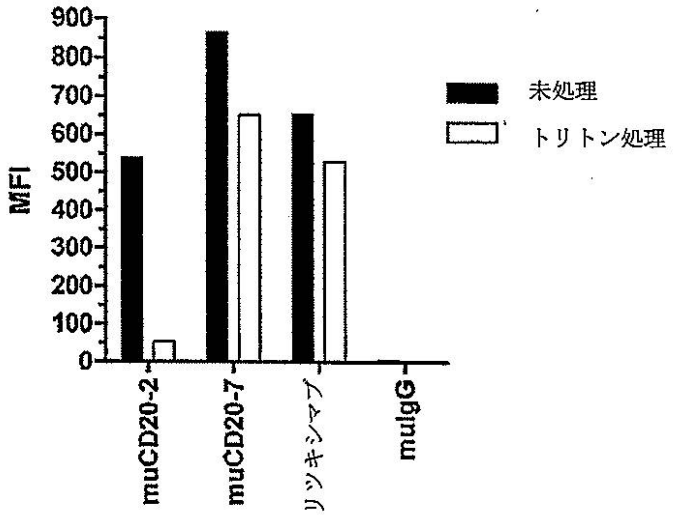

アネキシンーV陽性（%）
80
70
60
50
40
30
20
10
0
対照
リツキシマブ
muCD20-2
muCD20-5
muCD20-6
muCD20-7

B

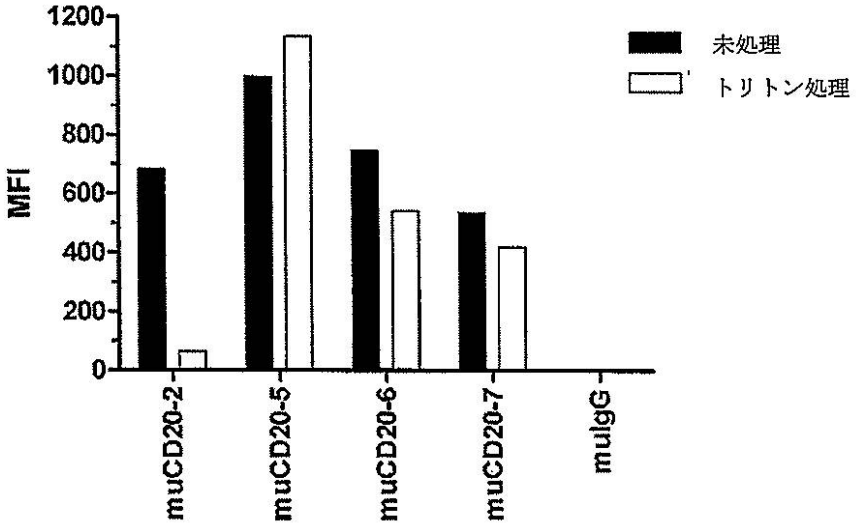

アネキシンーV陽性（%）
70
60
50
40
30
20
10
0
対照
リツキシマブ
B1
muCD20-2
muCD20-5
muCD20-7

【図４】

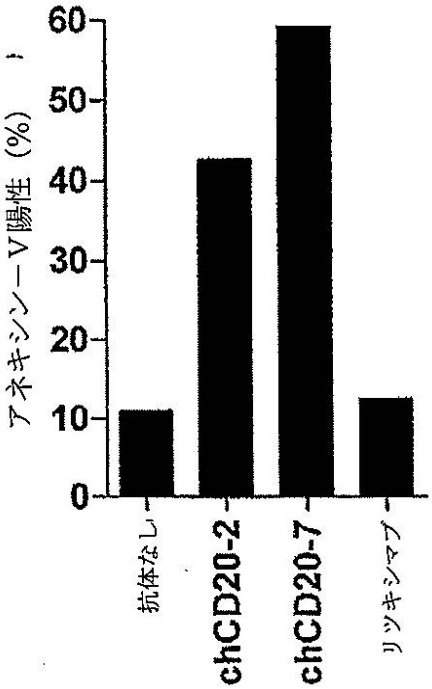
A


900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
MFI
未処理
トリトン処理
muCD20-2
muCD20-7
リツキシマブ
mulgG

B

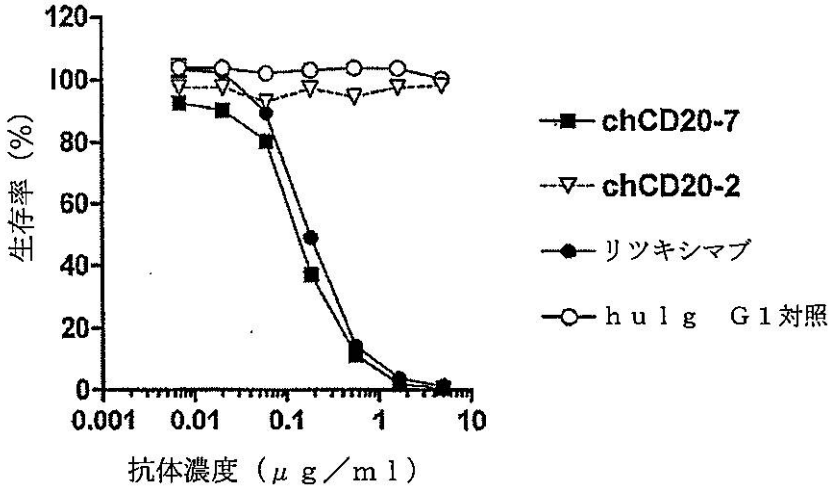

1200
1000
800
600
400
200
0
MFI
未処理
トリトン処理
muCD20-2
muCD20-5
muCD20-6
muCD20-7
mulgG

【図５】

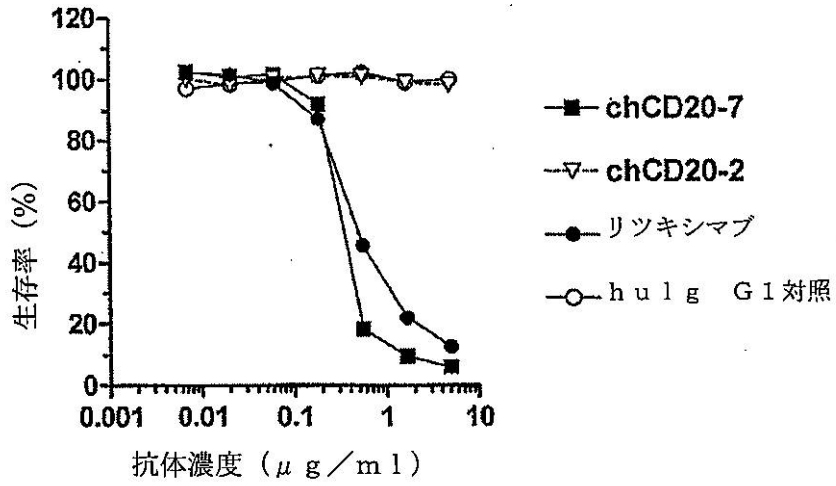


【図６】

A


120
100
80
60
40
20
0
生存率（%）
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度（μｇ／ｍｌ）
chCD20-7
chCD20-2
リツキシマブ
ｈｕｌｇ　Ｇ１対照

B


120
100
80
60
40
20
0
生存率（%）
0.001
0.01
0.1
1
10
抗体濃度（μｇ／ｍｌ）
chCD20-7
chCD20-2
リツキシマブ
ｈｕｌｇ　Ｇ１対照

【図７】

A

CD20-7 V_L		
Ｋａｂａｔ位置	マウス残基	ヒト残基
1	D	D
3	V	V
5	T	T
9	A	A
15	***L***	***P***
17	Q	Q
18	R	R
40	P	P
41	G	G
42	Q	Q
45	K	K
57	G	G
60	A	A
67	S	S
70	D	D
80	A	A
81	***D***	***N***
100	***A***	***Q***
103	K	K
105	E	E
107	***M***	***K***
108	R	R

B

CD20-7 V_H			
Ｋａｂａｔ位置	マウス残基	ヒトｖ１．００残基	ヒトｖ１．０１残基
1	***Q***	***E***	***E***
3	Q	Q	Q
5	V	V	V
9	***P***	***G***	***G***
11	L	L	L
13	K	K	K
14	P	P	P
19	***K***	***R***	***R***
23	***K***	***A***	***A***
28	***S***	***T***	***S***
41	P	P	P
42	G	G	G
43	K	K	K
61	***D***	***A***	***A***
62	***D***	***P***	***P***
64	K	K	K
65	G	G	G
74	S	S	S
82B	***N***	***S***	***S***
83	K	K	K
84	***N***	***T***	***T***
85	E	E	E
105	Q	Q	Q
112	S	S	S

【図８】

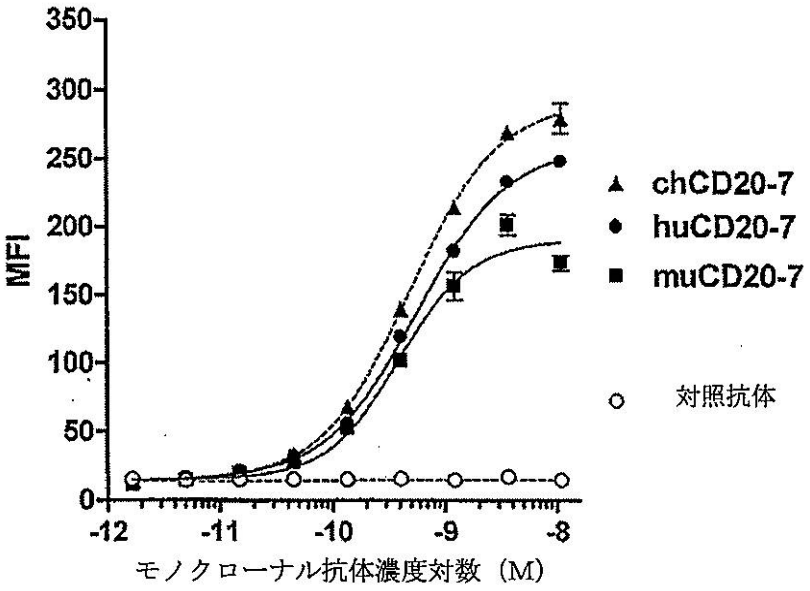
A

```
                1                                                          60
    muCD20-7 LC    (1) DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASGSVDSFGNSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRASNLES
huCD20-7 LCv1.0    (1) ---------------P----------------------------------------

               61                                                         112
    muCD20-7 LC   (61) GVPARFSGGGSRTDFTLTINPVEADDIATYFCQQSYEDPPTFGAGTKLELMR
huCD20-7 LCv1.0   (61) ----------------------N---------------Q------K-
```

B

```
                1                                                          60
    muCD20-7 HC    (1) QLQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYSFTNYGMNWVKQAPGKGLKWMGWINTYTGEPSY
huCD20-7 HCv1.0    (1) E-------G---------R--A----T-----------------------------
huCD20-7 HCv1.1    (1) E-------G---------R---A----S-----------------------------

               61                                                         121
    muCD20-7 HC   (61) ADDFKGRFAFSLETSASTAYLQISNLKNEDTATYFCARGAYYRYDLGMDYWGQGTSVTVSS
huCD20-7 HCv1.0   (61) -AP-------------------S--T-------------------------------
huCD20-7 HCv1.1   (61) -AP-------------------S--T-------------------------------
```

【図９】



【配列表】

2013519375000001.app

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/24312

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC(8) - A61K 39/395, C12P 21/08 (2011.01)
USPC - 424/144.1, 530/388.23
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)
USPC – 424/144.1, 530/388.23

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
USPC – 424/143.1, 424/141.1, 530/388.1

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubWEST(PGPB,USPT,USOC,EPAB,JPAB); Dialog Classic Files (654, 652, 349, 5, 65, 155); USPTO Web Page; PCT Patentscope; Google Scholar: anti-CD20, ADCC, CDC, cytotoxicity, cancer, autoimmune, inflammation, ATCC antibodies, transmembrane epitopes, human antibody, CHO cells, Saccharomyces host, SF-9 host, Lamna transgenic

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X – Y	US 2004/0167319 A1 (TEELING et al.) 26 August 2004 (26.08.2004) para [0008]-[0010], [0016]-[0017], [0025], [0033]-[0036], [0039], [0101], 0104], [0106], [0118], [0129], [0173], [0178], [0180], [0210], [0230], [0265], [0268]-[0269], [0271], [0284], [0325], [0356], [0368], [0411]-[0417], [0472], [0477]	1-3, 5-6, 10, 12-17, 19-35, 73-83, (84-88)/1, 89-93 7-9, 11, 18, 36-45, (84-88)/18
Y	US 2004/0093621 A1 (SHITARA et al.) 13 May 2004 (13.05.2004) para [0006], [0014], [0160]-[0162]	7, 18, 40-45, (84-88)/18
Y	US 2006/0018911 A1 (AULT-RICHE et al.) 26 January 2006 (26.01.2006) para [0281], [0305], [0385], [0390]	8-9
Y	DEANS, et al. Rapid Redistribution of CD20 to a Low Density Detergent-Insoluble Membrane Compartment. Journal of Biologcal Chemistry 1998, 273(1):344-348; pg 344, col 2, para 1; pg 345, col 1, para 5	11
Y	WO 2008/156713 A2 (DAMLE et al.) 24 December 2008 (24.12.2008) para [0031], [0057], [0099], [0158], [0183], [0219, Table 7, Fig 1	36-37, 43
Y	US 2009/0087427 A1 (FRENDEUS et al.) 02 April 2009 (02.04.2009) para [0160], Table 1	38-39, 44-45

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
07 June 2011 (07.06.2011)	06 JUL 2011
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2009)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/24312

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/24312

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.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

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:

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1.

********** SEE CONTINUATION 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.:
1-45, 73-93

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.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US 11/24312

********** Supplemental Box **********

Continuation of Box III

Group I claims 1-45, 73-83, 89-93 are directed to an antibody or fragment thereof that specifically bind to a CD20, wherein said antibody or fragment is capable of inducing apoptosis, antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC), an antibody or fragment thereof produced by the hybridoma (ATCC Accession No. PTA-10486) or hybridoma (ATCC Accession No. PTA-10487), a method for treating a patient having a cancer comprising administering to said patient an effective amount of the antibody or fragment or conjugate thereof that specifically bind to a CD20, wherein said antibody or fragment is capable of inducing apoptosis, antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC), a method for treating a patient having an autoimmune or inflammatory disease comprising administering to said patient an effective amount of the antibody or fragment or conjugate thereof that specifically bind to a CD20, wherein said antibody or fragment is capable of inducing apoptosis, antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC), and a means for specifically binding to a CD20, wherein said means is capable of inducing apoptosis, ADCC and CDC.

Group II+ claims 46-72 are directed to an antibody or fragment thereof wherein said antibody or said fragment binds a CD20. comprising at least one heavy chain and at least one light chain, wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity determining regions having the amino acid sequences of SEQ ID NOS:20-22 or 28-30, and wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having the amino acid sequences of SEQ ID NOS:17-19 or 25-27 and an improved antibody or fragment that specifically bind to a CD20.

Claims 84-88 are generic for antecedent claims 1, 4, 18 and 48 and will be searched with all groups as appropriate.

The groups of inventions listed above do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Group I has the special technical feature of an antibody or fragment thereof that specifically bind to a CD20, wherein said antibody or fragment is capable of inducing apoptosis, antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) and complement dependent cytotoxicity (CDC). However, this does not represent an improvement over the prior art of US 2004/0167319 A1 to Teeling et al. (hereinafter "Teeling") that teaches an antibody that specifically bind to a CD20 (abstract, para [0016]-[0017], [0029]), wherein said antibody is capable of inducing apoptosis (para [0008], [0023], [0033]), antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) (para [0008], [0025], [0033]) and complement dependent cytotoxicity (CDC) (para [0008], [0032], [0033]). Group II+ shares the special technical feature of an antibody that specifically bind to a CD20 with Group I. Likewise, this does not represent an improvement over the prior art as described (abstract, para [0016]-[0017], [0029]). Further as to Group II+, Group II+ has the special technical feature comprising the CDR of an antibody wherein said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions having the amino acid sequences of SEQ ID NOS:20-22 or 28-30 and wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions having the amino acid sequences of SEQ ID NOS:17-19 or 25-27. Likewise, this is not an improvement over the prior art of US 2009/0197330 A1 to Numazaki et al. (hereinafter Numazaki) that specifically teaches said heavy chain comprises three sequential complementarity-determining regions (para [0009]) having the amino acid sequences of SEQ ID NO:21 (SEQ ID NO: 2 at 100% homology) and US 2006/0063228 A1 to Kasalan et al. (hereinafter Kasalan) that specifically teaches wherein said light chain comprises three sequential complementarity-determining regions (para [0017]) comprising SEQ ID NO:18 (SEQ ID NO:20 at 100% homology) as it would have been obvious to one of ordinary skill in the art that the heavy and light CDR entities as described could have been combined as described without undue experimentation as both Numazaki and Kasalan specifically teach variations combinations of CDR regions in order to specifically design the antibodies with the desired characteristics as claimed. The polypeptide sequences designated as SEQ ID NOS:NOS:25-30 and 17-22, then, do not relate to a single general inventive concept because, under PCT Rule 13.2, the different polypeptides are not common to one another but are different because they are composed of unique amino acid sequences.

The first named Group to be searched will be Group I claims Group I claims 1-45, 73-83, 89-93 with generic claims 84-88 (directed to antecedent claims 1, 4, 18). Should (an) additional fee(s) be paid, Applicant is invited to elect the additional specific antibodies to be searched from Group II+ based on the designation of the heavy and light regions to be searched. Applicant must disclose with specificity, which heavy chain(s) and which light chain(s) CDR regions will be searched for each antibody chosen and an appropriate fee paid for each antibody so designated to be searched.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		FI		テーマコード（参考）
A61P 43/00	*(2006.01)*	A61P 35/00		4H045
A61P 35/02	*(2006.01)*	A61P 43/00	121	
A61P 37/06	*(2006.01)*	A61P 35/02		
A61P 29/00	*(2006.01)*	A61P 37/06		
A61P 19/02	*(2006.01)*	A61P 29/00		
A61P 1/00	*(2006.01)*	A61P 29/00	101	
A61P 7/02	*(2006.01)*	A61P 19/02		
A61P 25/00	*(2006.01)*	A61P 1/00		
A61P 17/06	*(2006.01)*	A61P 7/02		
A61P 13/12	*(2006.01)*	A61P 25/00		
A61P 21/04	*(2006.01)*	A61P 17/06		
A61P 9/00	*(2006.01)*	A61P 13/12		
A61P 3/10	*(2006.01)*	A61P 21/04		
A61P 1/04	*(2006.01)*	A61P 9/00		
A61P 5/14	*(2006.01)*	A61P 3/10		
A61P 7/04	*(2006.01)*	A61P 1/04		
A61P 21/00	*(2006.01)*	A61P 5/14		
A61P 17/00	*(2006.01)*	A61P 7/04		
A61P 37/08	*(2006.01)*	A61P 21/00		
A61P 1/16	*(2006.01)*	A61P 17/00		
A61P 11/06	*(2006.01)*	A61P 37/08		
A61P 11/00	*(2006.01)*	A61P 1/16		
A61P 27/02	*(2006.01)*	A61P 11/06		
A61P 9/10	*(2006.01)*	A61P 11/00		
A61P 7/00	*(2006.01)*	A61P 27/02		
A61P 7/06	*(2006.01)*	A61P 9/10	101	
A61P 31/18	*(2006.01)*	A61P 7/00		
A61P 31/22	*(2006.01)*	A61P 7/06		
A61K 51/00	*(2006.01)*	A61P 31/18		
C07K 16/28	*(2006.01)*	A61P 31/22		
C12N 1/15	*(2006.01)*	A61K 43/00		
C12N 1/19	*(2006.01)*	C07K 16/28		
C12N 1/21	*(2006.01)*	C12N 1/15		
C12N 5/10	*(2006.01)*	C12N 1/19		
G01N 33/53	*(2006.01)*	C12N 1/21		
G01N 33/543	*(2006.01)*	C12N 5/00	101	
G01N 33/577	*(2006.01)*	G01N 33/53	D	
G01N 33/574	*(2006.01)*	G01N 33/543	501A	
C12P 21/08	*(2006.01)*	G01N 33/577	B	
		G01N 33/574	Z	
		C12P 21/08		

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,RO,RS,RU,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

(72)発明者　デッカート，ジュッタ
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４２０，レキシントン，イートン・ロード　１６
(72)発明者　ルイ，リンギュン
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２４９３，ウェストン，アローヘッド・ロード　１１
(72)発明者　パーク，ピーター・ユー
アメリカ合衆国マサチューセッツ州０２１４３，サマービル，ウェブスター・アベニュー　２５，ナンバー　３０１

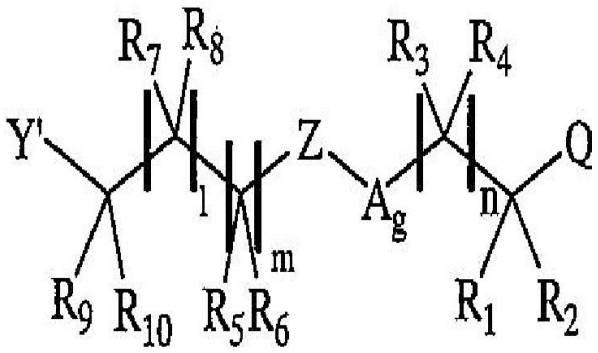
Ｆターム(参考) 4B024 AA01 AA11 BA53 CA04 DA02 EA04 GA03 GA09 HA14
4B064 AG27 CA10 CA20 CC24 CE11 CE12 DA01 DA13
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA92X AB01 AB05 AC14 BA02 BA08
BB12 BB25 BB37 BC03 BC07 BD14 CA25 CA44 CA46
4C084 AA12 AA19 MA02 NA14 ZA021 ZA361 ZA451 ZA511 ZA531 ZA541
ZA551 ZA591 ZA621 ZA661 ZA751 ZA811 ZA891 ZA941 ZA961 ZB081
ZB111 ZB131 ZB151 ZB261 ZB271 ZB331 ZC061 ZC351 ZC751
4C085 AA14 AA16 AA26 BB11 CC23 DD62 EE01 EE03 KA04 KA05
KB82 LL18
4H045 AA11 DA76 EA20 EA50 FA74 GA23 GA26

专利名称(译)	CD20抗体及其用途		
公开(公告)号	JP2013519375A	公开(公告)日	2013-05-30
申请号	JP2012552986	申请日	2011-02-10
[标]申请(专利权)人(译)	伊缪诺金公司		
申请(专利权)人(译)	Imyunojen公司		
[标]发明人	デッカートジュッタ ルイリンギュン パークピーターユー		
发明人	デッカート,ジュッタ ルイ,リンギュン パーク,ピーター·ユー		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61K45/00 A61K49/00 A61P35/00 A61P43/00 A61P35/02 A61P37/06 A61P29/00 A61P19/02 A61P1/00 A61P7/02 A61P25/00 A61P17/06 A61P13/12 A61P21/04 A61P9/00 A61P3/10 A61P1/04 A61P5/14 A61P7/04 A61P21/00 A61P17/00 A61P37/08 A61P1/16 A61P11/06 A61P11/00 A61P27/02 A61P9/10 A61P7/00 A61P7/06 A61P31/18 A61P31/22 A61K51/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/577 G01N33/574 C12P21/08		
CPC分类号	A61K47/6817 A61K47/6819 A61K47/6849 A61K51/1027 A61K2039/505 A61P1/00 A61P1/04 A61P1/16 A61P11/00 A61P11/06 A61P13/12 A61P17/00 A61P17/06 A61P19/02 A61P21/00 A61P21/04 A61P25/00 A61P27/02 A61P29/00 A61K39/39541 C07K16/2887 C07K2317/24 C07K2317/30 C07K2317/73 C07K2317/732 C07K2317/734 C07K2317/92 C12N2501/48 C07K2319/55 G01N33/57426 C07K16/30 C07K2317/21 C07K2317/76		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.T A61K39/395.L A61K45/00 A61K49/00.A A61P35/00 A61P43/00.121 A61P35/02 A61P37/06 A61P29/00 A61P29/00.101 A61P19/02 A61P1/00 A61P7/02 A61P25/00 A61P17/06 A61P13/12 A61P21/04 A61P9/00 A61P3/10 A61P1/04 A61P5/14 A61P7/04 A61P21/00 A61P17/00 A61P37/08 A61P1/16 A61P11/06 A61P11/00 A61P27/02 A61P9/10.101 A61P7/00 A61P7/06 A61P31/18 A61P31/22 A61K43/00 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.101 G01N33/53.D G01N33/543.501.A G01N33/577.B G01N33/574.Z C12P21/08		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/AA11 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA03 4B024/GA09 4B024/HA14 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CE11 4B064/CE12 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA57X 4B065/AA72X 4B065/AA87X 4B065/AA92X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BA08 4B065/BB12 4B065/BB25 4B065/BB37 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA12 4C084/AA19 4C084/MA02 4C084/NA14 4C084/ZA021 4C084/ZA361 4C084/ZA451 4C084/ZA511 4C084/ZA531 4C084/ZA541 4C084/ZA551 4C084/ZA591 4C084/ZA621 4C084/ZA661 4C084/ZA751 4C084/ZA811 4C084/ZA891 4C084/ZA941 4C084/ZA961 4C084/ZB081 4C084/ZB111 4C084/ZB131 4C084/ZB151 4C084/ZB261 4C084/ZB271 4C084/ZB331 4C084/ZC061 4C084/ZC351 4C084/ZC751 4C085/AA14 4C085/AA16 4C085/AA26 4C085/BB11 4C085/CC23 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/EE03 4C085/KA04 4C085/KA05 4C085/KB82 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA23 4H045/GA26		
代理人(译)	小林 泰 星野 修		
优先权	61/406464 2010-10-25 US 61/303249 2010-02-10 US		
其他公开文献	JP2013519375A5		

	JP5841072B2
外部链接	Espacenet

摘要(译)

CD20是B细胞的表面上表达的跨膜蛋白的一个家族四次跨膜蛋白，它是在从外周血和淋巴组织B细胞中发现。 CD20表达从早期前B细胞期持续到浆细胞分化阶段。另一方面，在造血干细胞，pro B细胞，分化浆细胞或非淋巴组织上未见。除了表达在正常B细胞，CD20在非何杰金氏（TM）淋巴瘤（NHL）和B细胞来源的恶性肿瘤乙诸如细胞慢性淋巴细胞白血病（CLL）中表达。已知表达CD20的细胞涉及其他疾病和病症，包括炎症。本发明中，具有优异的物理和功能特性，形式和片段的抗CD20抗体;免疫缀合物，组合物，诊断试剂，抑制生长，治疗，改善的抗体和细胞系的方法;以及编码这种多核苷酸，载体和基因构建体。 点域1

式（ＩＩＩ）：

【化１】