

(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2008-516586

(P2008-516586A)

(43) 公表日 平成20年5月22日(2008.5.22)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 Z N A A	2 G O 4 5
C O 7 K 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28	4 B O 2 4
C O 7 K 16/46 (2006.01)	C O 7 K 16/46	4 B O 6 4
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 B O 6 5
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求		(全 70 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2007-534766 (P2007-534766)
 (86) (22) 出願日 平成17年9月29日 (2005. 9. 29)
 (85) 翻訳文提出日 平成19年5月9日 (2007. 5. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/035055
 (87) 国際公開番号 W02006/039418
 (87) 国際公開日 平成18年4月13日 (2006. 4. 13)
 (31) 優先権主張番号 60/615, 429
 (32) 優先日 平成16年9月30日 (2004. 9. 30)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 507106043
 メダレックス インコーポレーティッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 ミル
 ピタス コットンウッド ドライブ 52
 1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (72) 発明者 ヴァン デ ウィンケル ジャン ジー.
 ジェイ.
 オランダ王国 ゼイスト バーレンジ ス
 ロットラーン 80

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 Fcγ受容体11 (CD32) に対するヒトモノクローナル抗体

(57) 【要約】

本発明は、CD32に高い親和性で結合し、かつリガンドとの結合を阻害する、CD32の表面発現をダウンモジュレートする、またはFc RIIa-H131アロタイプには特異的に結合するがFc RIIa-R131アロタイプには結合しないといった特定の機能特性を有する、単離されたモノクローナル抗体、特にヒト抗体を提供する。本発明の抗体をコードする核酸分子、発現ベクター、宿主細胞、および本発明の抗体を発現させる方法も提供する。免疫コンジュゲート、二重特異性分子、ワクチンコンジュゲート、および本発明の抗体を含む薬学的組成物も提供する。本発明は、CD32の検出法、特にFc RIIa-H131アロタイプの検出法、本発明の抗体を使用する治療法、例えば自己免疫性溶血性貧血の治療法、および本発明の抗体を使用して抗原提示を促進する方法も提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトのFc RII (CD32)に特異的に結合し、かつ以下の特性の少なくとも1つを示す、単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

10

【請求項 2】

以下の特性の全てを示す、請求項1記載の抗体：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；および
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する。

【請求項 3】

Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない、請求項1記載の抗体。

20

【請求項 4】

IgG1アイソタイプの完全長抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項 5】

抗体断片または1本鎖抗体である、請求項1記載の抗体。

【請求項 6】

ヒトのV_H 3-33遺伝子もしくはDP-44遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する重鎖可変領域を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 7】

ヒトのV_K L18遺伝子もしくはL15遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する軽鎖可変領域を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

30

【請求項 8】

以下を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分：

- (a)ヒトのV_H 3-33遺伝子もしくは3-13遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する重鎖可変領域；および
- (b)ヒトのV_K L18遺伝子もしくはL15遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する軽鎖可変領域。

【請求項 9】

ヒトのV_H 3-33遺伝子の重鎖可変領域、およびヒトのV_K L18遺伝子の軽鎖可変領域を含む、請求項8記載の抗体。

40

【請求項 10】

ヒトのV_H DP-44遺伝子の重鎖可変領域、およびヒトのV_K L15遺伝子の軽鎖可変領域を含む、請求項8記載の抗体。

【請求項 11】

(a)重鎖可変領域のCDR3の配列が、SEQ ID NO: 3またはSEQ ID NO: 15のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；

(b)軽鎖可変領域のCDR3の配列が、SEQ ID NO: 6またはSEQ ID NO: 18のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ

50

(c)抗体がヒトCD32に特異的に結合する、
CDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む重鎖可変領域と；CDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む軽鎖可変領域とを含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 1 2】

以下の特性の少なくとも1つを示す、請求項11記載の抗体：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

10

【請求項 1 3】

重鎖可変領域のCDR2の配列が、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 14のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ軽鎖可変領域のCDR2の配列が、SEQ ID NO: 5またはSEQ ID NO: 17のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含む、請求項11記載の抗体。

【請求項 1 4】

重鎖可変領域のCDR1の配列が、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 13のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ軽鎖可変領域のCDR1の配列が、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 16のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含む、請求項13記載の抗体。

【請求項 1 5】

ヒト抗体である、請求項11記載の抗体。

20

【請求項 1 6】

ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項11記載の抗体。

【請求項 1 7】

(a)重鎖可変領域が、SEQ ID NO: 7および19からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%相同なアミノ酸配列を含み；

(b)軽鎖可変領域が、SEQ ID NO: 8および20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%相同なアミノ酸配列を含み；かつ

(c)抗体がヒトCD32に特異的に結合する、
重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分。

30

【請求項 1 8】

以下の特性の少なくとも1つを示す、請求項17記載の抗体：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

【請求項 1 9】

ヒト抗体である、請求項17記載の抗体。

40

【請求項 2 0】

ヒト化抗体またはキメラ抗体である、請求項17記載の抗体。

【請求項 2 1】

以下を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分：

- (a)SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b)SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c)SEQ ID NO: 3またはSEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3；
- (d)SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1；

50

(e)SEQ ID NO: 5またはSEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2 ; および
(f)SEQ ID NO: 6またはSEQ ID NO: 18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

【請求項 2 2】

以下の特性の少なくとも1つを示す、請求項21記載の抗体 :

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない ;
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する ;
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする ;
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する ; または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

10

【請求項 2 3】

以下を含む、請求項21記載の抗体 :

- (a)SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1 ;
- (b)SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2 ;
- (c)SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3 ;
- (d)SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1 ;
- (e)SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2 ; および
- (f)SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

【請求項 2 4】

以下を含む、請求項21記載の抗体 :

- (a)SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1 ;
- (b)SEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2 ;
- (c)SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3 ;
- (d)SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1 ;
- (e)SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2 ; および
- (f)SEQ ID NO: 18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

20

【請求項 2 5】

以下を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分 :

- (a)SEQ ID NO: 7および19からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ;
ならびに
- (b)SEQ ID NO: 8および20からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

30

【請求項 2 6】

以下を含む、請求項25記載の抗体 :

- (a)SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および
- (b)SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

【請求項 2 7】

以下を含む、請求項25記載の抗体 :

- (a)SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および
- (b)SEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

40

【請求項 2 8】

CD32との結合をめぐって請求項26記載の抗体と競合する、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 2 9】

CD32との結合をめぐって請求項27記載の抗体と競合する、単離されたヒト抗体またはその抗原結合部分。

【請求項 3 0】

請求項1~29のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合部分、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項 3 1】

50

第2の薬剤に連結された請求項1～29のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合部分を含む、免疫コンジュゲート。

【請求項32】

請求項31記載の免疫コンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項33】

第2の薬剤が検出可能なマーカーである、請求項31記載の免疫コンジュゲート。

【請求項34】

第2の薬剤が細胞毒性剤である、請求項31記載の免疫コンジュゲート。

【請求項35】

第2の薬剤が放射性同位体である、請求項31記載の免疫コンジュゲート。

10

【請求項36】

該抗体またはその抗原結合部分とは異なる結合特異性を有する第2の機能性部分に連結された請求項1～29のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合部分を含む、二重特異性分子または多重特異性分子。

【請求項37】

第2の機能性部分が抗体または細胞受容体リガンドを含む、請求項36記載の二重特異性分子または多重特異性分子。

【請求項38】

第2の機能性部分が腫瘍細胞または病原体上の標的抗原に対する結合特異性を有する、請求項36記載の二重特異性分子または多重特異性分子。

20

【請求項39】

エフェクター細胞の存在下で、標的抗原を発現する細胞または病原体の抗体依存性細胞障害(ADCC)を誘導する、請求項38記載の二重特異性分子または多重特異性分子。

【請求項40】

補体の存在下で、標的抗原を発現する細胞または病原体の、補体による死滅を誘導する、請求項38記載の二重特異性分子または多重特異性分子。

【請求項41】

標的抗原が以下からなる群より選択される、請求項38記載の二重特異性分子または多重特異性分子：

炭疽抗原、ボツリヌス毒素、マラリア抗原、ウマ脳炎ウイルス抗原、ペスト菌(*Y. pestis*)抗原、ガストリン放出ペプチド受容体抗原(GRP)、ムチン抗原、表皮成長因子受容体(EGF-R)、HER2/neu、HER3、HER4、CD20、CD30、PSMA、癌胎児性抗原(CEA)、Pmel17、 α -ヒト絨毛性ゴナドトロピン(α -HCG)、 α -フェトプロテイン(AFP)、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、MN(gp250)イディオタイプ、MAGE抗原、SART抗原、チロシナーゼ、テロメラゼ、TAG-72抗原、MUC-1抗原、血液型抗原Lea、Leb、LeX、LeY、H-2、B-1、およびB-2、HIV-1 gag、HIV-1 env、HIV-1 nef、HBV core、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、HTLV、FELV、ORF2およびORF3抗原、原虫特異的抗原、カンジダ・アルビカンズ(*Candida albicans*)抗原、細菌抗原、トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)抗原、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)抗原、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)抗原、溶血性連鎖球菌(*Streptococcus hemolyticus*)抗原、および結核菌抗原。

30

40

【請求項42】

請求項36記載の二重特異性分子または多重特異性分子、および薬学的に許容される担体を含む組成物。

【請求項43】

抗原に連結された請求項1～29のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合部分を含むワクチンコンジュゲート。

【請求項44】

抗原が、ウイルス抗原、細菌抗原、寄生虫抗原、アレルゲン、毒液(venom)、自己抗原、移植抗原(transplanted antigen)、および腫瘍関連抗原からなる群より選択される、請求項43記載のワクチンコンジュゲート。

50

【請求項 4 5】

抗原が、ガストリン放出ペプチド受容体抗原(GRP)、ムチン抗原、表皮成長因子受容体(EGF-R)、HER2/neu、HER3、HER4、CD20、CD30、PSMA、癌胎児性抗原(CEA)、Pmel17、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)、 α -フェトプロテイン(AFP)、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、MN(gp250)イディオタイプ、MAGE抗原、SART抗原、チロシナーゼ、テロメラゼ、TAG-72抗原、MUC-1抗原、血液型抗原Lea、Leb、LeX、LeY、H-2、B-1、およびB-2からなる群より選択される腫瘍関連抗原である、請求項43記載のワクチンコンジュゲート。

【請求項 4 6】

請求項43記載のワクチンコンジュゲート、および薬学的に許容される担体を含む組成物。 10

【請求項 4 7】

請求項1~29のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合部分をコードする、単離された核酸分子。

【請求項 4 8】

請求項47記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 4 9】

請求項48記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 5 0】

請求項1~29のいずれか一項記載の抗体を発現する、ヒト免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の導入遺伝子を含むトランスジェニックマウス。 20

【請求項 5 1】

請求項1~29のいずれか一項記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項 5 2】

以下の段階を含む、試料中のFc RIIa-H131の検出法：

- a) Fc RIIa-H131には結合するがFc RIIa-R131には結合しない抗体またはその抗原結合部分を試料に接触させる段階；および
- b) Fc RIIa-H131に結合した抗体またはその抗原結合部分を検出する段階。

【請求項 5 3】

抗体がヒト抗体である、請求項53記載の方法。 30

【請求項 5 4】

抗体が以下を含む、請求項53記載の方法：

- (a) SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および
- (b) SEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

【請求項 5 5】

抗体をフローサイトメトリーで検出する、請求項52記載の方法。

【請求項 5 6】

抗体を免疫組織化学法で検出する、請求項52記載の方法。

【請求項 5 7】

Fc RIIa-R131には結合するがFc RIIa-H131には結合しない抗体またはその抗原結合部分を試料に接触させる段階をさらに含む、請求項52記載の方法。 40

【請求項 5 8】

対象のAIHAが治療されるように、請求項1~29のいずれか一項記載の抗体またはその抗原結合部分を対象に投与する段階を含む、対象の自己免疫性溶血性貧血(AIHA)を治療または予防する方法。

【請求項 5 9】

標的細胞の成長が阻害されるように、有効量の請求項34記載の免疫コンジュゲートを細胞に接触させる段階を含む、CD32を発現する標的細胞の成長を阻害する方法。

【請求項 6 0】

標的細胞の成長が阻害されるように、有効量の請求項38記載の二重特異性分子または多 50

重特異性分子を細胞に接触させる段階を含む、標的抗原を発現する標的細胞の成長を阻害する方法。

【請求項 6 1】

抗原の提示が誘導または促進されるように、請求項43記載のワクチンコンジュゲートを対象に投与する段階を含む、対象の免疫細胞に対する抗原の提示を誘導または促進する方法。

【請求項 6 2】

以下の段階を含む、抗CD32抗体を作製する方法：

(a) 以下を提供する段階：

(i) SEQ ID NO: 1もしくは13のアミノ酸配列を含むCDR1の配列、SEQ ID NO: 2もしくは14のアミノ酸配列を含むCDR2の配列；およびSEQ ID NO: 3もしくは15のアミノ酸配列を含むCDR3の配列を含む、重鎖可変領域の抗体配列；または

(ii) SEQ ID NO: 4もしくは16のアミノ酸配列を含むCDR1の配列；SEQ ID NO: 5もしくは17のアミノ酸配列を含むCDR2の配列；およびSEQ ID NO: 6もしくは18のアミノ酸配列を含むCDR3の配列を含む、軽鎖可変領域の抗体配列；

(b) 少なくとも1つの改変された抗体配列が作られるように、重鎖可変領域の抗体配列および軽鎖可変領域の抗体配列から選択される、少なくとも1つの可変領域の抗体配列内の少なくとも1つのアミノ酸残基を変化させる段階；ならびに

(c) 改変された抗体配列をタンパク質として発現させる段階。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

発明の背景

抗体のFc領域に対する受容体(FcR)は、免疫において協調的な役割を果たす。同受容体は、さまざまなタイプの細胞上で発現されており、エンドサイトーシス、食作用、抗体依存性細胞障害(ADCC)、およびサイトカイン産生から、抗原提示の促進に至る機能に参与する。抗原提示とは、抗原が捕捉され、適切な区画へと導かれ、プロセッシングを受けた後に主要組織適合性複合体(MHC)分子に結合される過程である。Fc R分子は、抗原提示を強力に促進することができる。関与するFc Rのタイプは、抗原提示細胞が提示するエピトープのタイプの極めて重要な決定因子であると報告されている(Amigorena, et al. (1998) J. Exp. Med. 187:505)。

【0002】

IgGに対する白血球のFcR (Fc R)は、受容体の構造、細胞分布、およびIgGとの親和性の差を元に3つのクラス(Fc RI、II、およびIII)に分けられる多重遺伝子ファミリーを含む(Van de Winkel, et al. (1993) Immunol. Today 14:215)。さまざまなサブクラスをコードする8つの遺伝子が同定されている。Fc RII (CD32)は、免疫複合体を形成したIgGのみと相互作用する低親和性の受容体である。これは、リガンド結合鎖中にITAMシグナル伝達モチーフを有する唯一の受容体である。Fc RIIaは、極めて広範囲に分布するFc Rのサブクラスであり、大半の骨髄系細胞、すなわち好中球、好酸球、単球、およびマクロファージ上に、ならびに血小板上に存在する(Deo, et al. (1997) Immunol. Today 18:127 ; King, et al. (1990) Cell Immunol. 128:462 ; Daeron, M. (1997) Annu Rev Immunol. 15:203)。Fc RIIbは、その細胞内テール内にITIM抑制性モチーフを有し、B細胞および食細胞上で発現される(Tridandapani, et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:5082)。

【0003】

Fc RIIaは機能的に多型であり：1つのヌクレオチド多型は、膜に近位のIg様ドメイン中の131位におけるアルギニン(R)残基またはヒスチジン(H)残基のいずれかを生じる。アミノ酸131位はIgG結合部位内に位置し、およびIgG免疫複合体に対する受容体親和性に大きな影響を及ぼす(Maxwell et al. (1999) Nat. Struct. Biol. 6:437-442 ; van der Pol et al. (2003) Immunogenetics 55:240-246)。Fc RIIa-H131は、ヒトのIgG2およびIgG3に対して、Fc RIIa-R131より高い親和性を示す。特にFc RIIa-H131は、IgG2と結合可能

な唯一の白血球Fc Rである。機能的に異なるFc RIIa対立遺伝子が、自己免疫および感染症、ならびに一部の多発神経障害のリスク因子として同定されている(van der Pol and van de Winkel (1998) Immunogenetics 48:222-232 ; van Sorge et al. (2003) Tissue Antigens 61:189-202)。この多型は、治療的抗体による副作用の誘導(Tax et al. (1997) Transplantation 63:106-112)、およびRituxan(登録商標)などの抗体の臨床的有効性(Weng and Levy (2003) J. Clin. Oncol. 21:3940-3947)とも関連づけられている

【0004】

Fc RのIIa-R131およびIIa-H131のアロタイプは当初、T細胞増殖、EAロゼット形成、または細胞毒性試験におけるFc RIIaアロタイプとマウスIgG1抗体またはヒトIgG2抗体の相互作用の差を元に機能的に決定された(van de Winkel et al. (1987) Scand. J. Immunol. 26:663-672 ; Clark et al. (1989) J. Immunol. 143:1731-1734 ; Parren et al. (1991) Res. Immunol. 142:749-763 ; Warmerdam et al. (1991) J. Immunol. 147:1338-1343 ; Wurflein et al. (1998) Cancer Res. 58:3051-3058)。最近になって、PCRによるアロタイプ決定アッセイ法が複数の研究グループによって開発された(Osborne et al. (1994) J. Immunol. Methods 173:207-217 ; Carlsson et al. (1998) Blood 92:1526-1531)。しかしながら、いずれのタイプのアッセイ法についても、一般的な実験環境において常に応用できるわけではない。

【0005】

自己免疫性溶血性貧血(AIHA)では、赤血球の膜抗原に対する抗体が存在し、赤血球(RBC)の生存率の低下に至る。AIHAは、ABO抗原またはマイナーなRBC抗原に対するアロ抗体のために、異種骨髄移植後に高頻度で認められる(Drobyski, W.R. et al. (1996) Bone Marrow Transplant. 17:1093-1099 ; Hashimoto, C. (1998) Clin. Rev. Allergy Immunol. 16:285-295)。このような場合、従来の治療に対する反応は一般に不十分であり、コルチコステロイドによる長期間の免疫抑制療法は、定着およびウイルス感染リスクの上昇に影響する可能性がある。Fc RIもFc RIIも、マウスおよびヒトの自己免疫性の血球減少(cytopenic)疾患に関連づけられている(Clynes, R. et al. (1995) Immunity 3:21-26 ; Kumpel, B.M. et al. (1990) Mol. Immunol. 27:247-256)。Fc RIIaは、ヒトにおける、ヒトIgGでコーティングされた赤血球のような免疫複合体のクリアランスに役割を果たしている(Dijstelbloem, H.M. et al. (2000) Arthritis Rheum. 43:2793-2800)。

【発明の開示】

【0006】

発明の概要

本発明は、CD32と結合して数多くの望ましい特性を示す、単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体を提供する。このような特性は、CD64 (Fc RI)、CD16 (Fc RIII)、またはCD89 (Fc R)ではなくCD32 (Fc RII)との高親和性結合、リガンドとの結合の阻害、およびCD32の表面発現のダウンモジュレーションを含む。さらに本発明の抗体は、動物モデルにおける自己免疫性溶血性貧血を阻害することもできる。さらに本発明のある抗体は、Fc RIIa-H131アロタイプを認識するが、Fc RIIa-R131アロタイプを認識せず、このためCD32の多型の判定に使用可能なことがわかっている。

【0007】

したがって1つの局面では、本発明は、ヒトのFc RII (CD32)に特異的に結合し、および以下の特性の少なくとも1つを示す、単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

【0008】

本発明の好ましい抗体は、以下の特性の全てを示す：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；および
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する。

【0009】

本発明の別の好ましい抗体は、Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない特性を示す。

【0010】

本発明の抗体は例えば、IgG1アイソタイプの完全長抗体の場合がある。または本発明の抗体は、抗体断片または1本鎖抗体である場合がある。本発明の抗体は例えば、完全なヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体であるが、好ましくは完全長のヒト抗体である。

【0011】

より好ましい態様では、本発明の抗体は、ヒトCD32と 5×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、ヒトCD32と 4×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、ヒトCD32と 3×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、ヒトCD32と 2×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、ヒトCD32と 1×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、またはヒトCD32と 9×10^{-9} Mもしくはこれ未満の K_D で結合する。

【0012】

本発明の別の局面は、ヒトの V_H 3-33遺伝子もしくはDP-44遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する重鎖可変領域を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。さらに別の局面は、ヒトの V_K L18遺伝子もしくはL15遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する軽鎖可変領域を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。好ましい態様では、ヒトCD32に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分は、以下を含む：

(a)ヒトの V_H の3-33遺伝子もしくは3-13遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する重鎖可変領域；および

(b)ヒトの V_K のL18遺伝子もしくはL15遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する軽鎖可変領域。

特に好ましい組み合わせは、ヒトの V_H 3-33遺伝子の重鎖可変領域とヒトの V_K L18遺伝子の軽鎖可変領域、またはヒトの V_H DP-44遺伝子の重鎖可変領域とヒトの V_K L15遺伝子の軽鎖可変領域を含む。

【0013】

本発明の別の局面は、CDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む重鎖可変領域と；CDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む軽鎖可変領域とを含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、

(a)重鎖可変領域のCDR3の配列が、SEQ ID NO: 3またはSEQ ID NO: 15のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；

(b)軽鎖可変領域のCDR3の配列が、SEQ ID NO: 6またはSEQ ID NO: 18のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ

(c)抗体がヒトCD32に特異的に結合する、

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。

好ましくは、本発明の抗体は、以下の特性の少なくとも1つを示す：

a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；

b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；

c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；

d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または

10

20

30

40

50

e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。
より好ましくは、重鎖可変領域のCDR2の配列は、SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 14のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ軽鎖可変領域のCDR2の配列は、SEQ ID NO: 5またはSEQ ID NO: 17のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含む。追加的または代替的に、重鎖可変領域のCDR1の配列は、SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 13のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ軽鎖可変領域のCDR1の配列は、SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 16のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含む。

【0014】

本発明の別の局面は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、

- (a)重鎖可変領域が、SEQ ID NO: 7および19からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%相同なアミノ酸配列を含み；
- (b)軽鎖可変領域が、SEQ ID NO: 8および20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%相同なアミノ酸配列を含み；かつ
- (c)抗体がヒトCD32に特異的に結合する、

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。

好ましくは、本発明の抗体は、以下の特性の少なくとも1つを示す：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

【0015】

好ましい局面では、本発明は、以下を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する：

- (a)SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b)SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c)SEQ ID NO: 3またはSEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3；
- (d)SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1；
- (e)SEQ ID NO: 5またはSEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2；および
- (f)SEQ ID NO: 6またはSEQ ID NO: 18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

好ましくは、本発明の抗体は、以下の特性の少なくとも1つを示す：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

本発明の好ましい抗体は、以下を含む抗体である：

- (a)SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b)SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c)SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3；
- (d)SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1；
- (e)SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2；および
- (f)SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

本発明の別の好ましい抗体は、以下を含む抗体である：

- (a)SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；
- (b)SEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2；
- (c)SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3；

(d)SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1；

(e)SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2；および

(f)SEQ ID NO: 18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

別の局面では、本発明は、以下を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する：

(a)SEQ ID NO: 7および19からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；ならびに

(b)SEQ ID NO: 8および20からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。
本発明の好ましい抗体は、以下を含む：

(a)SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および

(b)SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

本発明の別の好ましい抗体は、以下を含む：

(a)SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および

(b)SEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

【0016】

本発明の別の局面は、CD32との結合をめぐる、本明細書に開示された本発明の特異的な抗体と競合する抗体に関する。

【0017】

本発明は、検出可能なマーカーや細胞毒性剤などの第2の薬剤に連結された本発明の抗体またはその抗原結合部分を含む免疫コンジュゲートも提供する。本発明は、第2の抗体や細胞受容体リガンドなどの、本発明の抗体またはその抗原結合部分とは異なる抗原結合特異性を有する第2の機能的部分と連結された、本発明の抗体またはその抗原結合部分を含む、二重特異性分子または多重特異性分子も提供する。請求項36記載の二重特異性分子または多重特異性分子、および薬学的に許容される担体。本発明は、抗原に連結された本発明の抗体またはその抗原結合部分を含むワクチンコンジュゲートも提供する。

【0018】

本発明の抗体、抗体断片、免疫コンジュゲート、二重特異性分子もしくは多重特異性分子、またはワクチンコンジュゲートを、薬学的に許容される担体とともに含む薬学的組成物も本発明に含まれる。

【0019】

別の局面では、本発明は、本発明の抗体またはその抗原結合部分をコードする単離された核酸分子、ならびにこの核酸を含む発現ベクター、およびこの発現ベクターを含む宿主細胞に関する。本発明の抗体を発現する、ヒトの免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の導入遺伝子を含むトランスジェニックマウスも、このような抗体を産生するハイブリドーマと同様に提供される。

【0020】

本発明は、以下の段階を含む、試料中のFc RIIa-H131を検出する方法も提供する：

a)Fc RIIa-H131には結合するがFc RIIa-R131には結合しない抗体またはその抗原結合部分を試料に接触させる段階；および

b)Fc RIIa-H131と結合した抗体またはその抗原結合部分を検出する段階。

好ましい態様では、このような抗体は、以下を含む抗体などのヒト抗体である：

(a)SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および

(b)SEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

抗体とFc RIIa-H131の結合は、例えばフローサイトメトリーまたは免疫組織化学法で検出することができる。別の態様では、検出法は、Fc RIIa-R131には結合するがFc RIIa-H131には結合しない抗体またはその抗原結合部分を試料に接触させる段階も含む。

【0021】

別の局面では、本発明は、対象がAIHAに関して治療されるように、本発明の抗体またはその抗原結合部分を対象に投与する段階を含む、対象の自己免疫性溶血性貧血(AIHA)を治療または予防する方法を提供する。本発明は、標的細胞の成長が阻害されるように、有効

10

20

30

40

50

量の本発明の免疫コンジュゲートを細胞に接触させる段階を含む、CD32を発現する標的細胞の成長を阻害する方法も提供する。本発明は、標的細胞の成長が阻害されるように、有効量の本発明の二重特異性分子または多重特異性分子を細胞に接触させる段階を含む、標的抗原を発現する標的細胞の成長を阻害する方法も提供する。さらに本発明は、抗原の提示が誘導または促進されるように、本発明のワクチンコンジュゲートを対象に投与する段階を含む、対象における免疫細胞に対する抗原の提示を誘導または促進する方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

本発明は、以下の段階を含む、抗CD32抗体を作製する方法にも関する：

(a) 以下を提供する段階：

(i) SEQ ID NO: 1もしくは13のアミノ酸配列を含むCDR1の配列；SEQ ID NO: 2もしくは14のアミノ酸配列を含むCDR2の配列；およびSEQ ID NO: 3もしくは15のアミノ酸配列を含むCDR3の配列を含む、重鎖可変領域の抗体配列；または

(ii) SEQ ID NO: 4もしくは16のアミノ酸配列を含むCDR1の配列；SEQ ID NO: 5もしくは17のアミノ酸配列を含むCDR2の配列；およびSEQ ID NO: 6もしくは18のアミノ酸配列を含むCDR3の配列を含む、軽鎖可変領域の抗体配列；

(b) 少なくとも1つの改変された抗体配列が作られるように、重鎖可変領域の抗体配列および軽鎖可変領域の抗体配列から選択される、少なくとも1つの可変領域の抗体配列中の少なくとも1つのアミノ酸残基を変化させる段階；ならびに

(c) 改変された抗体配列をタンパク質として発現させる段階。

【 0 0 2 3 】

本発明の他の特性および利点は、制限する意図のない以下の詳細な説明および実施例から明らかになる。本出願で引用された全ての参考文献、Genbank登録、特許、および公開特許出願の内容は、参照により本明細書に明確に組み入れられる。

【 0 0 2 4 】

発明の詳細な説明

本発明は、CD32に結合して数多くの望ましい特性を示す、単離されたモノクローナル抗体、特にヒトモノクローナル抗体を提供する。このような特性は、CD32 (Fc RII)との結合(CD64 (Fc RI)にも、CD16 (Fc RIII)にも、CD89 (Fc R)にも結合しない)、リガンドとの結合の阻害、およびCD32の表面発現のダウンモジュレーションを含む。さらに本発明の抗体は、動物モデルにおける自己免疫性溶血性貧血を阻害可能である。さらに本発明のある抗体は、Fc RIIa-H131アロタイプを認識するが、Fc RIIa-R131アロタイプを認識せず、このためCD32の多型の決定に使用可能なことがわかっている。

【 0 0 2 5 】

本発明を容易に理解可能とするために、一部の用語を以下に定義する。他の定義は、「詳細な説明」で説明する。

【 0 0 2 6 】

本明細書で用いる「CD32」、ならびに「Fc 受容体II」および「Fc RII」という用語は互換的に使用され、IgG複合体に対する低親和性受容体であり、Bリンパ球、好酸球、単球、顆粒球、および血小板を含む、さまざまな細胞のタイプで発現される40 kDaの糖タンパク質を意味する。「Fc RIIa-H131」および「Fc RIIa-R131」という用語は、Clark et al. (1989) J. Immunol. 143:1731-1734, Warmerdam et al. (1990) J. Exp. Med. 172: 19-25 and Warmerdam et al. (1991) J. Immunol. 147:1338-1343に詳しく記載されているように、アミノ酸131位にヒスチジンまたはアルギニンそれぞれを有し、マウスIgG1とヒトIgG2の複合体に対する結合能力が異なる2つのアロタイプを意味する。

【 0 0 2 7 】

本明細書で用いる「Fc RIIb1^{*}」という用語は、Warmerdam et al. (1993) Int. Immunol. 3:239-247に詳しく説明されているように、細胞質テールの11位におけるアミノ酸の差を生じる、Fc RIIb1と比較して1か所のヌクレオチドの差を含む、Fc RIIb1のイソ型のバリエーションを意味する。

10

20

30

40

50

【0028】

「Fc R1」および「CD64」という用語は互換的に使用され、単球、マクロファージ、および樹状細胞などの抗原提示細胞上で構成的に発現される、IgGに対する高親和性受容体を意味する。

【0029】

「Fc RIII」および「CD16」という用語は互換的に使用され、NK細胞上、ならびにマクロファージ上(CD16a)、および好中球上(CD16b)で発現される低親和性のIgG受容体Fc RIIIa (CD16a)およびFc RIIIb(CD16b)を含む。

【0030】

「Fc R」および「CD89」という用語は互換的に使用され、IgAに対する受容体を意味する。

10

【0031】

本明細書で用いる「抗体」という用語は、抗体全体、および任意の抗原結合断片(すなわち「抗原結合部分」)、またはこの1本鎖を含む。「抗体」は、ジスルフィド結合、またはこの抗原結合部分で相互に結合された、少なくとも2本の重(H)鎖および2本の軽(L)鎖を含む糖タンパク質を意味する。個々の重鎖は、重鎖可変領域(本明細書ではVHと略す)および重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、CH1、CH2、およびCH3の3つのドメインを含む。個々の軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書ではVLと略す)および軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、CLの1つのドメインを含む。VH領域およびVL領域はさらに、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる高度に保存された領域に散らばる相補性決定領域(CDR)と呼ばれる高頻度可変性の領域に分けられる。個々のVHおよびVLは、アミノ末端からカルボキシ末端へ、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順に並べられた3つのCDRと4つのFRを含む。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。抗体の定常領域は、免疫系のさまざまな細胞(例えばエフェクター細胞)、および古典的補体系の第1の成分(C1q)を含む宿主の組織または因子と免疫グロブリンの結合に關与する場合がある。

20

【0032】

本明細書で用いる、抗体の「抗原結合部分」(または単に「抗体部分」という用語は、抗原(例えばCD32)に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数の断片を意味する。抗体の抗原結合機能が、完全長抗体の断片によって作動可能なことが知られている。抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれる結合断片の例は、(i)VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、およびCH1ドメインからなる一価の断片であるFab断片；(ii)ヒンジ領域においてジスルフィド架橋で連結された2つのFab断片を含む二価の断片であるF(ab')₂断片；(iii)VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片；(iv)抗体の1本のアームのVLドメインおよびVHドメインからなるFv断片；(v)VHドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-546)；ならびに(vi)単離された相補性決定領域(CDR)を含む。さらに、Fv断片の2つのドメインVLおよびVHは別個の遺伝子にコードされているが、これらはVL領域およびVH領域が対をなして一価の分子(1本鎖Fv (scFv)として知られる；例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426；およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照)を形成する1つのタンパク質鎖としての作製を可能とする合成リンカーによって、組換え法で連結され得る。このような1本鎖抗体も、抗体の「抗原結合部分」という用語に含まれることが意図される。このような抗体断片は、当業者に既知の従来手法で得られ、および断片は、完全な抗体の場合と同じ手順で、有用性に関してスクリーニングされる。

30

40

【0033】

本明細書で用いる「単離された抗体」は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を意味することが意図される(例えば、CD32に特異的に結合する単離された抗体は、CD32以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない)。しかしながら、ヒトCD32のエピトープ、イソ型、またはバリエーションに特異的に結合する単離された抗体は、例えば他の種に由来する他の関連抗原(例えばCD32分子種の相同体)に対する交差反応性を有する場合がある。さらに、単離された抗体は、他の細胞材料および/または化合物

50

を実質的に含まない場合がある。本発明の1つの態様では、異なる特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組み合わせが、内容が十分明らかな組成物中で混合される。

【0034】

本明細書で用いる「モノクローナル抗体」または「モノクローナル抗体組成物」という用語は、1つの分子組成物の抗体分子の調製物を意味する。モノクローナル抗体組成物は、特定のエピトープに対する1つの結合特異性および親和性を示す。

【0035】

本明細書で用いる「ヒト抗体」という用語は、フレームワーク領域とCDR領域の両方が、ヒトの生殖系列の免疫グロブリンの配列に由来する可変領域を有する抗体を含むことが意図される。さらに、仮に抗体が定常領域を含む場合は、定常領域も、ヒトの生殖系列の免疫グロブリンの配列に由来する。本発明のヒト抗体は、ヒトの生殖系列の免疫グロブリンの配列にコードされていないアミノ酸残基(例えば、インビトロにおけるランダム突然変異誘発もしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボにおける体細胞突然変異によって導入された突然変異)を含む場合がある。しかしながら、本明細書で用いる「ヒト抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトのフレームワーク配列にグラフトされた抗体を含むことは意図されない。

10

【0036】

「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、フレームワーク領域とCDR領域の両方がヒトの生殖系列の免疫グロブリンの配列に由来する可変領域を有する、1つの結合特異性を示す抗体を意味する。1つの態様では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞と融合された、ヒトの重鎖の導入遺伝子および軽鎖の導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られたB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

20

【0037】

本明細書で用いる「組換えヒト抗体」という用語は、(a)ヒトの免疫グロブリン遺伝子に関してトランスジェニック動物または染色体導入(transchromosomal)動物(例えばマウス)から単離される抗体、またはこれが由来するハイブリドーマ(以下に詳述)、(b)ヒト抗体を発現するように形質転換された宿主細胞、例えば形質移入細胞(transfectoma)から単離される抗体、(c)組換え型のコンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離される抗体、および(d)ヒト免疫グロブリンの遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを含む任意の他の手段で調製されるか、発現されるか、作製されるか、もしくは単離される抗体などの、組換え手段によって調製されるか、発現されるか、作製されるか、または単離される全てのヒト抗体を含む。このような組換え型のヒト抗体は、フレームワーク領域およびCDR領域がヒトの生殖系列の免疫グロブリンの配列に由来する可変領域を有する。しかしながら、ある態様では、このような組換え型のヒト抗体を対象に、インビトロ突然変異誘発(または、ヒトIg配列に関してトランスジェニックである動物を使用する場合は、インビボにおける体細胞突然変異誘発)を行うことで、組換え抗体の V_H 領域および V_L 領域のアミノ酸配列は、ヒトの生殖系列の V_H および V_L の配列に由来し、および関連する一方で、インビボにおけるヒト抗体の生殖系列レパートリー内には天然で存在しない可能性のある配列としてもよい。

30

40

【0038】

「ヒト抗体誘導體」という用語は、ヒト抗体の任意の修飾型の、例えば抗体と別の薬剤または抗体のコンジュゲートを意味する。

【0039】

「ヒト化抗体」という用語は、マウスなどの別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトのフレームワーク配列にグラフトされた抗体を意味することが意図される。他のフレームワーク領域の修飾を、ヒト由来のフレームワーク配列内に作製することができる。

【0040】

50

「キメラ抗体」という用語は、可変領域の配列がマウス抗体に由来し、定常領域の配列がヒト抗体に由来する抗体などの、可変領域の配列が1つの種に由来し、定常領域の配列が別の種に由来する抗体を意味することが意図される。

【0041】

「エピトープ」という用語は、抗体に対する特異的な結合を、または抗体による特異的な結合を可能とするタンパク質決定基を意味する。エピトープは通常、アミノ酸や糖の側鎖などの化学的に活性のある表面分子群からなり、通常は、特異的な3次元構造の特性、ならびに特異的な荷電性を有する。立体構造を有するエピトープと、立体構造を有さないエピトープは、前者のエピトープとの結合が変性溶媒の存在下で失われるのに対し、後者のエピトープとの結合は失われないということによって区別される。

10

【0042】

「二重特異性分子」という用語は、2つの異なる結合特異性を有する、任意の薬剤、例えばタンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチドの複合体を含むことが意図される。例えば、このような分子は、(a)細胞表面抗原、および(b)エフェクター細胞の表面上のFc受容体、例えばCD32と結合可能であるか、または相互作用可能である。「多重特異性分子」または「異種特異的分子」は、2つ以上の異なる結合特異性を有する任意の薬剤、例えばタンパク質、ペプチド、またはタンパク質もしくはペプチドの複合体を含むことが意図される。例えば、このような分子は、(a)細胞表面抗原、(b)エフェクター細胞の表面上のFc受容体、および(c)少なくとも1つの他の成分と結合可能であるか、または相互作用可能である。したがって本発明は、CD32などの細胞表面抗原に対する、およびエフェクター細胞上のFc受容体などの他の標的に対する二重特異性、三重特異性、四重特異性、および他の多重特異性の分子を含むが、これらに限らない。

20

【0043】

「二重特異性抗体」という用語は、ダイアボディ(diabody)も含む。ダイアボディは、VHドメインおよびVLドメインが1つのポリペプチド鎖上に発現されるが、同じ鎖上のこの2つのドメイン間の対形成が不能となるほど短いリンカーを使用することで、ドメインが強制的に別の鎖の相補的ドメインと対を形成することになり、2か所の抗原結合部位が生じる二価の二重特異性抗体である(例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 ; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123を参照)。

30

【0044】

本明細書で用いる「異種抗体」という用語は、2つもしくはこれ以上の抗体、抗体結合断片(例えばFab)、この誘導體、または少なくとも2つが異なる特異性を有する、連結された抗原結合領域を意味する。このような異なる特異性は、エフェクター細胞上のFc受容体に対する結合特異性、および標的細胞、例えば腫瘍細胞上の抗原またはエピトープに対する結合特異性を含む。

【0045】

本明細書で用いる「異種抗体」は、このような抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物に関連して定義される。この用語は、トランスジェニック非ヒト動物を含まない生物体に見出される抗体、および一般にトランスジェニック非ヒト動物以外の種に由来する抗体に対応するアミノ酸配列、またはこれをコードする核酸配列を有する抗体を意味する。

40

【0046】

本明細書で用いる「特異的な結合」とは、所定の抗原に抗体が結合することを意味する。典型的には、抗体は 10^{-7} Mまたはこれ未満の解離定数(K_D)で結合し、かつ所定の抗原との結合は、所定の抗原または近縁の抗原以外の非特異的な抗原(例えば、BSA、カゼイン)との結合に対する K_D より少なくとも2分の1の小さい K_D である。「抗原を認識する抗体」、および「抗原に特異的な抗体」という句は本明細書で、「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と互換的に使用される。

【0047】

50

本明細書で用いる、IgG抗体に関して「高親和性」という用語は、 10^{-8} Mまたはこれ未満の K_D 、より好ましくは 10^{-9} Mまたはこれ未満の K_D 、およびさらにより好ましくは 10^{-10} Mまたはこれ未満の K_D を有する抗体を意味する。しかしながら、「高親和性」結合は、他の抗体のアイソタイプに対しては変動する場合がある。例えば、あるIgMアイソタイプに対する「高親和性」結合は 10^{-7} Mまたはこれ未満の K_D 、より好ましくは 10^{-8} Mまたはこれ未満の K_D を有する抗体を意味する。

【0048】

本明細書で用いる「 K_{assoc} 」または「 K_a 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の結合率を意味することが意図され、一方で本明細書で用いる「 K_{dis} 」または「 K_d 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離速度を意味することが意図される。本明細書で用いる「 K_D 」という用語は、 K_a に対する K_d の比(すなわち K_d/K_a)から得られる解離定数を意味することが意図され、モル濃度(M)で表される。

10

【0049】

本明細書で用いる「アイソタイプ」は、重鎖定常領域の遺伝子にコードされる抗体のクラス(例えばIgMまたはIgG1)を意味する。

【0050】

本明細書で用いる「エフェクター細胞」という用語は、免疫応答の認識相および活性化相に対して、免疫応答のエフェクター相に關与する免疫細胞を意味する。例示的な免疫細胞は、骨髄起源またはリンパ系起源の細胞、例えばリンパ球(例えばB細胞、および細胞障害性T細胞(CTL)を含むT細胞)、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、単球、好酸球、好中球、多核白血球、顆粒球、マスト細胞、および好塩基球を含む。一部のエフェクター細胞は、特定のFc受容体を発現し、特異的な免疫機能を発揮する。好ましい態様では、エフェクター細胞は、抗体依存性細胞障害(ADCC)、例えばADCCを誘導可能な好中球を誘導することができる。例えば、FcRを発現する単球、マクロファージは、標的細胞の特異的な死滅、および免疫系の他の成分への抗原の提示、または抗原提示細胞との結合に關与する。他の態様では、エフェクター細胞は、標的抗原、標的細胞、または微生物を食作用で捕らえることが可能である。

20

【0051】

「標的細胞」とは、除去されると、対象(例えばヒトまたは動物)に有益に作用する、および本発明の組成物(例えば、ヒトモノクローナル抗体、二重特異性分子、または多重特異性分子)の標的とすることが可能な任意の細胞または病原体を意味する。例えば標的細胞は、CD32を発現する細胞、またはCD32を過剰に発現する細胞の場合がある。または標的細胞は、乳房、卵巣、前立腺、精巣、肺、結腸、直腸、膵臓、肝臓、中枢神経系、腎臓、頭部、頸部、骨、血液、およびリンパ系の癌から選択される細胞などの腫瘍細胞の場合がある。加えて標的細胞は、自己抗体産生リンパ球(自己免疫疾患治療用)、およびIgE産生リンパ球(アレルギー治療用)を含む。標的細胞はさらに微生物(例えば細菌またはウイルス)を含む。さらに他の適切な標的は、リウマチ因子や他の自己抗体、およびトキシンなどの可溶性抗原を含む。微生物は、病原体、ウイルス、細菌、真菌、および原虫を含む。

30

【0052】

「抗原」という用語は、タンパク質、ペプチド、またはハプテンなどの任意の天然または合成の免疫原性物質を意味する。「抗原」という用語は、複合体を形成していない状態では免疫原性がなく、複合体が形成されると免疫原性が現われる物質も含む。「複合体を形成していない」という用語は、本発明の分子複合体を形成するように連結されていない物質を含む。「複合体を形成した」という用語は、本発明の分子複合体を形成するように連結された物質を含む。

40

【0053】

本明細書で用いる、(例えば細胞に関して)「成長を阻害する」という用語は、細胞の成長の任意の測定可能な低下、例えば細胞の成長の少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、または100%の阻害を含むことが意図される。

【0054】

50

本明細書で用いる、(例えば、CD32に対するCD32リガンド、例えばIgGの結合の阻害/ブロッキングに関して)「結合を阻害する」、および「結合をブロックする」という用語は互換的に使用され、部分的な阻害/ブロッキングと完全な阻害/ブロッキングの両方を含む。CD32に対するIgGの阻害/ブロッキングは好ましくは、IgGがCD32と結合時に、阻害またはブロッキングなしに生じるエフェクター細胞の機能の正常なレベルまたはタイプを低下させるか、または変化させる。阻害およびブロッキングは、抗CD32抗体との接触時に、抗CD32抗体と接触していないリガンドと比較した時の、CD32に対するIgGの結合親和性の任意の測定可能な低下、例えばCD32に対するCD32リガンドの少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、99%、または100%のブロッキングを含むことも意図される。

10

【0055】

本明細書で用いる「核酸分子」という用語は、DNA分子およびRNA分子を含むことが意図される。核酸分子は1本鎖または2本鎖の場合があるが、好ましくは2本鎖のDNAである。本明細書で用いる、CD32に結合する抗体または抗体部分(例えばVH、VL、CDR3)をコードする核酸に関して使用される「単離された核酸分子」という用語は、抗体または抗体部分をコードするヌクレオチド配列が、CD32以外の抗原と結合する抗体または抗体部分をコードする他のヌクレオチド配列を含まない核酸分子を意味することが意図される(天然の状態では、他の配列はヒトゲノムDNA中の核酸に隣接している可能性がある)。

【0056】

本明細書で用いる「ベクター」という用語は、連結された別の核酸を輸送可能な核酸分子を意味することが意図される。1つのタイプのベクターは、追加のDNAセグメントを連結可能な環状の2本鎖DNAのループを意味する「プラスミド」である。別のタイプのベクターは、追加のDNAセグメントをウイルスゲノムに連結させることが可能なウイルスベクターである。あるベクターは、導入される宿主細胞における自律的な複製が可能である(例えば、細菌の複製起点を有する細菌ベクター、およびエピソーム型の哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソーム型の哺乳類ベクター)は、宿主細胞へ導入されることで宿主のゲノムとともに複製されることで宿主細胞のゲノムへ組み込まれ得る。さらに、あるベクターは、動作可能に連結された遺伝子の発現を誘導することが可能である。このようなベクターは本明細書で、「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」と呼ばれる。一般に、組換えDNA手法に有用な発現ベクターは、プラスミドの形状をしていることが多い。本明細書では、「プラスミド」と「ベクター」は互換的に使用可能であるが、プラスミドが最も広く使用される形状のベクターである。しかしながら本発明は、同等の機能を発揮するウイルスベクター(例えば、複製欠損型のレトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ関連ウイルス)などの他の形状の発現ベクターを含むことが意図される。

20

30

【0057】

本明細書で用いる「組換え宿主細胞」(または単に「宿主細胞」という用語は、組換え発現ベクターが導入された細胞を意味することが意図される。この用語は、特定の対象細胞だけでなく、その子孫の細胞をも意味することが意図されると理解すべきである。ある修飾は、突然変異または環境的な影響のいずれかのために、世代を超えて受け継がれることが可能なので、このような子孫は実際には、親細胞と同一ではない可能性があるが、それでも本明細書で用いる「宿主細胞」という用語の範囲に含まれる。組換え宿主細胞は例えば、CHO細胞、形質移入細胞、およびリンパ系細胞を含む。

40

【0058】

本明細書で用いる「対象」という用語は、任意のヒトまたは非ヒト動物を含む。「非ヒト動物」という用語は、全ての脊椎動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類などの哺乳類および非哺乳類を含む。

【0059】

「トランスジェニックの非ヒト動物」という用語は、1種類または複数のヒトの重鎖および/または軽鎖の導入遺伝子、または導入染色体(transchromosome)(動物の天然のゲノ

50

△DNAに組込まれた状態、または組込まれていない状態のいずれか)を含み、完全長のヒト抗体を発現可能なゲノムを有する非ヒト動物を意味する。例えばトランスジェニックマウスは、CD32抗原および/またはCD32発現細胞でマウスが免疫された時にヒト抗CD32抗体を産生するような、ヒトの軽鎖の導入遺伝子、およびヒトの重鎖の導入遺伝子またはヒトの重鎖の導入染色体のいずれかを有する場合がある。ヒトの重鎖の導入遺伝子は、W002/43478に記載されているように、トランスジェニックマウス、例えばHuMAbマウスの場合のように、マウスの染色体DNAに組込まれる場合があるほか、染色体導入(transchromosomal)(例えばKM)マウスの場合のように、ヒトの重鎖の導入遺伝子が染色体外に維持される場合がある。このようなトランスジェニックマウスおよび染色体導入マウスは、V-D-J組換えおよびアイソタイプスイッチを受けることで、CD32に対するヒトモノクローナル抗体の複数のアイソタイプ(例えばIgG、IgA、および/またはIgE)を産生可能である。

【0060】

本発明のさまざまな局面を、以下のサブセクションで詳しく説明する。

【0061】

抗CD32抗体

本発明の抗体は、抗体の特定の機能に関する特性または性質を特徴とする。例には、実施例に詳しく記載された特性および性質などがある。例えば、本発明の抗体はヒトのFc RII (CD32)に特異的に結合する。好ましくは、本発明の抗体はFc RII (CD32)に高親和性で、例えば 10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で、または 10^{-9} Mもしくはこれ未満の K_D で、またはさらには 10^{-10} Mもしくはこれ未満の K_D で結合する。したがって1つの局面では、本発明は、ヒトのFc RII (CD32)に特異的に結合し、および以下の特性の少なくとも1つを示す、単離されたヒトモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

本発明の抗体は、上記の特性の少なくとも1つを示す場合があり、および複数の特性を示す場合がある(ただし抗体は、上記のa)とe)の特性両方は示さない)。

【0062】

好ましい態様では、本発明の抗体は、以下の特性の全てを示す：

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；および
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する。

【0063】

別の好ましい態様では、本発明の抗体は、Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない特性を示す。

【0064】

より好ましくは、本発明の抗体は、ヒトCD32に 5×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、ヒトCD32に 4×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、ヒトCD32に 3×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、ヒトCD32に 2×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、ヒトCD32に 1×10^{-8} Mもしくはこれ未満の K_D で結合するか、またはヒトCD32に 9×10^{-9} Mもしくはこれ未満の K_D で結合する。

【0065】

本発明の抗体は、完全長の抗体、またはその結合能力を保持する抗体断片の場合があり、および抗体は任意のアイソタイプの場合がある。好ましい態様では、本発明の抗体は、IgG1アイソタイプの完全長抗体である。別の好ましい態様では、本発明の抗体は、抗体断

片(例えばFab断片)または1本鎖抗体(例えばscFv)である。

【0066】

例えばELISAやフローサイトメトリーを含む、CD32に対する抗体の結合能力を評価する標準的なアッセイ法は当技術分野で周知である。適切なアッセイ法については実施例で詳述する。抗体の結合動態(例えば結合親和性)も、Biacore解析などの当技術分野で周知の標準的なアッセイ法で評価することができる。上記の特性を評価する他のアッセイ法については実施例で詳述するが、Fc RIIaの表面発現のダウンモジュレーションを評価するフローサイトメトリーによる解析、Fc RIIaとリガンド間の結合の阻害を評価するEAロゼット形成アッセイ法、および抗体によるAIHAの阻害または予防を評価する自己免疫性溶血性貧血(AIHA)のヒトFc RIIaトランスジェニックマウスモデルの使用を含む。

10

【0067】

モノクローナル抗体MDE-8およびMDE-9

本発明の好ましい抗体は、実施例1および実施例2に示された手順で単離されて構造特性が決定されたヒトモノクローナル抗体MDE-8およびMDE-9を含む。MDE-8およびMDE-9のV_Hのアミノ酸配列はそれぞれ、SEQ ID NO: 7および19に示されている。MDE-8およびMDE-9のV_Lのアミノ酸配列はそれぞれ、SEQ ID NO: 8および20に示されている。

【0068】

これらの抗体のそれぞれがCD32に結合可能であることを考えれば、V_HおよびV_Lの配列を「混合してマッチさせる」ことで、本発明の他の抗CD32結合分子を作製することができる。このような「混合されてマッチされた」抗体とCD32の結合は、上述の、および実施例に記載された結合アッセイ法(例えばELISA)で検討することができる。好ましくは、V_H鎖およびV_L鎖が混合されてマッチされると、特定のV_H/V_L対に由来するV_Hの配列は、構造的に類似のV_Hの配列と交換される。同様に、好ましくは、特定のV_H/V_L対に由来するV_Lの配列は構造的に類似のV_Lの配列と交換される。

20

【0069】

したがって1つの局面では、本発明は、以下を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する：

(a)SEQ ID NO: 7および19からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；
ならびに

(b)SEQ ID NO: 8および20からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

30

好ましい重鎖および軽鎖の組み合わせは、以下を含む：

(a)SEQ ID NO: 7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；と(b)SEQ ID NO: 8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域；または

(a)SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；と(b)SEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

【0070】

別の局面では、本発明は、MDE-8またはMDE-9の重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3、またはこれらの組み合わせを含む抗体を提供する。MDE-8のV_HのCDR1、2、および3領域のアミノ酸配列はそれぞれ、SEQ ID NO: 1、2、および3に示されている。MDE-8のV_LのCDR1、2、および3領域のアミノ酸配列はそれぞれ、SEQ ID NO: 4、5、および6に示されている。MDE-9のV_HのCDR1、2、および3領域のアミノ酸配列はそれぞれ、SEQ ID NO: 13、14、および15に示されている。MDE-9のV_LのCDR1、2、および3領域のアミノ酸配列はそれぞれ、SEQ ID NO: 16、17、および18に示されている。CDR領域は、Kabatシステムを使用して説明される(Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242)。

40

【0071】

したがって別の局面では、本発明は、以下を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する：

(a)SEQ ID NO: 1またはSEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1；

50

- (b)SEQ ID NO: 2またはSEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2 ;
- (c)SEQ ID NO: 3またはSEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3 ;
- (d)SEQ ID NO: 4またはSEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1 ;
- (e)SEQ ID NO: 5またはSEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2 ; および
- (f)SEQ ID NO: 6またはSEQ ID NO: 18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

好ましい態様では、このような抗体は、以下の特性の少なくとも1つを示す :

- a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない ;
- b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する ;
- c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする ;
- d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する ; または
- e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

本発明の好ましい抗体は、以下を含む :

- (a)SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1 ;
- (b)SEQ ID NO: 2のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2 ;
- (c)SEQ ID NO: 3のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3 ;
- (d)SEQ ID NO: 4のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1 ;
- (e)SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2 ; および
- (f)SEQ ID NO: 6のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

本発明の別の好ましい抗体は、以下を含む :

- (a)SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR1 ;
- (b)SEQ ID NO: 14のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR2 ;
- (c)SEQ ID NO: 15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域のCDR3 ;
- (d)SEQ ID NO: 16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR1 ;
- (e)SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR2 ; および
- (f)SEQ ID NO: 18のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域のCDR3。

【 0 0 7 2 】

特定の生殖系列配列を有する抗体

ある態様では、本発明の抗体は、特定の生殖系列の重鎖の免疫グロブリン遺伝子に由来する重鎖可変領域、および/または特定の生殖系列の軽鎖の免疫グロブリン遺伝子に由来する軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 7 3 】

例えば、好ましい態様では、本発明は、ヒトのV_H 3-33遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する重鎖可変領域を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい態様では、本発明は、ヒトのV_H DP-44遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する重鎖可変領域を含み、CD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい態様では、本発明は、ヒトのV_H L18遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する軽鎖可変領域を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。別の好ましい態様では、本発明は、ヒトのV_H L15遺伝子の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する軽鎖可変領域を含み、ヒトCD32に特異的に結合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【 0 0 7 4 】

さらに別の好ましい態様では、本発明は、抗体が

- (a)ヒトのV_H 3-33遺伝子またはDP-44遺伝子(それぞれSEQ ID NO: 11および23に記載されたアミノ酸配列をコードする)の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する重鎖可変領域を含み ;
- (b)ヒトのV_K L18遺伝子またはL15遺伝子(それぞれSEQ ID NO: 12および24に記載されたアミノ酸配列をコードする)の産物であるかまたはこの遺伝子に由来する軽鎖可変領域を含

み；かつ

(c)ヒトCD32に特異的に結合する、

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

【0075】

それぞれV_H 3-33およびV_K L18のV_HおよびV_Kを有する抗体の1例がMDE-8抗体である。それぞれV_H DP-44およびV_K L15のV_HおよびV_Kを有する抗体の1例がMDE-9抗体である。

【0076】

本明細書で用いるヒト抗体は、抗体の可変領域が、ヒトの生殖系列の免疫グロブリン遺伝子を使用する系から得られる場合は、特定の生殖系列の配列「の産物」であるか、または特定の生殖系列の配列「に由来する」、特定の生殖系列の配列である重鎖または軽鎖の可変領域を含む。このような系は、ヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスを対象抗原で免疫化する段階、またはファージ上に提示されたヒト免疫グロブリン遺伝子ライブラリーを対象抗原でスクリーニングする段階を含む。ヒトの生殖系列の免疫グロブリンの配列「の産物」または「に由来する」ヒト抗体は、ヒト抗体のアミノ酸配列を、ヒトの生殖系列の免疫グロブリンのアミノ酸配列と(例えばVbaseデータベースを使用して)比較すること、および配列がヒト抗体の配列と最も近い(すなわち同一性が最も高い)ヒトの生殖系列の免疫グロブリンの配列を選択することなどの手順で同定可能である。ヒトの生殖系列の免疫グロブリン配列「の産物である」か、または「に由来する」ヒト抗体は、例えば天然の体細胞突然変異または部位特異的突然変異の意図的な導入のために、生殖系列配列と比較してアミノ酸の差を含む場合がある。しかしながら、選択されたヒト抗体は典型的には、アミノ酸配列が、ヒトの生殖系列の免疫グロブリン遺伝子にコードされたアミノ酸配列と少なくとも90%同一であり、および他の種の生殖系列の免疫グロブリンのアミノ酸配列(例えばマウスの生殖系列の配列)と比較時に、対象となるヒト抗体がヒト由来であることが確認されるアミノ酸残基を含む。場合によっては、ヒト抗体はアミノ酸配列が、少なくとも95%、またはさらには少なくとも96%、97%、98%、または99%が、生殖系列の免疫グロブリン遺伝子にコードされたアミノ酸配列と同一である場合がある。典型的には、特定のヒト生殖系列の配列に由来するヒト抗体は、ヒトの生殖系列の免疫グロブリン遺伝子にコードされたアミノ酸配列との間で、最大10アミノ酸の差を示す。場合によっては、ヒト抗体は、最大5アミノ酸、またはさらには最大4アミノ酸、3アミノ酸、2アミノ酸、または1アミノ酸が、生殖系列の免疫グロブリン遺伝子にコードされたアミノ酸配列とは異なる可能性がある。

【0077】

相同な抗体

さらに別の態様では、本発明の抗体は、本明細書に記載された好ましい抗体のアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を含む重鎖および軽鎖の可変領域を含む(このような抗体は、本発明の抗CD32抗体の望ましい機能特性を保持する)。

【0078】

例えば本発明は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、

(a)重鎖可変領域が、SEQ ED NO: 7および19からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%相同なアミノ酸配列を含み；

(b)軽鎖可変領域が、SEQ ID NO: 8および20からなる群より選択されるアミノ酸配列と少なくとも80%相同なアミノ酸配列を含み；かつ

(c)抗体がヒトCD32に特異的に結合する、

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

1つの態様では、このような抗体は、以下の1つまたは複数の特性を示す場合がある：

a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；

b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；

c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；

10

20

30

40

50

d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または

e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1*にも結合しない。

【0079】

さまざまな態様では、抗体は例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体の場合がある。好ましくは抗体は、ヒトCD32に 9×10^{-9} Mまたはこれ未満の K_D で結合する。

【0080】

他の態様では、 V_H および/または V_L のアミノ酸配列は、上記配列と85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%が相同である場合がある。上記配列の V_H 領域および V_L 領域に対して、高い(すなわち80%またはこれ以上の)相同性を有する V_H 領域および V_L 領域を有する抗体は、SEQ ID NO: 7、8、9、または10をコードする核酸分子の突然変異誘発(例えば、部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発)と、これに続く、コードされた改変抗体を対象とした、本明細書に記載された機能アッセイ法による、機能(すなわち上記の(c)および(d)に記載された機能)の保持に関する検討によって得られる場合がある。

10

【0081】

本明細書で用いる、2つのアミノ酸配列間におけるパーセント相同性は、2つの配列間におけるパーセント同一性と同等である。2つの配列間のパーセント同一性は、2つの配列の最適アラインメントを達成するために導入する必要のあるギャップの数、および個々のギャップの長さを考慮して、配列が共有する同一の位置の数の関数である(すなわち、%相同性=同一の位置の数/位置の総数 \times 100)。2つの配列間の配列の比較、およびパーセント同一性は、以下の非制限的な実施例に記載された数学的アルゴリズムを使用することで決定

20

【0082】

2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用する、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に統合された、E. MeyersおよびW. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988))のアルゴリズムを使用して決定することができる。加えて、2つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかを使用し、16、14、12、10、8、6、または4のギャップ重み、および1、2、3、4、5、または6の長さ重みを使用する、GCGソフトウェアパッケージ(<http://www.gcg.com>で利用可能)のGAPプログラムに統合された、NeedlemanおよびWunsch (J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970))のアルゴリズムを使用して決定することができる。

30

【0083】

追加的または代替的に、本発明のタンパク質の配列はさらに、公共データベースを対象とした検索を実行して、例えば関連配列を同定するための「クエリー配列」として使用することができる。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のXBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して実施することができる。BLASTによるタンパク質検索は、本発明の抗体分子に相同なアミノ酸配列を得るXBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を使用して実施することができる。比較目的で、ギャップのあるアラインメントを得る場合は、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載されたGapped BLASTを利用することができる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合は、個々のプログラム(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。これについては、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>を参照されたい。

40

【0084】

保存的な修飾を有する抗体

ある態様では、本発明の抗体は、CDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む重鎖可変領域、ならびにCDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む軽鎖可変領域を含む(これらのCDR配列の1つまたは複数は、本明細書に記載された好ましい抗体(例えばMDE-8またはMDE-9)を元に特定のアミノ酸配列、またはこの保存的な修飾を含み、ならびに抗体は、本発明の抗CD32抗体の望ましい機能特性を保持する)。したがって本発明は、CDR1、CDR2、およびCDR3の配

50

列を含む重鎖可変領域と、CDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む軽鎖可変領域とを含む単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分であって、

(a)重鎖可変領域のCDR3の配列が、SEQ ID NO: 3または15のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；

(b)軽鎖可変領域のCDR3の配列が、SEQ ID NO: 6または18のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ

(c)抗体がヒトCD32に特異的に結合する、

単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する。

1つの態様では、このような抗体は、以下の1つまたは複数の特性を示す場合がある：

a)Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；

b)Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；

c)Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；

d)自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または

e)Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

【0085】

好ましくは抗体は、ヒトCD32と 9×10^{-9} Mまたはこれ未満の K_D で結合する。好ましい態様では、重鎖可変領域のCDR2の配列はSEQ ID NO: 2または14のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ軽鎖可変領域のCDR2の配列はSEQ ID NO: 5または17のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含む。別の好ましい態様では、重鎖可変領域のCDR1の配列はSEQ ID NO: 1または13のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含み；かつ軽鎖可変領域のCDR1の配列はSEQ ID NO: 4または16のアミノ酸配列、およびその保存的な修飾を含む。

【0086】

さまざまな態様で、抗体は例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体の場合がある。

【0087】

本明細書で用いる「保存的な配列の修飾」という用語は、対象アミノ酸配列を含む抗体の結合特性に大きく影響しないか、またはこれを変化させないアミノ酸の修飾を意味することが意図される。このような保存的な修飾は、アミノ酸の置換、付加、および欠失を含む。修飾は本発明の抗体に、部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発などの、当技術分野で周知の標準的な手法で導入することができる。保存的なアミノ酸置換は、アミノ酸残基が、類似の側鎖を有するアミノ酸残基と交換される置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定義されている。このようなファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸(例えばリシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖を有するアミノ酸(例えばアスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電性の極性側鎖を有するアミノ酸(例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖を有するアミノ酸(例えばアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分枝側鎖を有するアミノ酸(例えばスレオニン、バリン、イソロイシン)、および芳香族側鎖を有するアミノ酸(例えばチロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を含む。したがって、本発明の抗体のCDR領域内の1つまたは複数のアミノ酸残基を、同じ側鎖ファミリーの他のアミノ酸残基と交換することが可能であり、および改変された抗体を、機能の保持(上記の(i)~(iv)に記載された機能の保持)に関して、本明細書に記載された機能アッセイ法で検討することができる。

【0088】

本発明の抗CD32抗体と同じエピトープに結合する抗体

別の態様では、本発明は、本明細書に記載されたMDE-8抗体(それぞれSEQ ID NO: 7および8に示されたVHおよびVLの配列を有する)、またはMDE-9抗体(それぞれSEQ ID NO: 19および20に示されたVHおよびVLの配列を有する)と同じエピトープに結合する他のヒト抗体

10

20

30

40

50

などの、本明細書に記載された本発明のさまざまな抗CD32抗体と同じエピトープに結合する抗体を提供する。このような追加的な抗体は、MDE-8やMDE-9などの本発明の他の抗体との、それらの交差競合能力(例えば、結合を統計的に有意に競合的に阻害する能力)を元に、標準的なCD32結合アッセイ法で同定することができる。試験抗体、ヒトCD32と例えばMDE-8またはMDE-9の結合を阻害する能力は、試験抗体が、ヒトCD32との結合をめぐって対象抗体と競合することを示しており；このような抗体は、非制限的な理論によれば、競合する抗体と同様に、ヒトCD32上の同じエピトープか、または関連する(例えば構造的に類似しているか、または空間的に近位にある)エピトープと結合する可能性がある。好ましい態様では、MDE-8またはMDE-9と同様にヒトCD32上の同じエピトープに結合する抗体はヒトモノクローナル抗体である。このようなヒトモノクローナル抗体は、実施例に記載された手順で作製および単離することができる。

10

【0089】

操作および修飾された抗体

本発明の抗体はさらに、修飾型の抗体を作製するために本明細書に出発材料であると記載された V_H および/または V_L の配列の1つまたは複数を有する抗体を使用して作製することができる(修飾された抗体は、当初の抗体とは異なる特性を有する可能性がある)。抗体は、一方または両方の可変領域(すなわち V_H および/または V_L)内の、例えば1つもしくは複数のCDR領域内における、および/または1つもしくは複数のフレームワーク領域内における1つまたは複数の残基を修飾することで作製できる。追加的または代替的に、抗体は、定常領域内の残基を、例えば抗体のエフェクター機能を変化させるように修飾することで作製

20

【0090】

実施可能な1つのタイプの可変領域の作製法がCDRグラフト(grafting)である。抗体はもっぱら、6つの重鎖および軽鎖の相補性決定領域(CDR)内に位置するアミノ酸残基を介して標的抗原と相互作用する。このため、CDR内のアミノ酸配列は、個々の抗体間における多様性の方が、CDRの外部の配列間との多様性より大きい。CDR配列は、大半の抗体-抗原相互作用に参与するので、特定の天然の抗体の特性が似た組換え抗体を、異なる特性を有する異なる抗体からフレームワーク配列にグラフトされた特定の天然の抗体に由来するCDR配列を含む発現ベクターを構築することで発現させることが可能である(例えば、Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327; Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525; Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033; Winterによる米国特許第5,225,539号、およびQueen et al.による米国特許第5,530,101号;第5,585,089号;第5,693,762号、および第6,180,370号を参照)。

30

【0091】

したがって、本発明の別の態様は、それぞれSEQ ID NO: 1、2、および3の、またはそれぞれSEQ ID NO: 13、14、および15のCDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む重鎖可変領域、ならびにそれぞれSEQ ID NO: 4、5、および6の、またはそれぞれSEQ ID NO: 16、17、および18のアミノ酸配列を含むCDR1、CDR2、およびCDR3の配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。したがって、このような抗体は、モノクローナル抗体MDE-8またはMDE-9の V_H および V_L のCDR配列を含み、さらにこれらの抗体とは異なるフレームワーク配列を含む可能性がある。

40

【0092】

このようなフレームワーク配列は、生殖系列の抗体の遺伝子配列を含む公共DNAデータベース、または公刊された参考文献から得られる。例えば、ヒトの重鎖および軽鎖の可変領域の遺伝子に関する生殖系列のDNA配列は、「VBase」ヒト生殖系列配列データベース(インターネットサイトwww.mrc-cpe.cam.ac.uk/vbaseで利用可)に登録されており、ならびに個々の内容が参照により本明細書に明確に組み入れられる、Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I. M., et al. (1992) 「The Repertoire of Human Germline V_H Sequences Reveals about Fift

50

y Groups of V_H Segments with Different Hypervariable Loops」 J. Mol. Biol. 227:776-798 ; およびCox, J. P. L. et al. (1994) 「A Directory of Human Germ-line V_H Segments Reveals a Strong Bias in their Usage」 Eur. J. Immunol. 24:827-836に記載されている。

【0093】

本発明の抗体に使用される好ましいフレームワーク配列は、本発明の選択された抗体に使用されるフレームワーク配列に構造的に似た、例えば V_H 3-33配列またはDP-44配列 (SEQ ID NO: 11または23) に似た配列、および/または本発明の好ましいモノクローナル抗体に使用される V_k L18またはL15のフレームワーク配列 (SEQ ID NO: 12または24) である。 V_H のCDR1、2、および3の配列、ならびに V_k のCDR1、2、および3の配列を、フレームワーク配列が由来する生殖系列の免疫グロブリン遺伝子に見出される配列と同一の配列を有するフレームワーク領域にグラフトすることができるほか、CDR配列を、生殖系列の配列と比較して1つまたは複数の突然変異を含むフレームワーク領域にグラフトすることができる。例えば、場合によっては、抗体の抗原結合能力を維持または促進するために、フレームワーク領域内の残基を突然変異させることが有益であると報告されている(例えば、Queen et al.による米国特許第5,530,101号 ; 第5,585,089号 ; 第5,693,762号、および第6,180,370号を参照)。

10

【0094】

可変領域の別のタイプの修飾は、 V_H および/または V_k のCDR1領域、CDR2領域および/またはCDR3領域内のアミノ酸残基を突然変異させることで、対象抗体の1つまたは複数の結合特性(例えば親和性)を改善することである。部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発を実施して突然変異を導入することが可能であり、抗体結合、または関心の持たれる他の機能特性に対する効果を、本明細書に記載された手順で、および実施例に記載された手順でインビトロまたはインビボのアッセイ法で評価することができる。好ましくは、(上記のような)保存的な修飾が導入される。突然変異は、アミノ酸の置換、付加、または欠失の場合があるが、好ましくは置換である。さらに典型的には、CDR領域内の最大1つ、2つ、3つ、4つ、または5つの残基が変えられる。

20

【0095】

したがって別の態様では、本発明は、以下を含む重鎖可変領域を含む、単離された抗CD32モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を提供する : (a)それぞれSEQ ID NO: 1、2、および3、もしくはそれぞれSEQ ID NO: 13、14、および15のアミノ酸配列、またはSEQ ID NO: 1、2、および3、もしくはSEQ ID NO: 13、14、および15と比較して1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのアミノ酸の置換、欠失、もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む、 V_H のCDR1領域、CDR2領域、およびCDR3領域 ; (b)それぞれSEQ ID NO: 4、5、および6、もしくはそれぞれSEQ ID NO: 16、17、および18のアミノ酸、またはSEQ ID NO: 4、5、および6、もしくはSEQ ID NO: 16、17、および18と比較して1つ、2つ、3つ、4つ、もしくは5つのアミノ酸の置換、欠失、もしくは付加を有するアミノ酸配列を含む、 V_k のCDR1領域、CDR2領域、およびCDR3領域。

30

【0096】

本発明の改変された抗体は、例えば抗体の特性を改善するために、 V_H 内および/または V_k 内のフレームワーク残基に修飾が加えられた抗体を含む。典型的には、このようなフレームワークの修飾は、抗体の免疫原性を低下させるために加えられる。例えば1つの方法は、フレームワークの1つまたは複数の残基を、対応する生殖系列の配列に対して「復帰突然変異させる(backmutate)」ことである。具体的には、体細胞突然変異を受けた抗体は、抗体が由来する生殖系列の配列とは異なるフレームワーク残基を含む場合がある。このような残基は、抗体のフレームワーク配列を、抗体が由来する生殖系列の配列と比較することで同定できる。例えばMDE-8の場合、 V_H の3位のアミノ酸残基(FR1内)はヒスチジンであるが、 V_H 3-33の生殖系列配列内の対応する残基はグルタミンである。別の例としてMDE-9の場合、 V_H の28位のアミノ酸残基(FR1内)はアラニンであるが、 V_H DP-44生殖系列配列内の対応する残基はスレオニンである。フレームワーク領域の配列を、その生殖系列にお

40

50

けるコンフィギュレーションに戻すためには、体細胞突然変異を、例えば部位特異的突然変異誘発またはPCRによる突然変異誘発によって生殖系列の配列に「復帰突然変異させる」ことができる(例えば、MDE-8のV_HのFR1の残基3位をヒスチジンからグルタミンに「復帰突然変異させる」ことが可能なほか、MDE-9のV_HのFR1の残基28位をアラニンからスレオニンに「復帰突然変異させる」ことが可能である)。このような「復帰突然変異した」抗体も本発明に含まれることが意図される。

【0097】

フレームワークの別のタイプの修飾は、フレームワーク領域内で、またはさらには1つまたは複数のCDR領域内で、1つまたは複数の残基を突然変異させることを含み、T細胞エピトープを除去し、それにより抗体の潜在的な免疫原性を低下させる。この方法は、「脱免疫化(deimmunization)」とも呼ばれ、および、Carr et al.による米国特許出願第20030153043号で詳しく説明されている。

10

【0098】

フレームワーク領域またはCDR領域内に導入された修飾に対して追加的または代替的に、本発明の抗体を、Fc領域内に修飾を含めるように、典型的には血清半減期、補体結合、Fc受容体との結合、および/または抗原依存性細胞毒性などの、抗体の1つまたは複数の機能特性を変化させるように作製することができる。さらに本発明の抗体は、化学的に修飾することができる(例えば、1つまたは複数の官能基を抗体に結合させることができる)ほか、そのグリコシル化を修飾することでも、抗体の1つまたは複数の機能特性を変化させることができる。これらの態様のそれぞれについて以下に詳しく説明する。Fc領域内の残基のナンバリングは、KabatによるEU指標(EU index)に従う。

20

【0099】

1つの態様では、CH1のヒンジ領域が、ヒンジ領域内のシステイン残基の数が変わるように、例えば増えるか、または減るように修飾される。この方法は、Bodmer et al.による米国特許第5,677,425号で詳しく説明されている。CH1のヒンジ領域内のシステイン残基数は例えば、軽鎖と重鎖のアセンブリを促すために、または抗体の安定性を高めたり低めたりするために変化させる。

【0100】

別の態様では、抗体の生物学的半減期を短くするために、抗体のFcヒンジ領域が突然変異される。具体的には、1つまたは複数のアミノ酸の突然変異が、抗体が、天然のFc-ヒンジドメインとスタフィロコッカスのプロテインA (SpA)との結合が損なわれるように、Fc-ヒンジ断片のCH2~CH3ドメイン境界領域に導入される。この方法は、Ward et al.による米国特許第6,165,745号に詳しく記載されている。

30

【0101】

別の態様では、抗体は、その生物学的半減期が長くなるように修飾される。さまざまな方法が可能である。例えば、Wardによる米国特許第6,277,375号に記載されているように、T252L、T254S、T256Fの1つまたは複数の突然変異を導入することができる。または、生物学的半減期を長くするために、抗体をCH1領域またはCL領域内において、Presta et al.による米国特許第5,869,046号および第6,121,022号に記載されているように、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループに由来するサルベージ受容体結合エピトープを含むように変化させることができる。

40

【0102】

さらに他の態様では、抗体のエフェクター機能を変化させるために、Fc領域を、少なくとも1つのアミノ酸残基を異なるアミノ酸残基と交換することで変化させる。例えば、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320、および322から選択される1つまたは複数のアミノ酸を、エフェクターリガンドに対する抗体の親和性が変化するが親抗体の抗原結合能力は保持されるように、異なるアミノ酸残基と置換することができる。親和性が変化するエフェクターリガンドは例えば、Fc受容体、または補体のC1成分の場合がある。この方法は、Winter et al.による米国特許第5,624,821号および第5,648,260号で詳しく説明されている。

50

【0103】

別の例では、抗体のC1q結合が変化するように、および/または補体依存性細胞毒性(CDC)が低減するか消失するように、アミノ酸残基329、331、および322から選択される1つまたは複数のアミノ酸を、異なるアミノ酸残基と交換することができる。この方法は、Idusogie et al.による米国特許第6,194,551号で詳しく説明されている。

【0104】

別の例では、231~239位のアミノ酸の1つまたは複数のアミノ酸残基を変化させることで、抗体の補体結合能力が変化される。この方法は、Bodmer et al.によるPCT公報W094/29351で詳しく説明されている。

【0105】

さらに別の例では、238位、239位、248位、249位、252位、254位、255位、256位、258位、265位、267位、268位、269位、270位、272位、276位、278位、280位、283位、285位、286位、289位、290位、292位、293位、294位、295位、296位、298位、301位、303位、305位、307位、309位、312位、315位、320位、322位、324位、326位、327位、329位、330位、331位、333位、334位、335位、337位、338位、340位、360位、373位、376位、378位、382位、388位、389位、398位、414位、416位、419位、430位、434位、435位、437位、438位、または439位における1つまたは複数のアミノ酸を修飾することで、抗体の抗体依存性細胞障害作用(ADCC)媒介能力を高めるために、および/または、Fc受容体に対する抗体の親和性を高めるためにFc領域が修飾される。この方法は、PrestaによるPCT公報W000/42072で詳しく説明されている。さらに、ヒトのIgG1上における、FcRI、FcRII、FcRIII、およびFcRn上の結合部位がマップされており、結合が改善されたバリエーションが報告されている(Shields, R.L. et al. (2001) J. Biol. Chem. 276:6591-6604を参照)。256位、290位、298位、333位、334位、および339位における特定の突然変異が、FcRIIIとの結合を改善することが報告されている。加えて、T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K24A、およびS298A/E333A/K334Aの組み合わせ突然変異体が、FcRIIIとの結合を改善することが報告されている。

【0106】

さらに別の態様では、抗体のグリコシル化が修飾される。例えば、非グリコシル化抗体を作製することができる(すなわち抗体はグリコシル化を欠いている)。グリコシル化は例えば、抗原に対する抗体の親和性が高まるように変化させることが可能である。このような糖質の修飾は例えば、抗体配列内におけるグリコシル化の1つまたは複数の部位を変化させることで達成できる。例えば、可変領域のフレームワークの1つまたは複数のグリコシル化部位を除去することで対象部位におけるグリコシル化の除去につながる、1つまたは複数のアミノ酸置換を導入することができる。このような脱グリコシル化は、抗原に対する抗体の親和性を高める場合がある。このような方法は、Co et al.による米国特許第5,714,350号および第6,350,861号で詳しく説明されている。

【0107】

追加的または代替的に、フコシル残基量が少ない低フコシル化抗体や、分岐性のGlcNAc構造が増えた抗体などの、グリコシル化のタイプが変化した抗体を作製することができる。このようなグリコシル化パターンの変化は、抗体のADCC能力を高めることができる。このような糖質の修飾は例えば、グリコシル化装置を変化させた宿主細胞で抗体を発現させることで達成できる。グリコシル化装置が改変された細胞は当技術分野で報告されており、本発明の組換え抗体を発現させることで、グリコシル化が改変された抗体を産生する宿主細胞として使用することができる。例えば、Hanai et al.によるEP 1,176,195では、フコシルトランスフェラーゼをコードするFUT8遺伝子が機能的に破壊された細胞系列について説明されている。このような細胞系列で発現される抗体は低フコシル化を示す。PrestaによるPCT公報W003/035835では、フコースをAsn(297)結合糖鎖に結合させる能力が低下したバリエーションCHO細胞系列であるLec13細胞について説明されている。この場合も、得られた宿主細胞で発現される抗体は低フコシル化を示す(Shields, R.L. et al. (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740も参照)。Umana et al.によるPCT公報W099/54342には

10

20

30

40

50

、改変細胞系列で発現される抗体が、抗体のADCC活性の上昇につながる分岐性の高いGlcNAc構造を示すように、糖タンパク質を修飾するグリコシルトランスフェラーゼ(例えば、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII))を発現するように作製された細胞系列について記載されている(Umana et al. (1999) Nat. Biotech. 17:176-180も参照)

【0108】

本発明で想定される、本明細書に記載された抗体の別の修飾はPEG化である。抗体はPEG化されることで、例えばその生物学的(例えば血清)半減期が延長される。抗体をPEG化するために、抗体またはこの断片を典型的には、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール(PEG)と、1つまたは複数のPEG基が抗体または抗体断片と結合する条件で反応させる。好ましくはPEG化は、反応性PEG分子(または類似の反応性水溶性ポリマー)とのアシル化反応またはアルキル化反応を介して実施される。本明細書で用いる「ポリエチレングリコール」という用語は、モノ(C1~C10)アルコキシ-ポリエチレングリコール、もしくはアリールオキシ-ポリエチレングリコール、またはポリエチレングリコール-マレイミドなどの、他のタンパク質の誘導体化に使用されている任意の形状のPEGを含むことが意図される。ある態様では、PEG化される抗体は非グリコシル化抗体である。タンパク質をPEG化する方法は当技術分野で既知であり、本発明の抗体に応用することができる。これについては例えば、Nishimura et al.によるEP 0 154 316、およびIshikawa et al.によるEP 0 401 384を参照されたい。

【0109】

抗体の改変法

上述したように、本明細書に開示された V_H 配列および V_K 配列を有する抗CD32抗体を使用して、 V_H 配列および/または V_K 配列、またはこれに結合する定常領域を修飾することで新しい抗CD32抗体の作製が可能である。したがって、本発明の別の局面では、本発明の抗CD32抗体、例えばMDE-8またはMDE-9の構造的特性を利用して、ヒトCD32との結合などの、本発明の抗体の少なくとも1つの機能特性を保持する、構造的に関連した抗CD32抗体が作製される。例えば、MDE-8、MDE-9の1つまたは複数のCDR領域、またはこの突然変異を、既知のフレームワーク領域、および/または他のCDRと組換え的に組み合わせることで、上述したような他の、組換え的に作製された本発明の抗CD32抗体が得られる。他のタイプの修飾には、上記セクションに記載された修飾などがある。改変法に用いられる出発材料は、本明細書に記載された1つまたは複数の V_H 配列および/または V_K 配列、またはこれらの1つまたは複数のCDR領域である。改変抗体を作製するためには、本明細書に記載された1つまたは複数の V_H 配列および/または V_K 配列、またはこれらの1つまたは複数のCDR領域を有する抗体を実際に作製する(すなわちタンパク質として発現させる)ことは必要ではない。むしろ配列に含まれる情報が、当初の配列に由来する「第2世代の配列」を作製するための出発材料として使用され、後に「第2世代の配列」が作製されてタンパク質として発現される。

【0110】

したがって別の態様では、本発明は、以下の段階を含む、抗CD32抗体を作製する方法を提供する：

(a) 以下を提供する段階：

(i) SEQ ID NO: 1もしくは13のアミノ酸配列を含むCDR1の配列；SEQ ID NO: 2もしくは14のアミノ酸配列を含むCDR2の配列；およびSEQ ID NO: 3もしくは15のアミノ酸配列を含むCDR3の配列を含む、重鎖可変領域の抗体配列；および/または

(ii) SEQ ID NO: 4もしくは16のアミノ酸配列を含むCDR1の配列；SEQ ID NO: 5もしくは17のアミノ酸配列を含むCDR2の配列；およびSEQ ID NO: 6もしくは18のアミノ酸配列を含むCDR3の配列を含む、軽鎖可変領域の抗体配列；

(b) 少なくとも1つの改変された抗体配列を作製するために、少なくとも1つの可変領域の抗体配列内における少なくとも1つのアミノ酸残基を変化させる段階(このような配列は、重鎖可変領域の抗体配列、および軽鎖可変領域の抗体配列から選択される)；ならびに

(c) 改変された抗体配列をタンパク質として発現させる段階。

【0111】

標準的な分子生物学手法で、改変抗体配列の作製および発現が可能である。

【0112】

好ましくは、改変抗体配列にコードされた抗体は、本明細書に記載された抗CD32抗体の1つまたは複数または全ての機能特性を保持する抗体である。このような機能特性は、以下を含むがこれらに限定されない：

- a) Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b) Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c) Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d) 自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e) Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

10

【0113】

改変抗体の機能特性は、当技術分野で利用可能な、および/または実施例に記載されているような本明細書に記載された標準的なアッセイ法(例えばフローサイトメトリー、結合アッセイ法、EAロゼット形成など)で評価することができる。

【0114】

本発明の抗体の改変法のある態様では、抗CD32抗体のコード配列の全体または一部分に突然変異をランダムに、または選択的に導入することが可能であり、および結果として得られた修飾型の抗CD32抗体を、本明細書に記載された手順で、結合活性および/または他の機能特性に関してスクリーニングすることができる。突然変異誘発法は当技術分野で報告されている。例えば、ShortによるPCT公報WO02/092780では、飽和突然変異誘発、合成連結アセンブリ(synthetic ligation assembly)、またはこれらの組み合わせを使用する、抗体突然変異を作製してスクリーニングする方法について説明されている。またはLazar et al.によるPCT公報WO03/074679では、コンピューターを利用したスクリーニング法で抗体の物理化学的特性を最適化する方法が説明されている。

20

【0115】

本発明の抗体をコードする核酸分子

本発明の別の局面は、本発明の抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、細胞全体に、細胞溶解物中に、または部分的に精製された状態か、もしくは実質的に純粋な状態で、存在する場合がある。核酸は、他の細胞成分または他の混入物、例えば細胞内の他の核酸またはタンパク質を、アルカリ/SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィ、アガロースゲル電気泳動、および他の当技術分野で周知の手法を含む標準的な手法で精製して除去することで、「単離される」か、または「実質的に純粋な状態とされる」。これについては、F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照されたい。本発明の核酸は例えばDNAまたはRNAの場合があり、イントロンを含む配列を含む場合もあれば含まない場合もある。好ましい態様では、核酸はcDNA分子である。

30

【0116】

本発明の核酸は、標準的な分子生物学的手法で得られる。ハイブリドーマ(例えば、以下に詳述するヒト免疫グロブリン遺伝子を有するトランスジェニックマウスから作製されるハイブリドーマ)で発現される抗体の場合、ハイブリドーマによって作られる抗体の軽鎖および重鎖をコードするcDNAは、標準的なPCR増幅法またはcDNAクローニング法で得られる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから(例えばファージディスプレイ法を使用して)得られる抗体の場合、抗体をコードする核酸をライブラリーから回収することができる。

40

【0117】

本発明の好ましい核酸分子は、MDE-8およびMDE-9モノクローナル抗体のVH配列およびVL配列をコードする核酸分子である。MDE-8のVH配列をコードするDNA配列はSEQ ID NO: 9に

50

示されている。MDE-8のVL配列をコードするDNA配列はSEQ ID NO: 10に示されている。MDE-9のVH配列をコードするDNA配列はSEQ ID NO: 21に示されている。MDE-9のVL配列をコードするDNA配列はSEQ ID NO: 22に示されている。

【0118】

VHセグメントおよびVLセグメントをコードするDNA断片が得られたら、これらのDNA断片を、標準的な組換えDNA手法でさらに操作して、例えば可変領域遺伝子を完全長の抗体鎖の遺伝子に、Fab断片の遺伝子に、またはscFvの遺伝子に変換することができる。このような操作では、VLまたはVHをコードするDNA断片は、抗体の定常領域またはフレキシブルリンカーなどの別のタンパク質をコードする別のDNA断片に動作可能に連結される。この文脈で使用される「動作可能に連結される」という用語は、2つのDNA断片が、2つのDNA断片にコードされたアミノ酸配列がインフレームで維持されるように連結されることを意味することが意図される。

10

【0119】

VH領域をコードする単離されたDNAは、VHをコードするDNAを、重鎖定常領域(CH1、CH2、およびCH3)をコードする別のDNA分子に動作可能に連結することで完全長の重鎖遺伝子に変換することができる。ヒトの重鎖定常領域の遺伝子の配列は当技術分野で周知であり(例えば、Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照)、およびこれらの領域を含むDNA断片は、標準的なPCR増幅によって得られる。重鎖定常領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM、またはIgDの定常領域の場合があるが、最も好ましくはIgG1またはIgG4の定常領域である。Fab断片の重鎖遺伝子の場合、VHをコードするDNAを、重鎖のCH1定常領域のみをコードする別のDNA分子に動作可能に連結することができる。

20

【0120】

VL領域をコードする単離されたDNAは、VLをコードするDNAを、軽鎖定常領域CLをコードする別のDNA分子に動作可能に連結することで、完全長の軽鎖遺伝子(ならびにFab軽鎖遺伝子)に変換することができる。ヒトの軽鎖定常領域の遺伝子配列は当技術分野で周知であり(例えば、Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照)、このような領域を含むDNA断片は、標準的なPCR増幅によって得られる。軽鎖定常領域は、定常領域または定常領域の場合があるが、最も好ましくは定常領域である。

30

【0121】

scFv遺伝子を作製するためには、VH配列およびVL配列が、フレキシブルリンカーで連結されたVL領域およびVH領域とともに連続した1本鎖タンパク質として発現可能となるように、VHおよびVLをコードするDNA断片を、フレキシブルリンカーをコードする例えばアミノ酸配列(Gly₄-Ser)₃をコードする別の断片に動作可能に連結する(例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426; Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554を参照)。

40

【0122】

本発明のモノクローナル抗体の産生

本発明のモノクローナル抗体(mAb)は、従来のモノクローナル抗体法を含む多様な手法、例えばKohler and Milstein (1975) Nature 256: 495に記載された標準的な体細胞ハイブリダイゼーション法で作製することができる。原理的には体細胞ハイブリダイゼーション法が好ましいものの、モノクローナル抗体を産生させる他の手法(例えばウイルスまたは癌遺伝子によるBリンパ球の形質転換)を用いることができる。

【0123】

ハイブリドーマを作製するための好ましい動物系はマウスの系である。マウスにおけるハイブリドーマの作製は、十分に確立された手法である。免疫化された脾細胞を融合用に単離するための免疫化のプロトコルおよび手法は当技術分野で周知である。融合パートナー

50

ー(例えばマウスの骨髄腫細胞)、および融合手順も知られている。

【0124】

本発明のキメラ抗体またはヒト化抗体は、上記手順で作製されたマウスのモノクローナル抗体の配列を元に作製することができる。重鎖および軽鎖の免疫グロブリンをコードするDNAは、対象となるマウスのハイブリドーマから得られ、および非マウス(例えばヒト)の免疫グロブリン配列を含むように、標準的な分子生物学的手法で改変することができる。例えば、キメラ抗体を作製する際は、マウスの可変領域をヒトの定常領域に、当技術分野で周知の方法で連結することができる(例えば、Cabilly et al.による米国特許第4,816,567号を参照)。ヒト化抗体を作製する際は、マウスのCDR領域をヒトのフレームワークに、当技術分野で周知の方法で挿入することができる(例えば、Winterによる米国特許第5,225,539号、ならびにQueen et al.による米国特許第5,530,101号；第5,585,089号；第5,693,762号、および第6,180,370号を参照)。

10

【0125】

好ましい態様では、本発明の抗体はヒトモノクローナル抗体である。CD32に対するヒトモノクローナル抗体は、マウスの免疫系ではなくヒト免疫系の一部を有するトランスジェニックマウスまたは染色体導入マウスを使用することで作製できる。このようなトランスジェニックマウスおよび染色体導入マウスは本明細書で、それぞれHuMAbマウスおよびKMマウスと呼ばれ、本明細書ではまとめて「ヒトIgマウス」と呼ばれるマウスを含む。

【0126】

HuMAbマウス(登録商標)(Medarex, Inc.)は、再編成が生じていないヒトの重鎖(μ および δ)、ならびに軽鎖の免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子のミニ座位(miniloci)を、内因性の μ 鎖および δ 鎖の座位を不活性化させる標的突然変異とともに含む(例えば、Lonberg, et al. (1994) Nature 368 (6474): 856-859を参照)。したがってHuMAbマウスは、マウスのIgMまたは δ 鎖の低い発現を示し、および免疫化に反応して、導入されたヒトの重鎖および軽鎖の導入遺伝子はクラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて、高親和性のヒトIgGモノクローナル抗体を生じる(Lonberg, N. et al. (1994)、前掲；総説は、Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93、およびHarding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546)。HuMAbマウスの作製および使用、ならびにこのようなマウスによって生じるゲノム修飾については、全ての内容が参照により特異的に本明細書に組み入れられる、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295；Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656；Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724；Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123；Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830；Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920；Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591；およびFishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851に詳しく説明されている。全てLonbergおよびKayによる米国特許第5,545,806号；第5,569,825号；第5,625,126号；第5,633,425号；第5,789,650号；第5,877,397号；第5,661,016号；第5,814,318号；第5,874,299号；および第5,770,429号；Surani et al.による米国特許第5,545,807号；ならびに全てLonbergおよびKayによるPCT公報番号WO92/03918, WO93/12227, WO94/25585, WO97/13852, WO98/24884およびWO99/45962；ならびにKorman et al.によるPCT公報番号WO01/14424も参照されたい。

20

30

40

【0127】

別の態様では、本発明のヒト抗体は、ヒトの重鎖の導入遺伝子、およびヒトの軽鎖の導入染色体を有するマウスのような、導入遺伝子上および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を有するマウスを使用して作製することができる。本明細書で「KMマウス」と呼ばれる、このようなマウスについては、Ishida et al.によるPCT公報WO02/43478で詳述されている。

【0128】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する別のトランスジェニック動物系が当技術

50

分野で利用可能であり、本発明の抗CD32抗体の作製に使用することができる。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc.)と呼ばれる別のトランスジェニック系を使用することができる；このようなマウスは例えば、Kucherlapati et al.による米国特許第5,939,598号；第6,075,181号；第6,114,598号；第6,150,584号、および第6,162,963号に記載されている。

【0129】

さらに、ヒトの免疫グロブリン遺伝子を発現する別の導入染色体動物系が当技術分野で利用可能であり、本発明の抗CD32抗体の作製に使用可能である。例えば、「TCマウス」と呼ばれる、ヒトの重鎖の導入染色体とヒトの軽鎖の導入染色体の両方を有するマウスを使用することができる；このようなマウスについては、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:722-727に記載されている。さらに、ヒトの重鎖および軽鎖の導入染色体を有するウシが当技術分野で報告されており(Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)、本発明の抗CD32抗体の作製に使用可能である。

10

【0130】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするファージディスプレイ法で作製することもできる。ヒト抗体を単離するファージディスプレイ法は当技術分野で確立されている。これについては例えば、Ladner et al.による米国特許第5,223,409号；第5,403,484号；および第5,571,698号；Dower et al.による米国特許第5,427,908号および第5,580,717号；McCafferty et al.による米国特許第5,969,108号および第6,172,197号；ならびにGriffiths et al.による米国特許第5,885,793号；第6,521,404号；第6,544,731号；第6,555,313号；第6,582,915号および第6,593,081号を参照されたい。

20

【0131】

本発明のヒトモノクローナル抗体は、ヒトの免疫細胞が、ヒトの抗体反応が免疫化によって生じ得るように再構成されたSCIDマウスを使用して作製することもできる。このようなマウスについては例えば、Wilson et al.による米国特許第5,476,996号および第5,698,767号に記載されている。

【0132】

ヒトIgマウスの免疫化

ヒトIgマウスを本発明のヒト抗体の作製に使用する場合は、このようなマウスを、Lonberg, N. et al. (1994) Nature 368(6474):856-859；Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851；ならびにPCT公報WO98/24884およびWO01/14424に記載された、CD32抗原および/または組換え型のCD32、またはCD32融合タンパク質の精製済み調整物または濃縮調整物で免疫化することができる。好ましくはマウスは、初回注入時点で6~16週齢の個体とする。例えば、CD32抗原の精製済み調整物または組換え調整物(5~50 μg)を、ヒトIgマウスの腹腔内投与によって免疫化するために使用することができる。

30

【0133】

CD32に対する完全長のヒトモノクローナル抗体を作製する詳細な手順については実施例1で説明する。さまざまな抗原を使用した経験の蓄積によって、トランスジェニックマウスが、最初に腹腔内経路で(IP)完全フロインドアジュバント中の抗原で免疫化された後に1週おきで不完全フロインドアジュバント中の抗原によるIP免疫接種(最大計6回)を受けた場合に反応することがわかっている。しかしながら、フロインドアジュバント以外のアジュバントも有効なことがわかっている。加えて、アジュバントの非存在下における細胞全体の免疫原性が高いことがわかっている。免疫応答は、眼窩後方からの(retroorbital)採血で得られる血漿試料による免疫化プロトコルの過程でモニタリングすることができる。血漿はELISA(後述)でスクリーニング可能であり、抗CD32ヒト免疫グロブリンの十分な力価を示すマウスを融合用に使用できる。抗原を静脈内に注射して刺激してから3日後にマウスを屠殺して脾臓を摘出することができる。各免疫化に関して2~3回の融合の実施が必要になると予想される。典型的には6~24匹のマウスを各抗原で免疫化する。通常はHCo7とHCo12の両系統を使用する。加えて、HCo7とHCo12の両導入遺伝子を掛け合わせる(bre ed together)ことで、2種類の異なるヒト重鎖導入遺伝子(HCo7/HCo12)を有する1系統のマ

40

50

ウスが得られる。

【0134】

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

本発明のヒトモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫化マウスから脾細胞および/またはリンパ節細胞を摘出して、マウスの骨髄腫細胞系列などの適切な不死化細胞系列と融合させる。結果として得られるハイブリドーマを、抗原特異的抗体の産生に関してスクリーニングすることができる。例えば、免疫化マウスの脾臓のリンパ球の1個の細胞の懸濁液を、6分の1の数のP3X63-Ag8.653非分泌マウス骨髄腫細胞(ATCC, CRL 1580)と50% PEGを使用して融合させることができる。約 2×10^5 個の細胞を平底マイクロタイタープレートにプレーティング後に、20%の胎児クローン血清、18%「653」馴化培地、5% origen (IGEN)、4 mM L-グルタミン、1 mMピルビン酸ナトリウム、5 mM HEPES、0.055 mM 2-メルカプトエタノール、50単位/mlペニシリン、50 mg/mlストレプトマイシン、50 mg/mlゲンタマイシン、および1X HAT (Sigma ; HATは融合の24時間後に添加)を含む選択培地で2週間のインキュベーションを行う。約2週間後に細胞を、HATをHTと交換した培地で培養することができる。次に各ウェルを対象に、ヒトモノクローナルIgM抗体およびIgG抗体に関してELISAでスクリーニングを行うことができる。広範なハイブリドーマの成長が進んでいけば、培地が通常10~14日後に観察可能である。抗体を分泌するハイブリドーマを再びプレーティングし、スクリーニングを再び行い、および仮にヒトIgGが依然として陽性ならば、モノクローナル抗体を少なくとも2回、限界希釈法でサブクロニングすることができる。安定なサブクローンを次にインビトロで培養することで、組織培地中に、特性解析用の少量の抗体が得られる。

10

20

【0135】

ヒトモノクローナル抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体の精製用に2リットルのスピナーフラスコ中で成長させることができる。上清を濾過して濃縮した後に、プロテインA-セファロース(Pharmacia, Piscataway, N.J.)によるアフィニティークロマトグラフィーを行うことができる。溶出されたIgGの純度は、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーで確認できる。緩衝液をPBSと交換して、濃度を1.43の吸光係数を用いて OD_{280} によって決定することができる。モノクローナル抗体のアリコートを得て、-80 で保存する。

【0136】

本発明のモノクローナル抗体を産生する形質移入細胞の作製

本発明の抗体は、例えば周知の組換えDNA手法と遺伝子トランスフェクション法を組み合わせることで、宿主細胞の形質移入細胞で産生させることもできる(例えば、Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

30

【0137】

例えば、抗体、またはこの抗体断片を発現させるためには、一部分または完全長の軽鎖および重鎖をコードするDNAを、標準的な分子生物学的手法(例えば、対象抗体を発現するハイブリドーマを使用するPCR増幅またはcDNAクローニング)で得ることが可能であり、およびDNAを発現ベクターに、対象遺伝子が転写および翻訳の制御配列に動作可能に連結されるように挿入することができる。この文脈において、「動作可能に連結される」という用語は、ベクター内の転写および翻訳の制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節する意図された機能を発揮するように、抗体遺伝子がベクターに連結されていることを意味することが意図される。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞に適合するように選択される。抗体軽鎖の遺伝子および抗体重鎖の遺伝子を別個のベクターに挿入することが可能であるほか、より典型的には両遺伝子を同じ発現ベクターに挿入する。抗体遺伝子は、標準的な方法で(例えば、抗体遺伝子断片およびベクター上の相補的な制限酵素切断部位の連結によって、または制限酵素切断部位が存在しない場合は平滑末端連結の連結によって)発現ベクターに挿入される。本明細書に記載された抗体の軽鎖および重鎖の可変領域については、 V_H セグメントがベクター内の C_H セグメントに動作可能に連結され、かつ V_K セグメントがベクター内の C_L セグメントに動作可能に連結されるよう

40

50

に、所望のアイソタイプの重鎖定常領域および軽鎖定常領域を既にコードする発現ベクターへ挿入することにより、任意の抗体アイソタイプの完全長の抗体遺伝子の作製に使用することができる。追加的または代替的に、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促すシグナルペプチドをコードさせることができる。抗体鎖の遺伝子は、シグナルペプチドが抗体鎖遺伝子のアミノ末端にインフレームで連結されるように、ベクターにクローニングすることができる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンのシグナルペプチド、または異種のシグナルペプチド(非免疫グロブリンタンパク質に由来するシグナルペプチド)の場合がある。

【0138】

抗体鎖遺伝子に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を有する。「調節配列」という用語は、抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するプロモーター、エンハンサー、および他の発現制御エレメント(例えばポリアデニル化シグナル)を含むことが意図される。このような調節配列は例えば、Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990))に記載されている。調節配列の選択を含む、発現ベクターの設計が、形質転換対象の宿主細胞の選択や、タンパク質の望ましい発現レベルなどの因子に依存する可能性があることは当業者には明らかであろう。哺乳類の宿主細胞における発現に好ましい調節配列は、サイトメガロウイルス(CMV)、シミアンウイルス40(SV40)、アデノウイルス(例えば、アデノウイルスの主要後期プロモーター(AdMLP)、およびポリオーマに由来するプロモーターおよび/またはエンハンサーなどの、哺乳類細胞における高レベルのタンパク質発現を誘導するウイルス配列を含む。または、ユビキチンプロモーターや - グロビンプロモーターなどの非ウイルス性の調節配列を使用することができる。さらに調節エレメントは、SV40初期プロモーターに由来する配列を含むSRプロモーター系、およびヒトT細胞白血病ウイルス1型の末端反復配列などの、さまざまな供給源に由来する配列を含む(Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

【0139】

抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列(例えば複製起点)などの追加的な配列、および選択マーカー遺伝子を有する場合がある。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入された宿主細胞の選択を容易にする(例えば、全てAxel et al.による米国特許第4,399,216号、第4,634,665号、および第5,179,017号を参照)。例えば典型的には、選択マーカー遺伝子は、G418、ハイグロマイシン、またはメトトレキセートなどの薬剤に対する耐性を、ベクターが導入された宿主細胞にもたらず。好ましい選択マーカー遺伝子は、ジヒドロ葉酸還元酵素(DHFR)遺伝子(dhfr-宿主細胞のメトトレキセートによる選択/増幅に使用)、およびneo遺伝子(G418による選択用)を含む。

【0140】

重鎖および軽鎖の発現に関しては、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクターを宿主細胞に標準的な手法でトランスフェクトする。「トランスフェクション」という用語のさまざまな形は、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿法、DEAE-デキストラントランスフェクションなどの、原核宿主細胞または真核宿主細胞への外因性DNAの導入に広く使用されている多様な手法を含むことが意図される。本発明の抗体を、原核宿主細胞または真核宿主細胞のいずれかで発現させることは理論的に可能であるが、真核細胞、最も好ましくは哺乳類宿主細胞における抗体の発現が最も好ましい。というのは、このような真核細胞、特に哺乳類細胞は原核細胞より、適切に折りたたまれて免疫学的に活性のある抗体をアセンブリさせて分泌する可能性が高いからである。抗体遺伝子の原核細胞における発現は、活性抗体の高収率の産生には有効でないと報告されている(Boss, M.A. and Wood, C.R. (1985) Immunology Today 6:12-13)。

【0141】

本発明の組換え抗体を発現する好ましい哺乳類宿主細胞は、例えばR. J. Kaufman and P.A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621)に記載されたDHFR選択マーカーを使用する

チャイニーズハムスター卵巣(CHO細胞)(Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220に記載されたdhfr- CHO細胞を含む)、NS0ミエローマ細胞、COS細胞、およびSP2細胞を含む。特に、NS0ミエローマ細胞の使用に関しては、別の好ましい発現系は、W087/04462、W089/01036、およびEP 338,841に記載されたGS遺伝子発現系である。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターを哺乳類宿主細胞に導入する際は、宿主細胞における抗体が発現されるのに、より好ましくは、宿主細胞を成長させる培地中へ抗体が分泌されるのに十分な時間、宿主細胞を培養することで抗体を産生させる。抗体は培地から、標準的なタンパク質精製法で回収することができる。

【0142】

追加的または代替的に、CD32との結合を単純にするために、以下のような本発明の抗体の他の機能特性を、上記のような改変抗体が保持するように選択することができる：

- a) Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、Fc RIIb1^{*}には結合するが、Fc RI (CD64)にも、Fc RIII (CD16)にも、Fc R (CD89)にも結合しない；
- b) Fc RIIaとリガンドの結合を阻害する；
- c) Fc RIIaの表面発現をダウンモジュレートする；
- d) 自己免疫性溶血性貧血を阻害する；または
- e) Fc RIIa-H131には結合するが、Fc RIIa-R131にもFc RIIb1^{*}にも結合しない。

【0143】

抗原に対する抗体の特性解析

本発明の抗体を、CD32との結合に関して、例えば標準的なELISAで検討することができる。簡単に説明すると、PBSを溶媒とする0.25 µg/mlの精製CD32でマイクロタイタープレートをコーティングした後に、5%ウシ血清アルブミン(溶媒PBS)でブロック処理を行う。抗体の希釈物(例えばCD32免疫化マウスの血漿の希釈物)を各ウェルに添加し、37 °Cで1~2時間インキュベートする。このプレートをPBS/Tweenで洗浄後に、アルカリホスファターゼを結合させた二次試薬(例えばヒト抗体の場合は、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬)で37 °Cで1時間インキュベートする。洗浄後にプレートをpNPP基質(1 mg/ml)で感光させ、405~650のODで解析する。好ましくは、最高の力価を示すマウスを融合用使用する。

【0144】

上述のELISAアッセイ法で、CD32免疫原と陽性の反応性を示すハイブリドーマのスクリーニングを行うこともできる。CD32と高アビディティで結合するハイブリドーマをサブクロニングして、さらに解析を行う。親細胞の反応性を保持する(ELISAによる)、個々のハイブリドーマに由来する1個のクローンを、-140 °Cで保存される5~10本のバイアル細胞バンクの作製用に、および抗体精製用に選択することができる。

【0145】

抗CD32抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体の精製用に2リットルのスピナーフラスコ中で成長させることができる。上清を濾過して濃縮した後に、プロテインA-セファロース(Pharmacia, Piscataway, NJ)によるアフィニティクロマトグラフィーを行うことができる。溶出されたIgGの純度は、ゲル電気泳動および高速液体クロマトグラフィーで確認できる。緩衝液をPBSと交換して、濃度を1.43の吸光係数を用いてOD₂₈₀によって決定することができる。モノクローナル抗体のアリコートを得て、-80 °Cで保存する。

【0146】

選択された抗CD32モノクローナル抗体が唯一のエピトープに結合するか否かを判定するために、各抗体を市販の試薬(Pierce, Rockford, IL)を使用してビオチン化することができる。非標識のモノクローナル抗体とビオチン化モノクローナル抗体を使用する競合試験は、上述のCD32でコーティングしたELISAプレートを使用して実施することができる。ビオチン化mAbの結合は、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼプローブで検出することができる。

【0147】

10

20

30

40

50

精製された抗体のアイソタイプを決定するために、アイソタイプELISAを、特定のアイソタイプの抗体に特異的な試薬を使用して実施することができる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを決定するために、マイクロタイタープレートのウェルを1 μ g/mlの抗ヒト免疫グロブリンで4で一晚かけてコーティングすることができる。1% BSAによるブロッキング後に、プレートを1 μ g/mlまたはこれ未満の試験モノクローナル抗体または精製されたアイソタイプ対照と、周囲温度で1~2時間反応させる。次にウェルを、ヒトIgG1またはヒトIgM特異的アルカリホスファターゼ結合プローブのいずれかと反応させることができる。プレートを上記手順で感光させて解析する。

【0148】

抗CD32ヒトIgGを、CD32抗原との反応性に関してウェスタンブロッティングでさらに検討することができる。簡単に説明すると、CD32を作製して、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を行うことができる。電気泳動後に、分離された抗原をニトロセルロース膜にトランスファーし、10%ウシ胎児血清でブロック処理し、および検討対象のモノクローナル抗体でプローブ処理する。ヒトIgG結合を、抗ヒトIgGアルカリホスファターゼを使用することで検出して、BCIP/NBT基質タブレット(Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo.)で感光させることが可能である。

【0149】

免疫コンジュゲート

別の局面では、本発明は、検出可能なマーカー、細胞毒、薬剤(例えば免疫抑制剤)、または放射性毒素などの診断的部分または治療的部分に結合された抗CD32抗体またはこの断片を特徴とする。このようなコンジュゲートを本明細書では「免疫コンジュゲート」と呼ぶ。1種類または複数の細胞毒を含む免疫コンジュゲートは、「免疫トキシン」と呼ぶ。細胞毒または細胞毒性剤は、細胞に有害な(例えば細胞を死滅させる)任意の薬剤を含む。例には、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ピンクリスチン、ピンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルピシン、ダウノルピシン、ジヒドロキシアントラセンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにこれらの類似体または相同物などがある。治療的薬剤は例えば、代謝拮抗剤(例えばメトトレキセート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラピン、5-フルオロウラシル、デカルバジン)、アルキル化剤(例えばメクロレタミン、チオテバ、クロラムブシル、メルファラン、カルムスチン(BSNU)およびロムスチン(CCNU)、シクロホスファミド、ブスルファン、ジプロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、およびcis-ジクロロジアミン白金(II)(DDP)シスプラチン)、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン(旧名ダウノマイシン)およびドキシソルピシン)、抗生物質(例えばダクチノマイシン(旧名アクチノマイシン)、プレオマイシン、ミトラマイシン、およびアンスラマイシン(AMC))、ならびに抗有糸分裂剤(例えばピンクリスチンおよびピンブラスチン)も含む。

【0150】

抗体に結合可能な検出可能なマーカーの非制限的な例には、フルオレセイン、シアニン、Cy-3、ピオチンなどがある。抗体は、このような検出可能なマーカーによって、実施例に記載された手法を含む、当技術分野で既知の方法で標識することができる。

【0151】

本発明の抗体に結合可能な治療的細胞毒の他の好ましい例は、デュオカルマイシン(duocarmycin)、カリケアマイシン、マイタンシン、およびオーリスタチン、ならびにこれらの誘導体を含む。カリケアマイシン抗体コンジュゲートの一例が市販されている(Mylotag(商標); Wyeth-Ayerst)。

【0152】

細胞毒素を、当技術分野で利用されるリンカー法で本発明の抗体に結合させることができる。抗体に細胞毒を結合させるために使用されているリンカーのタイプの例は、ヒドラ

10

20

30

40

50

ゾン、チオエーテル、エステル、ジスルフィド、およびペプチドを含むリンカーを含むがこれらに限定されない。リンカーは例えば、リソソーム区画内における低pHによる切断に感受性のあるもの、またはカテプシン(例えばカテプシンB、C、D)などの、もっぱら腫瘍組織で発現されるプロテアーゼなどのプロテアーゼによる切断に感受性のあるものを選択することができる。

【0153】

細胞毒、リンカーのタイプ、および治療的薬剤を抗体に結合させる方法の詳細については、Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R.J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264も参照されたい。

10

【0154】

本発明の抗体に放射性同位体を結合させることで、放射免疫コンジュゲートとも呼ばれる細胞障害性の放射性医薬品を作製することもできる。診断的または治療的に使用するために抗体に結合可能な放射性同位元素の例は、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、イットリウム⁹⁰、およびルテチウム¹⁷⁷を含むがこれらに限定されない。放射免疫コンジュゲートの作製法は当技術分野で確立されている。市販されている放射免疫コンジュゲートの例には、Zevalin(商標)(IDEC Pharmaceuticals)やBexxar(商標)(Corixa Pharmaceuticals)などがあり、放射免疫コンジュゲートの作製には、本発明の抗体を使用して類似の方法を使用することができる。

20

【0155】

本発明の抗体コンジュゲートは、任意の生物学的反応の修飾に使用可能であり、薬剤部分は、従来型の化学治療用薬剤に制限されると解釈されない。例えば薬剤部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドの場合がある。このようなタンパク質は例えば、アブリン、リシンA、緑膿菌外毒素、またはジフテリア毒素などの酵素的に活性のある毒素、またはこの活性断片；腫瘍壊死因子やインターフェロン- γ のようなタンパク質；または例えばリンホカイン、インターロイキン-1(「IL-1」)、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)、または他の成長因子などの生物学的反応修飾物質を含む場合がある。

30

【0156】

このような治療的部分を抗体に結合させる手法は周知であり、例えばArnon et al., 「Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy」, *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., 「Antibodies For Drug Delivery」, *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, 「Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review」, *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp.475-506 (1985); 「Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy」, *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp.303-16 (Academic Press 1985), およびThorpe et al., 「The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates」, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982)を参照されたい。

40

【0157】

二重特異性分子

別の局面では、本発明は、本発明の抗CD32抗体、またはこの断片を含む二重特異性分子を特徴とする。本発明の抗体またはその抗原結合部分は誘導体化することができるほか、別の機能性分子、例えば別のペプチドまたはタンパク質(例えば別の抗体または受容体に対するリガンド)に連結して、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子に結合する

50

二重特異性分子を作製することができる。本発明の抗体は実際に誘導体化することができるほか、複数の他の機能性分子に連結することで、1つより多くの異なる結合部位および/または標的分子に結合する多重特異性分子を得ることが可能であり；このような多重特異性分子も、本明細書で用いる「二重特異性分子」という用語に含まれることが意図される。本発明の二重特異性分子を作製するために、本発明の抗体を、二重特異性分子が生じるように、別の抗体、抗体断片、腫瘍特異的抗原もしくは病原体特異的抗原、ペプチド、または結合模倣物などの、1種類または複数の他の結合分子に機能的に(例えば化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合性会合、他によって)連結させることができる。

【0158】

したがって本発明は、CD32に対する特異性を有する少なくとも1つの第1の結合分子と、第2の標的エピトープに対する特異性を有する第2の結合分子とを含む二重特異性分子を含む。本発明の特定の態様では、第2の結合分子は、標的細胞、例えば腫瘍細胞もしくは病原体上の標的抗原に特異的な別の抗体または抗体部分の場合がある。第2の結合分子の例には、乳癌細胞に結合する抗Her2/Neu抗体などがある。本発明の別の特定の態様では、第2の結合分子は、標的受容体に特異的なリガンドの場合がある。第2の結合分子の例には、腫瘍細胞上のEGF受容体に結合するEGFすなわち表皮成長因子(EGF)の受容体結合部分などがある。したがって本発明は、FcγRIIaを発現するエフェクター細胞と標的細胞の両方に結合可能な二重特異性分子を含む。これらの二重特異性分子はCD32発現エフェクター細胞を標的とし、標的分子を発現する標的細胞に二重特異性分子が結合すると、標的発現細胞の食作用、抗体依存性細胞障害(ADCC)、サイトカイン放出、またはスーパーオキシドアニオンの生成などの、Fc受容体を介するエフェクター細胞の活性を引き起こす。

【0159】

さまざまな態様では、二重特異性分子の第2の部分は、以下から選択される抗原の標的エピトープに対する特異性を有する場合がある：炭疽抗原、ボツリヌス毒素、マラリア抗原、ウマ脳炎ウイルス抗原、ペスト菌(*Y. pestis*)抗原、ガストリン放出ペプチド受容体抗原(GRP)、ムチン抗原、表皮成長因子受容体(EGF-R)、HER2/neu、HER3、HER4、CD20、CD30、PSMA、癌胎児性抗原(CEA)、Pmel17、 α -ヒト絨毛性ゴナドトロピン(α -HCG)、 α -フェトプロテイン(AFP)、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、MN(gp250)イデオタイプ、MAGE抗原、SART抗原、チロシナーゼ、テロメラゼ、TAG-72抗原、MUC-1抗原、血液型抗原Lea、Leb、LeX、LeY、H-2、B-1、およびB-2、HIV-1 gag、HIV-1 env、HIV-1 nef、HBV core、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、HTLV、FELV、ORF2およびORF3抗原、原虫特異的抗原、カンジダ・アルビカンス(*Candida albicans*)抗原、細菌抗原、トキソプラズマ原虫(*Toxoplasma gondii*)抗原、梅毒トレポネーマ(*Treponema pallidum*)抗原、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)抗原、溶血性連鎖球菌(*Streptococcus hemolyticus*)抗原、ならびに結核菌抗原。

【0160】

二重特異性分子が多重特異性である本発明の態様では、同分子はさらに、抗Fc結合特異性および抗CD32結合特異性に加えて、第3の結合特異性を含む場合がある。1つの態様では、第3の結合特異性は、抗促進因子(EF)部分、例えば、細胞毒性活性に關与することで標的細胞に対する免疫応答を高める表面タンパク質に結合する分子である。「抗促進因子部分」は、抗体か、機能性の抗体断片か、または任意の分子、例えば抗原もしくは受容体に結合することでFc γ 受容体もしくは標的細胞抗原に対する結合決定基の作用を高めるリガンドである。「抗促進因子部分」は、Fc γ 受容体または標的細胞抗原に結合可能である。または抗促進因子部分は、第1および第2の結合特異性部分が結合する対象とは異なる対象に結合可能である。例えば抗促進因子部分は(例えばCD2、CD3、CD8、CD28、CD4、CD40、ICAM-1、または標的細胞に対する免疫応答を高める他の免疫細胞を介して)細胞障害性T細胞に結合可能である。

【0161】

1つの態様では、本発明の二重特異性分子は、結合特異性部分として、少なくとも1種類の抗体、または例えばFab、Fab'、F(ab')₂、Fv、もしくは1本鎖Fvを含む同抗体の断片を

含む。このような抗体は、内容が参照により明確に組み入れられるLadner et al.による米国特許第4,946,778号に記載されているような、軽鎖もしくは重鎖の二量体、またはFvや1本鎖コンストラクトなどの、この任意の最小断片の場合もある。

【0162】

1つの態様では、Fc 受容体(例えば本発明の抗CD32抗体)に対する結合特異性部分は、モノクローナル抗体によって提供され、この結合はヒト免疫グロブリンG(IgG)によってブロックされない。

【0163】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいものの、本発明の二重特異性分子に利用可能な他の抗体には、マウス抗体、キメラ抗体、およびヒト化モノクローナル抗体がある。

10

【0164】

本発明の二重特異性分子は、構成成分の結合特異性部分、例えば抗CD32結合特異性部分および抗標的細胞結合特異性部分を、当技術分野で周知の方法で結合させることで作製できる。例えば、二重特異性分子の個々の結合特異性部分を個別に作製した後に、相互に結合させることができる。結合特異性部分がタンパク質またはペプチドの場合、さまざまなカップリング剤や架橋剤を共有結合による結合に使用することができる。架橋剤の例には、プロテインA、カルボジイミド、N-スクシニミジル-S-アセチル-チオ酢酸(SATA)、5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)(DTNB)、o-フェニレンジマレイミド(oPDM)、N-スクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸(SPDP)、およびスルホスクシニミジル4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸(sulfo-SMCC)などがある(例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686 ; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照)。他の方法には、Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132 ; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83)、およびGlennie et al. (1987) J. Immunol. 139:2367-2375)に記載された方法などがある。好ましい結合剤は、いずれもPierce Chemical Co. (Rockford, IL)から入手可能なSATAおよびsulfo-SMCCである。

20

【0165】

結合特異性部分が抗体である場合、2本の重鎖のC末端のヒンジ領域のスルフヒドリル結合を介して結合可能である。特に好ましい態様では、このヒンジ領域は、結合前に奇数個のスルフヒドリル残基、好ましくは1個のスルフヒドリル残基を含むように修飾される。

【0166】

または、両方の結合特異性部分を、同じベクター内にコードさせて、同じ宿主細胞内で発現させてアセンブリさせることができる。この方法は特に、二重特異性分子がmAb x mAb融合タンパク質の場合、mAb x Fab融合タンパク質の場合、Fab x F(ab')₂融合タンパク質の場合、またはリガンドx Fab融合タンパク質の場合に有用である。本発明の二重特異性分子は、1つの1本鎖抗体および結合決定基、または2つの結合決定基を含む1本鎖の二重特異性分子を含む1本鎖分子の場合がある。二重特異性分子は、少なくとも2つの1本鎖分子を含む場合がある。二重特異性分子の作製法は例えば、米国特許第5,260,203号 ; 米国特許第5,455,030号 ; 米国特許第4,881,175号 ; 米国特許第5,132,405号 ; 米国特許第5,091,513号 ; 米国特許第5,476,786号 ; 米国特許第5,013,653号 ; 米国特許第5,258,498号 ; および米国特許第5,482,858号に記載されている。

30

40

【0167】

二重特異性分子と、その特異的な標的との結合は例えば、酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)、ラジオイムノアッセイ法(RIA)、FACS解析、バイオアッセイ法(例えば成長阻害)、またはウェスタンブロットアッセイ法で確認することができる。これらのアッセイ法のそれぞれは一般に、対象複合体に特異的な標識された試薬(例えば抗体)を使用することで、特定の対象のタンパク質-抗体複合体の存在を検出する。例えばFcR-抗体複合体は、例えば、抗体-FcR複合体を認識して特異的に結合する酵素結合抗体または抗体断片を使用して検出することができる。または複合体は、任意のさまざまな他の免疫アッセイ法で検出することができる。例えば、抗体を放射標識してラジオイムノアッセイ法(RIA)に使用することができる(例えば、参照により本明細書に組み入れられる、Weintraub, B., Princi

50

ples of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986を参照)。放射性同位体は、カウンターまたはシンチレーションカウンターを使用する手段によって、またはオートラジオグラフィーによって検出することができる。

【0168】

抗体ワクチンコンジュゲート

本発明はさらに、ワクチンコンジュゲートを形成させるために、腫瘍抗原またはウイルス抗原などの、1種類または複数の抗原に連結された1種類または複数のヒト抗CD32抗体(またはこの断片)を含む、さまざまな治療的コンジュゲートを提供する。これにより、プロセッシング、提示、および究極的には抗原に対する免疫応答を高めるために、CD32を発現する免疫細胞、特に抗原提示細胞(APC)に対するさまざまな抗原の標的化が可能となる。

【0169】

本発明の抗体-抗原ワクチンコンジュゲートは、遺伝学的または化学的な方法を含む、任意の実践的な方法で作ることができる。どのような場合も、コンジュゲートの抗体部分は、抗体全体、またはFab断片や1本鎖Fvなどの抗体部分からなっていてよい。加えて、複数の抗原を1つの抗体コンストラクトに付加することができる。

【0170】

遺伝学的手法で構築される抗CD32抗体-抗原コンジュゲート(例えば1種類の組換え融合タンパク質として発現されたコンジュゲート)は、選択された抗原を抗体に、さまざまな位置で連結させることで作ることができる。例えば、抗原は、ヒト抗体重鎖のCH₃ドメインの末端に融合させることができる。抗原は、Fab融合コンストラクト中の、または1本鎖融合コンストラクト(ScFvコンストラクト)中の可変軽鎖および可変重鎖(V_HおよびV_L)を含む配列中の抗体重鎖のヒンジ領域に融合させることもできる。または抗原は、抗体の重鎖ではなく抗体の軽鎖と融合させることができる。

【0171】

化学的手法で構築される抗体-抗原コンジュゲートは、さまざまな周知の、および入手が容易な架橋試薬を使用して作製することができる。このような架橋試薬は、さまざまな反応性アミノ酸と、または抗CD32抗体および選択された抗原上の糖質側鎖と共有結合を形成するSPDP、SATA、SMCC、DTNBなどのホモ機能性またはヘテロ機能性の化合物の場合がある。

【0172】

クローニングされて発現または精製が可能な任意の抗原を、本発明の抗体-抗原ワクチンコンジュゲートに使用するために選択できる。このような抗原を得る手法は当技術分野で周知である。例えば腫瘍関連抗原は、癌細胞から直接精製して、タンデム質量分析法などの物理化学的手法で同定可能である。または腫瘍特異的T細胞クローンは、プラスミドDNAクローンのトランスフェクションによって得られた抗原を有する抗原陰性細胞に対して試験し、抗原を発現するクローンを単離できる。次に合成ペプチドを構築して、抗原性部位すなわちエピトープを正確に同定することができる。

【0173】

本発明の抗体-抗原コンジュゲートの重要な利点は、ワクチンから強い免疫応答を速やかに引き出すことで、ワクチン接種の有効性を改善可能なことである。したがって、免疫応答が予防的または治療的に作用する感染症抗原および腫瘍抗原を、抗体MDE-8または抗体MDE-9などの本発明のヒト抗CD32抗体に結合させて、極めて有効なワクチンを作ることができる。感染症抗原の例は、ウイルスタンパク質、細菌のタンパク質および糖質、真菌のタンパク質および糖質を含むがこれらに限定されない。

【0174】

本発明の抗体-抗原コンジュゲートは、旅行中または生物戦争中に遭遇する恐れのある感染性微生物およびこれらの毒素に対するワクチン接種の有効性を改善するために使用することもできる。このような抗原の例には例えば、炭疽菌抗原、ボツリヌス毒素、マラリア抗原、ウマ脳炎抗原、およびペスト菌抗原などがある。

10

20

30

40

50

【0175】

本発明の抗体-抗原コンジュゲートに使用される他の適切な抗原は、癌の予防用または治療用の腫瘍関連抗原を含む。腫瘍関連抗原の例には、ガストリン放出ペプチド受容体抗原 (GRP)、ムチン抗原、表皮成長因子受容体 (EGF-R)、HER2/neu、HER3、HER4、CD20、CD30、PSMA、癌胎児性抗原 (CEA)、Pme117、 α -ヒト絨毛性ゴナドトロピン (α -HCG)、 α -フェトプロテイン (AFP)、gp100、MART1、TRP-2、melan-A、NY-ESO-1、MN(gp250)イディオタイプ、MAGE抗原 (例えばMAGE-1およびMAGE-3)、SART抗原、チロシナーゼ、テロメラゼ、TAG-72抗原、ならびにMUC-1抗原などがあるがこれらに限定されない。腫瘍関連抗原は、血液型抗原、例えば、Le^a、Le^b、LeX、LeY、H-2、B-1、B-2抗原も含む。別の好ましい態様では、複数の抗原が1つの抗CD32抗体コンストラクトに融合される。例えばMAGE抗原を、メラニンA、チロシナーゼ、およびgp100などの他の抗原と、GM-CSFまたはIL-12などのアジュバントとともに結合させ、抗CD32抗体コンストラクト、例えばMDE-8またはMDE-9に融合させることができる。

10

【0176】

他の適切な抗原には、ウイルス疾患の予防用または治療用のウイルス抗原などがある。ウイルス抗原の例には、HIV-1 gag、HIV-1 env、HIV-1 nef、HBV core、FAS、HSV-1、HSV-2、p17、HTLV、FELV、ORF2およびORF3抗原などがあるがこれらに限定されない。別の好ましい態様では、選択される抗原は、gp100またはPme117を含むがこれらに限定されない黒色腫特異的抗原である。別の好ましい態様では、選択される抗原は、原虫特異的抗原、例えば真菌抗原 (例えばカンジダ・アルピカンス) である。さらに別の態様では、選択される抗原は、トキソプラズマ原虫または梅毒トレポネマを含むがこれらに限定されない細菌抗原である。本発明の抗体-細菌抗原コンジュゲートは、炭疽、ボツリヌス中毒、破傷風、クラミジア、コレラ、ジフテリア、ライム病、梅毒、ならびに結核 (例えば、黄色ブドウ球菌、溶血性連鎖球菌、および結核菌) などの、さまざまな細菌疾患の治療または予防に使用可能である。

20

【0177】

薬学的組成物

別の局面では、本発明は、組成物、例えば、薬学的に許容される担体とともに製剤化された本発明のモノクローナル抗体またはその抗原結合部分の1つまたは複数の組み合わせを含む薬学的組成物を提供する。このような組成物は、本発明の (例えば2種類以上の異なる) 抗体、または免疫コンジュゲートもしくは二重特異性分子の1つまたは組み合わせを含む場合がある。例えば本発明の薬学的組成物は、標的抗原上のさまざまなエピトープに結合するか、または相補的活性を有する抗体 (または免疫コンジュゲートもしくは二重特異性分子) の組み合わせを含む場合がある。

30

【0178】

本発明の薬学的組成物は、併用療法で、すなわち他の薬剤と組み合わせて投与することも可能である。例えば併用療法は、少なくとも1種類の他の抗炎症剤または免疫抑制剤が混合された本発明の抗CD32抗体を含む場合がある。併用療法に使用可能な治療的薬剤の例については、以下の本発明の抗体の使用に関するセクションで詳述する。

【0179】

本明細書で用いる「薬学的に許容される担体」は、生理学的に適合する任意の、およびあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗菌剤、ならびに抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などを含む。好ましくは、このような担体は、静脈内投与、筋肉内投与、皮下投与、非経口投与、脊椎投与、または表皮への投与 (例えば注射もしくは注入による) に適している。投与経路に依存して、活性化化合物、すなわち抗体、免疫コンジュゲート、または二重特異性分子を、化合物を不活性化する恐れのある酸の作用および他の天然の条件から化合物を保護する材料でコーティングすることができる。

40

【0180】

本発明の薬学的化合物は、1種類または複数の薬学的に許容される塩を含む場合がある。「薬学的に許容される塩」は、親化合物の望ましい生物学的活性を保持する塩を意味し

50

、任意の望ましくない毒物学的作用を意味しない(例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照)。このような塩の例には、酸付加塩および塩基付加塩などがある。酸付加塩は、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などの非毒性無機酸に由来する塩、ならびに脂肪族のモノカルボン酸およびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族のスルホン酸などの非毒性有機酸に由来する塩を含む。塩基付加塩は、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどのアルカリ土類金属に由来する塩、ならびにN,N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどの非毒性有機アミンに由来する塩を含む。

10

【0181】

本発明の薬学的組成物は、薬学的に許容される抗酸化剤を含む場合もある。薬学的に許容される抗酸化剤の例には、(1)アスコルビン酸、塩酸システイン、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどの水溶性の抗酸化剤；(2)アスコルビン酸パルミテート、ブチルヒドロキシアニソール(BHA)、ブチルヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 α -トコフェロールなどの油溶性の抗酸化剤；および(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などの金属キレート化剤などがある。

【0182】

本発明の薬学的組成物に使用可能な適切な水性および非水性の担体の例には、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなど)、およびこれらの適切な混合物、オリーブオイルなどの植物油、ならびにオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルなどがある。適切な流動性は例えば、レシチンなどのコーティング材料を使用することで、分散の場合は必要な粒子径を保つことで、および界面活性剤を使用することで維持できる。

20

【0183】

このような組成物は、保存剤、湿潤剤、乳化剤、および分散剤などのアジュバントを含む場合もある。微生物の存在の予防は、前掲の滅菌法、およびさまざまな抗菌剤および抗真菌剤、例えばパラベン、クロロブタノール、フェノール、ソルビン酸などを含めることの両方によって確保することができる。糖や塩化ナトリウムなどの等張剤を組成物に含めることが望ましい場合もある。加えて、注射可能な薬学的剤形の長期吸収を、モノステアリン酸アルミニウムやゼラチンなどの、吸収を遅らせる薬剤を含めることで実現できる。

30

【0184】

薬学的に許容される担体は、無菌性の水溶液、または分散液、および無菌性注射用溶液または分散液の即時調製用の無菌性粉末を含む。薬学的に活性のある物質用の、このような溶媒および薬剤の使用は当技術分野で周知である。これまで挙げた任意の従来の溶媒または薬剤が活性化化合物と適合しない場合を除いて、本発明の薬学的組成物におけるこれらの使用が想定される。補助的な活性化化合物を組成物中に含めることもできる。

【0185】

治療的組成物は典型的には、製造および保存の条件で無菌性かつ安定でなければならぬ。治療的組成物は、高薬剤濃度に適した溶液、マイクロエマルジョン、リポソーム、または他の規則構造を有する構造として製剤化することができる。担体は、例えば水、エタノール、ポリオール(例えばグリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコールなど)、およびこれらの適切な混合物を含む溶媒または分散媒の場合がある。適切な流動性は例えば、レシチンなどのコーティング剤を使用することによって、分散の場合は必要な粒子径の維持によって、および界面活性剤の使用によって維持することができる。多くの場合、等張剤、例えば糖、マンニトールやソルビトールなどの多価アルコール、または塩化ナトリウムを組成物中に含めることが好ましいであろう。注射用組成物の持続性の吸収は、吸収を遅らせる薬剤、例えばモノステアレート塩やゼラチンを組成物中に含めることで実現できる。

40

50

【0186】

無菌性の注射用溶液は、必要量の活性化化合物を適切な溶媒に、必要であれば上記の成分の1種類または組み合わせとともに混合後に、滅菌微量濾過を行うことで調製できる。一般に、分散剤は、活性化化合物を、塩基性分散媒、および上記成分に由来する必要な他の成分を含む滅菌済みの溶媒中に混合することで調製される。無菌性注射用溶液の調製用の無菌性粉末の場合は、好ましい調製法は、活性成分の粉末に加えて、滅菌濾過済みの同溶液に由来する任意の追加的な所望の構成成分が得られる、真空乾燥およびフリーズドライ(凍結乾燥)である。

【0187】

単回投与剤形を作製するための、担体材料と混合可能な活性成分の量は、治療対象、および投与様式の種類に依存して変わる。単回投与剤形を作製するための担体材料と混合可能な活性成分の量は一般に、治療的作用を生じる組成物の量となる。一般に100パーセントのうち、この量は、薬学的に許容される担体との配合時に約0.01パーセント～約99パーセントの活性成分、好ましくは約0.1パーセント～約70パーセント、最も好ましくは約1パーセント～約30パーセントの活性成分の範囲となる。

10

【0188】

投与法は、最適な所望の反応(例えば治療反応)が提供されるように調整される。例えば、単回ボラスを投与したり、複数回に分けた用量を長期にわたって投与したり、治療の状況の要件によって用量を比例的に減じるか、もしくは高めることができる。投与量の投与を容易にするため、および均一性のために、非経口的組成物を用量単位剤形に製剤化することが特に有益である。本明細書で用いる「用量単位」は、治療される対象への単位投与量に適した物理的に特定の単位を意味し；個々の単位は、必要な薬学的担体とともに所望の治療的効果をもたらすように計算された所定量の活性化化合物を含む。本発明の単位投与剤形の仕様は指示されており、および、(a)活性化化合物の固有の特徴、および達成されるべき特定の治療的作用、ならびに(b)個体における感受性の治療用の活性化化合物などの、配合の技術分野における固有の制限に直接的に依存する。

20

【0189】

抗体の投与に関しては、用量は、ホストの体重に対して約0.0001～100 mg/kg、およびより一般的には0.01～5 mg/kgの範囲である。例えば投与量は0.3 mg/kg体重、1 mg/kg体重、3 mg/kg体重、5 mg/kg体重、もしくは10 mg/kg体重、または1～10 mg/kgの範囲内の場合がある。例示的な投与法は週に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1か月に1回、3か月に1回、または3～6か月間に1回の投与を必要とする。本発明の抗CD32抗体の好ましい投与レジメンは、以下の投与スケジュールの1つを使用する、投与される抗体の静脈内投与による1 mg/kg体重または3 mg/kg体重を含む：(i)4週間毎に6回の投与の後に3か月毎；(ii)3週間毎；(iii)3 mg/kg体重を1回と、これに続く1 mg/kg体重を3週間毎。

30

【0190】

いくつかの方法では、結合特異性が異なる2種類もしくはこれ以上のモノクローナル抗体が同時に投与される。この場合、投与される各抗体の投与量は所定の範囲内にある。抗体は通常、複数回投与される。投与間の間隔は例えば週に1回、1か月に1回、3か月に1回、または年に1回とすることができる。間隔は、患者における標的抗原に対する抗体の血中レベルの測定から指示されるように不規則とすることもできる。いくつかの方法では、投与量は、約1～1000 μg/mlの血漿抗体濃度となるように調整され、一部の方法では約25～300 μg/mlとされる。

40

【0191】

または抗体は、低頻度の投与が求められる状況では、徐放性製剤で投与される場合がある。投与量および投与頻度は、患者における抗体の半減期に依存して変動する。一般にヒト抗体の半減期が最も長く、これにヒト化抗体、キメラ抗体、および非ヒト抗体の順で続く。投与量および投与頻度は、処置が予防的か、または治療的であるかによって変動する場合がある。予防的応用の場合は、比較的少ない投与量が、比較的low頻度の間隔において長期間にわたって投与される。生涯にわたって投与を受け続ける患者もいる。治療的応用

50

の場合、疾患の進行が減速するか、または停止するまで、および好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで、比較的短い間隔で比較的多い投与量が時に必要とされる。これ以降は、予防的投与量を患者に投与することができる。

【0192】

本発明の薬学的組成物中の活性成分の実際の投与量レベルは、患者に毒性作用を及ぼすことなく、特定の患者にとって望ましい治療反応を達成するのに有効な活性分量、組成、および投与様式を得るために変えることができる。選択される投与量レベルは、使用される本発明の組成物の種類、またはこのエステル、塩、もしくはアミドの活性、使用される特定の化合物の投与経路、投与時間、排出速度を含む、さまざまな薬物動態学的因子、治療期間、他の薬剤、使用される特定の組成物と組み合わせて使用される化合物および/

10

【0193】

本発明の抗CD32抗体の「治療的有効投与量」は好ましくは、疾患の症状の重症度の軽減、疾患の症状のない期間の出現頻度および期間の長さ、または疾患に伴う苦痛に起因する障害もしくは機能障害の予防をもたらす。例えばAIHAの治療の場合、「治療的有効投与量」は好ましくは、疾患の症状を、治療を受けていない対象に対して約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、およびさらにより好ましくは少なくとも約80%阻害する。化合物がAIHAを抑える能力は、実施例に記載されたような動物モデル系で評価することができる。または組成物のこの特性は、化合物によるインビ

20

【0194】

本発明の組成物は、当技術分野で既知のさまざまな方法の1つまたは複数を使用して、1つまたは複数の投与経路で投与可能である。当業者であれば理解するように、投与経路および/または投与様式は、所望の結果に依存する。本発明の抗体の好ましい投与経路は、例えば注射もしくは注入による、静脈内投与、筋肉内投与、皮内投与、腹腔内投与、皮下投与、脊椎投与、または他の非経口的投与の経路を含む。本明細書で用いる「非経口的投与」という句は、通常は注射による、経腸投与および局所投与以外の投与様式を意味し、

30

【0195】

または本発明の抗体は、局所、表皮または粘膜の投与経路、例えば鼻腔内、経口、膈内、直腸内、舌下、または局所などの、非経口的でない経路で投与することができる。

【0196】

活性化合物は、インプラント、経皮パッチ、およびマイクロカプセル封入輸送系を含む徐放性剤形などの、化合物の速やかな放出を防ぐ担体とともに調製可能である。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、および

40

【0197】

治療的組成物は、当技術分野で既知の医用装置で投与可能である。例えば、好ましい態様では、本発明の治療的組成物は、米国特許第5,399,163号；第5,383,851号；第5,312,335号；第5,064,413号；第4,941,880号；第4,790,824号；または第4,596,556号に記載された装置などの、針のない皮下注入装置で投与可能である。本発明に有用な周知のインプラントおよびモジュールの例には、米国特許第4,487,603号に開示されている、制御速度で

50

薬剤分注用の埋め込み型微量注入ポンプ；米国特許第4,486,194号に開示されている、皮膚を介して薬剤を投与する治療装置；米国特許第4,447,233号に記載された、正確な注入速度で薬物を輸送するための薬剤注入ポンプ；米国特許第4,447,224号に記載された、連続的な薬剤輸送用の可変流速型の埋め込み型注入装置；米国特許第4,439,196号に記載された、マルチチャンパー区画を備えた浸透圧薬送達システム；米国特許第4,475,196号に記載された、浸透圧式薬剤送達システムなどが含まれる。これらの特許は、参照により本明細書に組み入れられる。他の多くの、同様のインプラント、輸送系、およびモジュールは当業者に既知である。

【0198】

ある態様では、本発明のヒトモノクローナル抗体は、インビボで確実に適切に分布するように製剤化することができる。例えば、血液脳関門(BBB)は、数多くの高親水性化合物を通さない。本発明の治療的化合物がBBBを(望ましいならば)確実に越えるようにするために、同化合物を例えばリポソーム中に製剤化することができる。リポソームの製造法に関しては例えば、米国特許第4,522,811号；第5,374,548号；および第5,399,331号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器に選択的に輸送されることで標的薬剤の輸送を促す、1つまたは複数の部分を含む場合がある(例えば、V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29:685を参照)。例示的な標的化部分は、葉酸またはビオチン(例えば、Low et al.による米国特許第5,416,016号を参照)；マンノシド(Umezawa et al., (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153:1038)；抗体(P.G. Bloeman et al. (1995) *FEBS Lett.* 357:140；M. Owais et al. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:180)；サー

10

20

【0199】

本発明の使用および方法

本発明のヒト抗体、抗体組成物、および方法には、CD32が関与する疾患の検出、診断、および/または治療を含む、インビトロおよびインビボにおける数多くの診断上および治療上の有用性がある。例えば、このような分子は、培養中の細胞に例えばインビトロもしくはエクスピボで投与可能であるほか、さまざまな疾患を治療、予防、および診断するために、ヒト対象に例えばインビボで投与可能である。本明細書で用いる「対象」という用語は、ヒトおよび非ヒト動物を含むことが意図される。非ヒト動物は、全ての脊椎動物、例えば非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、ニワトリ、鳥類、両生類、および爬虫類などの、哺乳類および非哺乳類を含む。対CD32抗体を他の薬剤とともに投与する際、いずれかを先に、または同時に投与することができる。

30

40

【0200】

インビボおよびインビトロにおいて本発明の抗体組成物(例えばヒトモノクローナル抗体、多重特異性分子および二重特異性分子、免疫コンジュゲート、またはワクチン)を投与する適切な経路は当技術分野で周知であり、当業者であれば選択することができる。例えば抗体組成物は、注射(例えば静脈内注射または皮下注射)で投与することができる。使用される分子の適切な投与量は、対象の年齢および体重、ならびに抗体組成物の濃度および/または剤形に依存する。

【0201】

検出法

1つの態様では、本発明の抗体(例えばヒトモノクローナル抗体、多重特異性分子および二重特異性分子、ならびに組成物)を、CD32のレベル、またはCD32を膜表面に含む細胞のレベルを検出するために使用することができる。好ましい態様では、本発明の抗体を使用して、特にFc RIIa-H131アロタイプを検出することができる。本発明の抗体を使用するCD32の検出は例えば、試料(インビトロ試料など)および対照試料に抗CD32抗体を、同抗体とCD32の複合体の形成を可能とする条件で接触させることで達成できる。抗体とCD32の間

50

で形成された任意の複合体の検出によって、試料と対照が比較される。例えば、ELISAやフローサイトメトリーアッセイ法などの当技術分野で周知の標準的な検出法を、本発明の組成物を使用して実施することができる。

【0202】

したがって1つの局面では、本発明はさらに、対象試料および対照試料に、CD32に特異的に結合する本発明の抗体もしくはこの抗原結合部分を、抗体もしくはこの部分とCD32間の複合体の形成を可能とする条件で接触させる段階を含む、試料中のCD32(例えばヒトCD32抗原)の存在を検出する方法、またはCD32の量を測定する方法を提供する。続いて複合体の形成が検出され、対象試料と対照試料間で複合体の形成に差が見られれば、試料中にCD32が存在することが明らかとなる。

10

【0203】

さらに別の態様では、本発明は、インビボもしくはインビトロにおけるFc発現細胞の存在の検出法、または定量法を提供する。この方法は、(i)検出可能なマーカーを結合させた本発明の組成物(例えばモノクローナル抗体、または多重特異性分子もしくは二重特異性分子)、またはこれらの断片を対象に投与する段階；(ii)対象を検出可能なマーカーの検出手段に曝露して、Fc発現細胞を含む領域を同定する段階を含む。

【0204】

本発明の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性分子、および二重特異性分子)は、CD32を発現する細胞を標的とするために、例えば同細胞を標識するために使用することもできる。このような使用の場合、結合剤を、検出対象の分子に結合させることができる。したがって本発明は、CD32を発現する細胞をエクスピボまたはインビトロで局在化させる方法を提供する。検出可能な標識は例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子の場合がある。

20

【0205】

好ましい態様では、本発明は、以下の段階を含む、試料中のFc RIIa-H131を検出する方法を提供する：

a)Fc RIIa-H131には結合するがFc RIIa-R131には結合しない抗体またはその抗原結合部分を試料に接触させる段階；および

b)Fc RIIa-H131と結合した抗体またはその抗原結合部分を検出する段階。

【0206】

好ましくは、抗体は、SEQ ID NO: 19のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；およびSEQ ID NO: 20のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、MDE-9抗体などの本発明のヒト抗体である。または抗体は、SEQ ID NO: 13、14、および15に示されたMDE-9のVHのCDR、および/またはSEQ ID NO: 16、17、および18に示されたMDE-9のVLのCDRを含む場合がある。

30

【0207】

試料は例えば、対象に由来する血液細胞、または対象に由来する組織試料の場合がある。

【0208】

抗体の結合は、フローサイトメトリーや免疫組織化学法などの、当技術分野で既知の方法で検出することができる。適切な検出法については、実施例で詳述する。

40

【0209】

1つの態様では、このような方法はさらに、Fc RIIa-R131の発現とFc RIIa-H131の発現の区別を可能とする、Fc RIIa-R131には結合するが、Fc RIIa-H131には結合しない抗体またはその抗原結合部分を試料に接触させる段階を含む。Fc RIIa-R131には結合するがFc RIIa-H131には結合しない抗体の例は、実施例に詳述された41H16である。

【0210】

Fc RIIa-R131およびFc RIIa-H131の多型は、治療的抗体による副作用の誘導(Tax et al. (1997) Transplantation 63:106-112)、およびRituxan(登録商標)などの抗体の臨床的有効性(Weng and Levy (2003) J. Clin. Oncol. 21:3940-3947)に関連づけられている。したがって、Fc RIIa-H131を検出する本発明の方法は、副作用および/または臨床的有

50

効性を評価または推定するために、治療的抗体による治療と併せて使用可能である。

【0211】

抗CD32抗体の使用

このような抗体は、CD32の機能を阻害またはブロックするために使用可能であり、疾患の特定の症状の予防または改善に結びつけられる。このためCD32は疾患のメディエーターと言える。非疾患状態と比較して、疾患状態中にCD32の発現に見られる差は、疾患に罹患する対象に由来する試験試料、および対照試料に抗CD32抗体を、抗体とCD32の複合体の形成を可能とする条件で接触させることで判定可能である。抗体とCD32間で形成される任意の複合体が検出されて、試料と対照が比較される。

【0212】

1つの態様では、本発明のヒト抗体、またはこの結合部分を使用して、細胞表面上の受容体のキャッピングや除去などの方法によって、エフェクター細胞上のCD32レベルをモジュレートすることができる。抗Fc受容体抗体の混合物を、この目的に使用することもできる。

【0213】

好ましい態様では、抗CD32抗体を、自己免疫性溶血性貧血、および他の血球減少疾患の治療に使用することができる。自己免疫性溶血性貧血(AIHA)では、赤血球膜抗原に対する抗体が存在し、赤血球(RBC)の生存率の低下につながる。AIHAは、ABO抗原またはマイナーRBC抗原に対するアロ抗体のために、異種骨髄移植後に高頻度で観察される(Drobyski WR et al. (1996) Bone Marrow Transplant 17:1093-1099; Hashimoto C (1998) Clin Rev Allergy Immunol. 16:285-295)。このような場合、従来の治療に対する反応は一般に不十分であり、コルチコステロイドを使用する長期にわたる免疫抑制療法が、定着およびウイルス感染リスクの増大に影響を及ぼす可能性がある。Fc RIIは、マウスおよびヒトにおけるAIHAおよび他の自己免疫性血球減少疾患に関連づけられており、ならびにFc RIIaは、ヒトにおけるヒトIgGでコーティングされた赤血球のように、免疫複合体のクリアランスに役割を果たすことが報告されている(Clynes R and Ravetch JV (1995) Immunity 3:21-26; Kumpel BM and Hadley AG (1990) Mol Immunol. 27:247-256; Dijstelbloem HM et al. (2000) Arthritis Rheum. 43:2793-2800)。実施例で説明するように、本発明の抗体は、動物モデルでAIHAを阻害可能である。したがって本発明の別の局面は、対象がAIHAに関して治療されるような、本発明の抗体またはその抗原結合部分を対象に投与する段階を含む、対象の自己免疫性溶血性貧血(AIHA)を治療または予防する方法に関する。

【0214】

別の好ましい態様では、抗CD32抗体を、免疫性血小板減少性紫斑病(ITP)の治療に使用することができる。ITPは、IgGが結合する血小板の、自己抗体による破壊を特徴とする自己免疫疾患である(Crow AR and Lazarus AH (2003) J pediatr Hematol Oncol 25 Suppl 1:S14-18)。抗CD32抗体はFc受容体に結合してFc受容体による食作用をブロックして、血小板と単球の結合を阻害することで血小板の寿命を延長させる(Wallace PK et al. (1997) Cancer Immunol Immunother 45:137-41; Wiener E et al. (2000) Eur J Haematol 65:399-406)。

【0215】

二重特異性試薬および多重特異性試薬の使用

自己免疫疾患、癌、または病原体感染などの疾患を、上記の二重特異性および多重特異性のヒト抗体で治療する方法も本発明の範囲に含まれる。このような二重特異性分子および多重特異性分子は、CD32(例えば本発明のヒト抗CD32抗体)に対する少なくとも1つの結合特異性、および標的抗原に対する少なくとも1つの結合特異性を含む。別の態様では、抗体は、同じ標的抗原および/または受容体の多様なエピトープに対する抗原結合領域に対する第3の結合特異性を含む。対象における望ましくない細胞、すなわち標的細胞、または抗原を除去する方法は、本発明の二重特異性分子または多重特異性分子で対象を治療する段階を含む。1つの態様では、このような方法は、本発明の二重特異性分子または多重特異性分子を、標的細胞の除去が望ましい対象(例えば腫瘍を有する対象)に投与する段

10

20

30

40

50

階を含む。別の態様では、このような方法は、対象から血液または血液細胞の試料のアリコートを得る段階、エキスピボで血液または血液細胞を、薬学的に許容される担体に含まれる治療的有効用量の本発明の二重特異性抗体または多重特異性抗体で処理する段階、および処理後の血液または血液細胞を対象に戻す段階を含む。好ましくは、血液試料の細胞は単離されて培養物中で増殖される。

【0216】

標的に特異的なエフェクター細胞、例えば、本発明の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性分子、および二重特異性分子)に連結されたエフェクター細胞を治療的薬剤として使用することもできる。標的化するエフェクター細胞は、マクロファージ、好中球、または単球などのヒト白血球の場合がある。望ましいならば、エフェクター細胞は、治療対象から得られる。標的的特異的なエフェクター細胞は、生理学的に許容される溶液中の細胞の懸濁物として投与することができる。投与される細胞の数は $10^8 \sim 10^9$ 個の規模の場合があるが、治療目的に応じて変動する。この量は一般に、標的細胞、例えば対象標的を発現する腫瘍細胞における局在化を可能とするのに十分な量、および例えば食作用によって細胞の死滅を有効とするのに十分な量とする。投与経路もさまざまである。

10

【0217】

標的的特異的なエフェクター細胞による治療は、標的細胞の他の除去手法と併せて実施することができる。例えば、本発明の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性分子、および二重特異性の分子)、および/またはこのような組成物を備えたエフェクター細胞を使用する抗腫瘍療法を、化学療法とともに使用することができる。加えて、併用免疫療法で、2つの異なる細胞障害性エフェクター細胞集団を腫瘍細胞の拒絶に導くことができる。

20

【0218】

本発明の二重特異性分子および多重特異性分子を、細胞表面上の受容体のキャッピングや除去などの方法によって、エフェクター細胞上のFc R11aレベルをモジュレートすることもできる。抗Fc受容体の混合物を、この目的に使用することもできる。

30

【0219】

補体に結合するIgG1、IgG2、もしくはIgG3、またはIgMの一部などの、補体結合部位を有する本発明の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子、ならびに免疫コンジュゲート)を補体の存在下で使用することもできる。1つの態様では、本発明の結合剤および適切なエフェクター細胞による、標的細胞を含む細胞集団のエキスピボ処理に、補体または補体を含む血清を追加することができる。本発明の結合剤でコーティングされた標的細胞の食作用を、補体タンパク質の結合によって改善することができる。別の態様では、本発明の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性分子、および二重特異性分子)でコーティングされた本発明の標的細胞を補体によって溶解することもできる。さらに別の態様では、本発明の組成物は補体を活性化しない。

40

【0220】

本発明の組成物(例えばヒト抗体、多重特異性分子および二重特異性分子、ならびに免疫コンジュゲート)は、補体とともに投与することもできる。したがって、ヒト抗体、多重特異性分子もしくは二重特異性分子、ならびに血清、または補体を含む組成物は、本発明の範囲に含まれる。これらの組成物は、補体が、ヒト抗体、多重特異性分子または二重特異性分子の近位に局在するという点で有用である。または本発明のヒト抗体、多重特異性分子もしくは二重特異性分子、および補体または血清を個別に投与することができる。

【0221】

免疫コンジュゲートの使用と併用療法

既に説明したように、本発明のヒト抗CD32抗体は、1種類または他の複数の治療的薬剤、例えば細胞毒性剤、放射毒性剤、または免疫抑制剤と同時に投与することができる。本発明の抗体は、薬剤(免疫複合体として)に連結可能なほか、対象薬剤と分けて投与することができる。後者の場合(個別の投与の場合)、抗体は対象薬剤の投与の前に、後に、または同時に投与することができるほか、他の既知の療法、例えば抗癌療法や放射線療法と同時に投与することができる。このような治療的薬剤は例えば、単独では、患者において毒

50

性レベルまたは亜毒性レベルにおいてのみ有効なドキソルピシン(アドリアマイシン)、シスプラチン、硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、およびシクロホスファミド、ヒドロキシ尿素などの抗悪性腫瘍剤を含む。シスプラチンは、100 mg/mlの用量を4週間に1回、静脈内に投与され、アドリアマイシンは60~75 mg/mlの用量を21日に1回、静脈内に投与される。

【0222】

1つの態様では、本発明の免疫コンジュゲートは、化合物(例えば治療的薬剤、標識、細胞毒、放射性毒素、免疫抑制剤など)を、このような化合物を抗体に連結させることで、CD32細胞表面受容体を有する細胞に導くために使用可能である。したがって本発明は、CD32を発現する細胞を(例えば、放射性同位元素、蛍光化合物、酵素、または酵素補因子などの検出可能な標識を使用して)エクスピボまたはインピトロで局在化させる方法も提供する。または、本発明の免疫コンジュゲートは、CD32に対する細胞毒または放射性毒素を、例えば(例えば自己免疫障害における)免疫応答を阻害する手段として、CD32を発現する腫瘍細胞に導くことで腫瘍細胞を除去したり、CD32を発現する抗原提示細胞に導くことでAPCを除去することで、CD32細胞表面受容体を有する細胞を死滅させるために使用することができる。

10

【0223】

他の態様では、例えば対象をサイトカインで治療することで、Fc R11a受容体の発現または活性をモジュレートする、例えば促進または阻害する薬剤で、対象を追加的に治療することができる。

20

【0224】

別の態様では、対象はリンホカイン調製物によって追加的に治療される。CD32を高度に発現していない癌細胞は、リンホカイン調製物を使用することで、高度に発現するように誘導することができる。リンホカイン調製物は腫瘍細胞において、より有効な治療につながる可能性のある、CD32のより均一な発現を引き起こすことが可能である。投与に適したリンホカイン調製物は、インターフェロン-、腫瘍壊死因子、およびこれらの組み合わせを含む。これらは静脈内に投与することができる。リンホカインの適切な投与量は10,000~1,000,000単位/患者である。

【0225】

ワクチンの使用

特定の態様では、本発明は、本発明のワクチン組成物を使用して、癌抗原、病原体上に存在する抗原、または病原体が感染した細胞などの抗原に対して対象を免疫化することによって、対象抗原に対する免疫応答を刺激する方法を提供する。このような方法は、薬学的に許容される担体中に含まれる、CD32に対する結合特異性、および病原性感染性生物体のエピトープ、もしくは感染細胞の抗原のエピトープ、もしくは癌細胞のエピトープに対する結合特異性を有する二重特異性抗体または多重特異性抗体を含む組成物を対象に投与する段階を含む(抗原はCD32を発現するAPCに導かれるように、二重特異性分子と複合体を形成する)。または、本発明のワクチン組成物は、病原性感染性生物体の抗原、または感染細胞の抗原、または癌細胞の抗原などの、1種類または複数の対象抗原に連結された抗CD32抗体を含む場合がある。本発明のワクチン組成物は、抗原を抗原提示細胞に導くことで、抗原に対する免疫応答を産生するように抗原提示を高める。

30

40

【0226】

自己免疫疾患の治療

本発明の組成物は、例えば自己免疫疾患などの、CD32を介するか、またはCD32が関与する疾患、例えば液性と細胞性の両方の自己免疫、移植拒絶、または移植片対宿主病(GVHD)の組み合わせを含む自己免疫疾患などの、CD32の発現、典型的には過剰発現を特徴とする疾患を治療するためにインピトロまたはインピボで使用することができる。1つの態様では、本発明の抗体は、CD32に対する天然のリガンドであるIgGの結合部位をブロックすることが可能であり、このため結合が、自己抗体と自己抗原の結合を弱めるか、または防ぐことによって、標的細胞(例えば、特発性血小板減少性紫斑病における血小板、または貧

50

血における赤血球)の食作用を妨げる。本発明の組成物は、CD32を発現する悪性腫瘍、例えば急性白血病、またはマクロファージ、活性化好中球、樹状細胞、もしくはNK細胞が関与する任意の自己免疫疾患を含む、CD32を発現する細胞が関与する任意の疾患を治療するために使用することもできる。このような疾患の例には、自己免疫性溶血性貧血(AIHA)、慢性関節リウマチ(RA)、全身性エリテマトーデス(SLE)、全身性硬化症、アトピー性皮膚炎、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、特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、炎症性腸疾患(IBM; クロウン病、潰瘍性大腸炎、およびセリアック病を含む)、インスリン依存性糖尿病(IDDM)、急性伝染性単核球症、HIV、ヘルペスウイルス関連疾患、多発性硬化症(MS)、溶血性貧血、甲状腺炎、ステイフマン症候群、尋常性天疱瘡、および重症筋無力症(MG)などがあるがこれらに限定されない。

10

【0227】

癌の治療

別の態様では、本発明は、ヒトCD32に起因するか、またはヒトCD32が関与する腫瘍性疾患、例えばホジキン病、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫(ALCL)、皮膚T細胞リンパ腫、結節性小切れ込み細胞性リンパ腫、リンパ性リンパ腫、末梢T細胞リンパ腫、レナートリンパ腫、免疫芽細胞性リンパ腫、T細胞白血病/リンパ腫(ATLL)、成人T細胞白血病(T-ALL)、中心芽細胞性中心細胞性(cb/cc)濾胞性リンパ腫、B細胞性のびまん性大細胞型リンパ腫、血管免疫芽球性リンパ節症(AILD)様T細胞リンパ腫、HIV関連体腔口リンパ腫(body cavity based lymphoma)、胎児性癌、鼻咽頭の未分化癌(例えばシュミンケ腫瘍)、キャッスルマン病、カポジ肉腫、および他のB細胞リンパ腫の治療法または予防法を提供する。この方法は、本発明の抗体組成物を、疾患の治療または予防に有効な量で対象に投与する段階を含む。抗体組成物は単独で投与可能なほか、または、抗体組成物と運動的にまたは相乗的に作用して、CD32が関与する疾患を治療もしくは予防する細胞毒性剤や放射毒性剤などの他の治療的薬剤とともに投与可能である。

20

【0228】

キット

本発明の組成物(例えば抗体、ヒト抗体、免疫コンジュゲート、二重特異性分子、およびワクチンコンジュゲート)、ならびに使用に関する指示書を含むキットも本発明の範囲に含まれる。キットはさらに、免疫抑制性試薬、細胞毒性剤、または放射毒性剤などの1種類もしくは複数の他の試薬、または本発明の1種類もしくは複数の他のヒト抗体(例えば、第1のヒト抗体とは異なるCD32抗原中のエピトープに結合する相補的活性(complementary activity)を有するヒト抗体)を含む場合がある。キットは典型的には、キットの内容物の意図された使用について記したラベルを含む。ラベルという用語は、キット上に、もしくはキットとともに、またはキットに付属する形で提供される、任意の書類または記録媒体を含む。

30

【0229】

本発明をさらに、制限すると解釈されるべきではない以下の実施例によって説明する。全ての図、ならびに本出願で引用された全ての参考文献、特許、および公開された特許出願の内容は、参照により本明細書に明確に組み入れられる。

【0230】

実施例

実施例1: CD32に対するヒトモノクローナル抗体の作製

抗原

ヒト血清アルブミンに結合させたFc RIIa-H131(131位におけるアルギニン(R) ヒスチジン(H)の置換残基を含むFc RIIa)を含む融合タンパク質を免疫化用の抗原として使用した。加えて、Fc RIIa-H131またはFc RIIa-R131(溶媒はPBS)のいずれかをトランスフェクトしたIIA1.6細胞(マウスB細胞リンパ腫のFc 受容体陰性の細胞系列)も後の免疫化に使用した。

40

【0231】

トランスジェニックHuMabマウス

50

ヒトCD32に対する完全ヒトモノクローナル抗体を、ヒト抗体遺伝子を発現するHCo7系列のHuMabトランスジェニックマウスを使用して作製した。このマウス系統では、Chen et al. (1993) EMBO J. 12:811-820に記載されているように、内因性のマウス 軽鎖遺伝子がホモ接合的に破壊されており、およびPCT公報WO01/09187の実施例1に記載されているように、内因性のマウス重鎖遺伝子がホモ接合的に破壊されている。さらに同マウス系統は、Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851に記載されたヒトの 軽鎖導入遺伝子KCo5、ならびに米国特許第5,545,806号；第5,625,825号；および第5,545,807号に記載されたヒトの重鎖導入遺伝子HCo7を有する。

【0232】

HuMabによる免疫化

Fc RIIaに対する完全ヒトモノクローナル抗体を作製するために、完全フロインドアジュバントに溶解した、ヒト血清アルブミンに結合させたFc RIIa-H131 (50 μg)をHuMabマウスの腹腔内に接種し、Fc RIIa-H131またはFc RIIa-R131(溶媒PBS)のいずれかをトランスフェクトしたIIA1.6細胞を複数回接種することで免疫化した。HuMabマウスを対象とした一般的な免疫化のスキームは、Lonberg, N. et al. (1994), Nature 368(6474):856-859; Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14:845-851、およびPCT公報WO 98/24884に記載されている。血漿を抗体力価に関してスクリーニングし、抗CD32ヒト免疫グロブリンの十分な力価を示したマウスを融合用に使用した。

【0233】

対CD32ヒトモノクローナル抗体産生ハイブリドーマの作製

陽性抗体力価を示したマウスを屠殺して、脾細胞をSP2/0ミエローマ細胞と、標準的な実験プロトコルに従って融合させた。結果として得られたハイブリドーマを、ヒトIgG、抗体に対する酵素結合免疫吸着アッセイ法(ELISA)でスクリーニングし、IIA1.6 Fc RIIa-R131細胞およびIIA1.6 Fc RIIa-H131細胞を対象にフローサイトメトリーアッセイ法を行った。ヒト CD32抗体を産生するハイブリドーマを、少なくとも2ラウンドの限界希釈でサブクローニングした。選択されたヒト抗体を、セファロース結合プロテインA(Pharmacia, Uppsala, Sweden)を使用したアフィニティクロマトグラフィーで精製した。フラクションを、4~15% SDS勾配ゲルで電気泳動を行って解析し、クーマシーブリリアントブルーで染色した。タンパク質濃度を、光学的濃度測定法(280 nm)およびPIERCEアッセイ法(Rockford, IL)で決定した。F(ab')₂断片を、ペプシンおよびクエン酸を使用して抗体全体を切断する標準的な方法で作製した(Coligan et al., Current Protocols in Immunology: Wiley & Sons, 2002)。得られた調製物から、残存するFc部分をプロテインA吸着クロマトグラフィーで除去した。F(ab')₂断片をゲル濾過法で精製し、10% SDS-PAGEで確認した。

【0234】

7個のクローンが得られた。ハイブリドーマクローンMDE-8およびMDE-9を、さらなる解析用に選択した。

【0235】

実施例2：ヒト抗CD32モノクローナル抗体の構造解析

MDE-8またはMDE-9モノクローナル抗体の重鎖および軽鎖の可変領域をコードするcDNA配列を、MDE-8およびMDE-9ハイブリドーマから標準的なPCR法で得て、標準的なDNA配列決定法で配列を決定した。

【0236】

MDE-8の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、図1AならびにそれぞれSEQ ID NO: 9および7に示す。

【0237】

MDE-8の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、図1BならびにそれぞれSEQ ID NO: 10および8に示す。

【0238】

MDE-8の重鎖の免疫グロブリン配列と、既知のヒトの生殖系列の免疫グロブリン重鎖配

10

20

30

40

50

列を比較した結果、MDE-8の重鎖が、ヒト生殖系列VH 3-33に由来するVHセグメント、未決定のDセグメント、およびヒト生殖系列JH4bに由来するJHセグメントを使用していることが判明した。MDE-8のVHの配列と、生殖系列のVH 3-33配列のアラインメントを図2に示す。CDR領域決定のKabatシステムを使用したMDE-8のVH配列のさらなる解析の結果、図1Aおよび図2、ならびにそれぞれSEQ ID NO: 1、2、および3に示されるように、重鎖のCDR1領域、CDR2領域、およびCD3領域が判明した。

【0239】

MDE-8の軽鎖の免疫グロブリン配列と、既知のヒト生殖系列の免疫グロブリン軽鎖配列を比較した結果、MDE-8の軽鎖が、ヒト生殖系列Vk L18に由来するVLセグメント、およびヒト生殖系列JK2に由来するJKセグメントを使用していることが判明した。MDE-8のVk配列と、生殖系列のVk L18配列のアラインメントを図3に示す。CDR領域決定のKabatシステムを使用したMDE-8のVk配列のさらなる解析の結果、図1Bおよび図3、ならびにそれぞれSEQ ID NO: 4、5、および6に示されるように、軽鎖のCDR1領域、CDR2領域、およびCD3領域が判明した。

10

【0240】

MDE-9の重鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、図4A、ならびにそれぞれSEQ ID NO: 21および19に示す。

【0241】

MDE-9の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列およびアミノ酸配列を、図4B、ならびにそれぞれSEQ ID NO: 22および20に示す。

20

【0242】

MDE-9の重鎖の免疫グロブリン配列と、既知のヒト生殖系列の免疫グロブリン重鎖配列を比較した結果、MDE-9の重鎖が、ヒト生殖系列VH DP-44に由来するVHセグメント、3-9生殖系列に由来するDセグメント、およびヒト生殖系列JH4bに由来するJHセグメントを使用していることが判明した。MDE-9 VHの配列と、生殖系列のVH DP-44配列のアラインメントを図5に示す。

【0243】

MDE-9の軽鎖の免疫グロブリン配列と、既知のヒト生殖系列の免疫グロブリン軽鎖配列を比較した結果、MDE-9軽鎖が、ヒト生殖系列Vk L15に由来するVKセグメント、およびヒト生殖系列JK4に由来するJKセグメントを使用していることが判明した。MDE-9のVk配列と、生殖系列のVk L15配列のアラインメントを図6に示す。

30

【0244】

実施例3 : MDE-8の結合特性解析

この実施例、および/または実施例4および実施例5では、以下の材料を使用した：

【0245】

細胞

Fc RIIa-R131 (Van Den Herik-Oudijk et al. (1994) J. Immunol. 152:574-585)、II a-H131 (Van Den Herik-Oudijk (1994)、前掲)、Fc 受容体(Morton et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:29781-29787)をトランスフェクトしたIIA1.6細胞、天然の状態Fc RIIaを発現するジャーカット細胞、Fc RIIb1^{*} (Van Den Herik-Oudijk (1994)、前掲)を発現するIIA1.6細胞、ならびにCD20を発現するRaji細胞を、10%熱不活性化ウシ胎児血清(FC S, Hyclone, Logan, UT)、およびペニシリン/ストレプトマイシンが添加されたRPMI 1640培地で培養した。ヒト単球細胞系列THP-1 (American Type Culture Collection, Rockville, MD)を、10% FCSおよびペニシリン/ストレプトマイシンが添加されたRPMI 1640培地(Gibco BRL, Grand Island, NY)で培養した。アロタイプがPCRでFc RIIaであると決定された、健康なドナーに由来する単核細胞(Carlsson et al. (1998) Blood 92:1526-1531)を、ヘパリン化静脈血から、フィコール(Ficoll)-Histopaque(Sigma, St. Louis, MO)密度勾配遠心法で単離した。単離された細胞を2回洗浄し、10% FCSが添加されたRPMI 160培地、または1%ウシ血清アルブミンおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(=免疫蛍光緩衝液、IFB)のいずれかに再懸濁した。

40

50

【 0 2 4 6 】

モノクローナル抗体

Fc RI (CD64)に対するモノクローナル抗体、mAb 22 (mIgG1)、mAb 32 (mIgG1)、およびmAb 197 (mIgG2a)、ならびに抗Fc RIIa mAb IV.3 (mIgG2b)は、Medarex (Annandale, NJ)から入手した。抗Fc RIIa (CD32) mAb Fli8.26 (mIgG1)は、Research Diagnostics (Flanders, NJ)から入手した。抗体Fli8.26およびmAb 32をいずれも直接免疫蛍光染色用のFITC標識IgGとして使用し、mAb 197を、一部の実験でFc RIをブロックするための非標識IgGとして使用した(Pfefferkorn et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:14112-14120)。抗CD20 mAb B1 (Coulter Corporation, Miami, FL)、およびCD16に対するFc受容体抗体Gran-1 (Sanquin, Amsterdam, Netherlands)、およびCD89に対するA77 (Medarex)を結合試験における陽性対照として使用した。mAb 14.1(ヒトIgG1、抗Fc RI)をアイソタイプ対照として使用した(Van Spriël et al. (2002), J. Immunol. 169:3831-3836)。マウスIgG1抗マウス赤血球抗体105-2Hは、Izui博士(Dept. of Pathology, University of Geneva, Geneva, Switzerland)から提供を受けたものであり、de Sa Oliveira et al. (1996) J. Clin. Exp. Immunol. 105:313-320に記載されている。

10

【 0 2 4 7 】

抗体MDE-8の結合特異性を、Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、またはFc RIIb1^{*}、Fc RI (CD64)、Fc RIIa (CD16)、またはFc R (CD89)のいずれかを発現するようにトランスフェクトしたIIA1.6細胞と抗体をインキュベートすることで調べた。MDE-8は、Fc RIIa-H131、Fc RIIa-R131、またはFc RIIb1^{*}をトランスフェクトしたIIA1.6細胞と結合した。Fc RI (CD64)、IIa (CD16)、またはFc R (CD89)を発現するIIA1.6細胞に関しては、結合は認められなかった。これらの結果を図7Aに示す。さらにMDE-8は、ヒト末梢血単球、PMN、血小板、およびB細胞と結合した。

20

【 0 2 4 8 】

発明者らは次に、MDE-8がそのF(ab)部分を介してFc RIIに結合するか否かを評価し、Fc RIとIIaの両方を発現するTHP-1細胞に対する精製F(ab')₂断片の結合を調べた。アッセイ法は、96ウェルの丸底ポリプロピレン製マイクロタイタープレート(Nunc, Roskilde, Denmark)中で、氷上で実施した。10万個のTHP-1細胞を100 μlのIFBに添加した。細胞は、Fc RI-ブロッキングmAb 197 (Pfefferkorn et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:14112-14120)またはMDE-8のF(ab')₂断片とのプレインキュベーションを実施または実施せずに、MDE-8と4 で30分間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、FITC標識ヤギF(ab')₂抗ヒト血清(Jackson, West Grove, PA)とインキュベートした。フローサイトメトリー解析をFAC Scanフローサイトメーター(Becton Dickinson, San Jose, CA)を使用して実施した。図7Bに示す結果から、MDE-8のF(ab')₂断片の結合曲線が、IgG全体に関して得られた結合曲線と似ていることがわかった。Fc RI-ブロッキングmAb 197の存在下における、THP-1細胞に関する結合曲線もほぼ同等であった。ヒト末梢血単球使用時にも同様の結果が得られた。したがってMDE-8はFc RIIと、そのF(ab)部分を介して結合する。

30

【 0 2 4 9 】

Fc RIIに対するMDE-8の結合親和性を決定するために、バイオセンサー(Biosensor)解析を実施した。Biacore 3000 (Biacore, Uppsala, Sweden)による動的解析を、MDE-8 (40 μg/ml)を使用して実施した。10 mM リン酸緩衝液(pH 5.00)に溶解したmAb HSA-Fc RIIa-H131を、製造業者の指示書に従ってCM-5センサーチップに固定化することで親和性を測定した。再生には10 mM グリシン-HCl溶液 pH 2.5を使用した。親和性は、Bia評価で1:1のLangmuir Fitで解析した。MAb MDE-8 IgGはFc RIIaと 9×10^{-9} のK_Dで結合した。

40

【 0 2 5 0 】

発明者らは次に、MDE-8がEA口ゼット形成を阻害する能力を評価した。マウスのIgG1抗グリコホリンmAbで感作した赤血球を使用してFc RIIa結合を調べた(van de Winkel et al. (1989) Scand. J. Immunol. 29:23-31; van de Winkel et al. (1988) J. Immunol. 140:3515-3521)。健康なFc RIIa-R/R131ドナーの単球、またはIIA1.6 Fc RIIa-R131トランスフェクタントを10 μg/mlのMDE-8 IgG、または10 μg/mlのMDE-8 F(ab')₂断片とインキ

50

ュベートした(1時間、4℃)。CD32-ブロッキングmAb IV.3およびhIgG1 CD89 mAb 14.1 (Van Spriël et al. (2002) J. Immunol. 169:3831-3836)を対照として使用した。ヒト赤血球を、FcγRIIIa-R131に選択的に結合するマウスIgG1抗グリコホリンA mAbでオプソニン化した(37℃、30分間)(van de Winkel et al. (1989) 前掲; Braakman et al. (1992) Cell. Immunol. 143:97-107)。単球およびトランスフェクタントを、オプソニン化赤血球と1:5の比でインキュベートした。細胞および赤血球の沈殿を得て(10分間、250 x g)、4℃で1時間インキュベートした。続いて細胞をRPMI 1640培地に再懸濁した。少なくとも3個の結合した赤血球を有することが顕微鏡観察で確認された細胞をEA口ゼットであるとカウントした。EA口ゼットの形成は図8に示すように、MDE-8のIgGとF(ab')₂断片の両方で、mAb IV.3と同等のレベルでブロックすることができた。CD89 IgG1に対する対照のヒトIgG1 mAbは、EA口ゼット形成に作用を及ぼさなかった。

10

【0251】

実施例4：FcRモジュレーションにMDE-8が及ぼす作用

THP-1細胞上および単球上におけるFcγRの発現にMDE-8が及ぼす作用を調べた。THP-1細胞または単球をMDE-8と一晩インキュベートした後に、FcγRIIIaおよびFcγRI(それぞれFII8.26と32.2)のリガンド結合領域の外側で結合する、直接標識したモノクローナル抗体を使用して、FcγRIIIaおよびFcγRI(CD64)の膜発現を評価した(Pfefferkorn et al. (1989) J. Biol. Chem. 264:14112-14120; van de Winkel et al., Leucocyte Typing. Oxford: Oxford University Press, 1995:823-826)。

20

【0252】

アッセイを実施するためにTHP-1細胞を、FcγRIの発現を促進するために、10% FCSおよび組換え型IFN-γ(300 U/ml)(Amgen, Thousand Oaks, CA)が添加されたRPMI 1640培地中で37℃で一晩成長させた(Guyre et al. (1983) J. Clin. Invest. 72:393-397)。細胞をRPMI 1640培地で2回洗浄して2本のチューブに分けた。第1の懸濁物はIFB中で4℃で維持し、第2の懸濁物は37℃でRPMI 1640培地に再懸濁した。異なる濃度の両セットの細胞にMDE-8 IgGを添加して一晩インキュベートした。対照として、CD64を選択的にモジュレートするmAb H22と細胞をインキュベートした(Wallace et al. (1997) J. Leukoc. Biol. 62:469-479)。細胞をIFBで2回洗浄して4℃で保存した。それぞれのリガンド結合領域の外側でFcγRIIIaおよびFcγRIと結合するFITC標識mAb FII8.26およびmAb 32.2を10 μg/mlで添加して、FcγRIIIおよびFcγRIの発現を検出した。フローサイトメトリー解析をFACSスキャンで実施した。IFB中で4℃でインキュベート時の細胞の平均蛍光強度を100%とした。モジュレーションの程度は、Wallace et al. (1997) J. Leukoc. Biol. 62:469-479による試験の場合と同様に、受容体の表面発現の低下率(%)で表した。

30

【0253】

MDE-8 IgGおよびMDE-8のF(ab')₂断片は、THP-1細胞上と、ヒト単球上の両方において、FcγRIIIaの膜発現の60~70%の低下を誘導した(図9A)。特にMDE-8 IgGは、FcγRIの膜発現の~30%の低下も誘導したが、MDE-8のF(ab')₂断片は誘導しなかった(図9B)。この結果は、MDE-8 IgGのFcγテールがFcγRIの表面発現の低下に関与することを意味していた。CD64 mAb H22とのインキュベーションでは、FcγRIIIaの発現に影響は認められなかった(図9C)が、FcγRIの膜発現の~60%の低下が認められた(図9D)。これらのデータは、MDE-8が、食細胞上におけるFcγRIIIaとFcγRIの両方をダウンモジュレートする能力を有することを示していた。図9A~9Dは、THP-1細胞を対象に実施した7回の代表的な実験の結果を示す。

40

【0254】

実施例5：MDE-8による自己免疫性溶血性貧血の予防

MDE-8が動物モデルで自己免疫性溶血性貧血(AIHA)を阻害する能力を検討した。このモデルでは、ヒトFcγRIIIaトランスジェニックマウスをFcR鎖ノックアウト系列(全てのマウス由来の活性化Fcγ受容体を欠く)と交配した(van Vugt et al. (1996) Blood 87:3593-3599; Park et al. (1998) J. Clin. Invest. 102:1229-1238を参照)。これらのマウスにおける唯一の活性化FcγRは、ヒトのFcγRIIIaである(McKenzie et al. (1999) J. Immunol. 162:4311-4318)。

50

【 0 2 5 5 】

これらのマウスで免疫複合体が関与する貧血を誘導するために、mIgG1抗マウス赤血球抗体105.2H (Fossati-Jimack et al. (2000) J. Exp. Med. 191:1293-1302に記載)を使用した。8~12週齢の雌のFc RIIa-Tgマウス、およびFcR 鎖ノックアウトのバックグラウンド(対照)を有する非トランスジェニックマウス(NTg)への、400 µgのmIgG1抗マウス赤血球mAb 105.2Hの腹腔内(IP)への単回注射によって溶血性貧血を誘導した。溶血性貧血は、Fc RIIa-Tgマウスでは効果的に誘導可能であったが、非トランスジェニックマウスでは誘導されなかった。Fc RIIaの遮断に関しては、5 µg/gのMDE-8を静脈内に注射した60分後にmAb 105.2HをIP投与した。対照マウスには、同体積の生理的食塩水(0.9 % NaCl)を注射した。血液試料を眼窩後叢(retroorbital plexus)または尾静脈から毎日(0~8日)得て、ヘパリン処理済みのチューブ内に回収した。Cell-Dyn1700マルチパラメーター血球計数機(Abbott, Abbott Park, IL)を使用して、全血中の赤血球数を測定した。図10に示す結果から、80 µgのMDE-8の単回静脈注射の1時間後にmIgG1 mAb 10.2Hを注入することで、対照(NTg)マウスで観察されるレベルと比較して、溶血性貧血の誘導が効果的にブロックされたことがわかる。

10

【 0 2 5 6 】

実施例6：MDE-9の結合特性解析

この実施例、および/または実施例7、実施例8、および実施例9では、以下の材料および方法を使用した。

【 0 2 5 7 】

モノクローナル抗体

Fc RIIa-R131およびFc RIIbを認識するマウスmAb 41H16 (mIgG2a)は、B. Longenecker博士(Edmonton, Canada)から供与された(Gosselin et al. (1990) J. Immunol. 144:1817-1822)。FITC標識mAb IV.3 (mIgG2b)は、Medarex (Annandale, NJ)から得た。Fc RIIaおよびFc RIIbを認識する抗体AT10 (van den Herik-Oudijk (1995) Leucocyte Typing V, Oxford University Press, Oxford, pp.832-835)はBiosource (Camarillo, CA)から得た。抗体CIKM5およびFLI 8.2は、CD32クラスターワークショップから得た(Ierino et al. (1993) J. Immunol. 150:1794-1803; van de Winkel and Anderson (1995) Leucocyte Typing V, Oxford University Press, Oxford, pp.823-826)。mAb 197(mIgG2a, Medarex)(Vance et al. (1989) J. Immunol. Methods 118:287-296)を一部の試験で、高親和性Fc RI (CD64)に対する抗体の非特異的なFc結合をブロックするために使用した。CD89 mAb 14.1(ヒトIgG1, Medarex)をアイソタイプ対照として使用した(van Spriël et al. (2002) J. Immunol. 169:3831-3836)。

30

【 0 2 5 8 】

細胞

Fc RIIa-R131、IIa-H131 (van den Herik-Oudijk et al. (1994) J. Immunol. 152:574-585)、Fc 受容体I (Morton et al. (1995) J. Biol. Chem. 270:29781-29787)でトランスフェクトしたIIA1.6細胞、Fc RIIaを発現するジャーカット細胞、Fc RIIb1を発現するRMA-s細胞、ならびにCD20を発現するマウスミエローマ細胞系列NS/Oを、10%熱不活性化ウシ胎児血清(FCS, Hyclone, Logan, UT)、およびペニシリン/ストレプトマイシンが添加されたRPMI 1640培地で培養した。

40

【 0 2 5 9 】

抗体の標識

1ミリリットル(1 mg/ml)のmAb MDE-9、および70 µlの1 M炭酸ナトリウム(pH 9.0)を200 µlのFITC (Pierce, Rockford, IL)(1 mg/ml)(溶媒は0.25 M炭酸ナトリウム)とともにインキュベートし、室温で2時間インキュベートした。リン酸緩衝生理食塩水を使用して4で一晩透析することで、標識後のタンパク質から過剰な色素を分離した。

【 0 2 6 0 】

ビオチン化に関しては、MDE-9 (1 M Na₂CO₃中に1 mg/ml)を1 mg/mlのBiotine-X-NHS (Roche, Basel, Switzerland)(溶媒ジメチルホルムアミド; Sigma, St Louis, MO)と室温で

50

3時間インキュベートした。この溶液をPBS(アジ化ナトリウム100 mg/Lを含む)で4 で一晩透析した。

【0261】

モノクローナルAb 41H16 (1 mg/ml)(溶媒0.1 M Na₂CO₃)を、Cy-3二機能性反応性色素(Amersham, London, UK)に、最終的な色素/タンパク質のモル比が8となるように添加し、室温で30分間インキュベートした。標識後のタンパク質から過剰な色素を、Sephadex G-50クロマトグラフィー(Pharmacia)で、溶出にリン酸緩衝生理食塩水(+0.1%アジ化ナトリウム)を使用して分離した。

【0262】

抗体MDE-9の結合特異性を明らかにするために、IIA1.6トランスフェクタントのパネル、ならびにFc RIIa-R/R131ドナーから単離されたPMNおよび単球を使用して結合試験を実施した。細胞を、異なる濃度のmAb MDE-9と4 で30分間インキュベートした。細胞を1% BSAおよび0.02%アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝生理食塩水(=免疫蛍光緩衝液、IFB)で洗浄して再懸濁し、FITC標識ヤギ抗ヒトIgG、を4 で30分間かけて添加してMDE-9結合を検出した。細胞をIFBで洗浄して再懸濁し、FACSCaliburフローサイトメーターを使用したフローサイトメトリーで解析した。図11Aおよび図11Bに示すように、低濃度(<10 μg/ml)では、MDE-9はFc RIIa-H131トランスフェクタントに強く結合したが、Fc RIIa-R131を発現するトランスフェクタント、Fc RIIb^{*}を発現するトランスフェクタント、または非トランスフェクション細胞には強く結合しなかった。図11Cに示すように、MDE-9-FITCは、Fc RIIa-R/R131ドナーの単球およびPMNと比較して、単離された単球、ならびにFc RIIa-H/H131のPMNに対して~10倍の結合選択性を示した。Fc RIIa-R/R131ドナーに対するMDE-9の残存性の結合(residual binding)は、高親和性Fc 受容体であるFc RI(CD64)との結合に起因する可能性がある。というのは、MDE-9はhuIgG1のアイソタイプであるからである。

【0263】

MDE-9のエピトープ結合を調べるために、マウスCD32抗体IV.3、AT10、FL18.2、およびCIKM5を使用してブロッキング試験を実施した。マウスCD32抗体のパネルを最適濃度で、IIA1.6-Fc RIIa-H131細胞と4 で30分間インキュベートした。次にヒトMDE-9(最適結合濃度の~80%)を添加し、懸濁液をさらに4 で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、FITC標識ヤギ抗ヒトIgG1(Southern Biotechnology, Birmingham, AL)を使用してMDE-9結合を検出した。次に細胞をIFBで2回洗浄して再懸濁した。フローサイトメトリー解析を、FACSCaliburフローサイトメーター(Becton Dickinson, San Jose, CA)を使用して実施した。図11Dに示すように、MDE-9とFc RIIa-H131の結合は、Fc RIIaをトランスフェクトした細胞を、いずれもFc RIIaの第2のIg様ドメイン中のエピトープを定義するCD32 mAb IV.3およびAT10とプレインキュベートすることで、ほぼ完全にブロック可能であった。これとは対照的に、第1のIg様ドメイン(FL18.2, CIKM5)に反応するCD32抗体は、MDE-9結合に部分的にのみ影響を及ぼした。Fc RIIa-H131に結合しない41H16を対照に使用しても、MDE-9結合はブロックされなかった。

【0264】

これらのデータからMDE-9が、131位におけるヒスチジンの存在に厳密に依存するFc RIIaの第2のIg様ドメイン内のエピトープに結合することがわかる。

【0265】

実施例7: MDE-9による免疫組織化学法

MDE-9がFc RIIa-H131を認識する能力を、同種骨髄移植後の移植片対宿主病に関する試験の参加者の皮膚生検を使用して免疫組織化学法で調べた。移植片対宿主病を発症しなかった患者の皮膚生検を対象に、MDE-9を使用して、免疫組織化学法でFc RIIaのアロタイプを決定した。PCRによる遺伝子型の決定を比較目的で使用した。

【0266】

免疫組織化学法では、5 μmの凍結切片を作製して、表面処理済みのスライド上にマウントした。一晩乾燥した後に、切片をアセトンで(室温で)固定して風乾した。スライドを

10%正常ヒト血清(NHS)、および10%正常ヤギ血清(溶媒PBS)と20分間ブレインキュベートした後に、1% NHSおよび1%正常ヤギ血清を含む5 μ g/mlのビオチン化MDE-9(溶媒PBS)と室温で60分間インキュベートした。次にスライドをPBS-Tween (0.05%)で3回洗浄し、ストレプトアビジン-ABC-AP (DAKO, Glostrup, Denmark)と30分間インキュベートした。スライドをPBS-Tween (0.05%)で再び洗浄し、0.1 M TRIS/HCl (pH 8.5)で1分間洗浄した。茶色の染色が得られるジアミノベンジジン(Sigma)を基質として使用した。スライドを蒸留水で洗浄後、ヘマトキシリンで1分間、対比染色した。次にスライドを10分間、蒸留水の流水で洗浄し、アクアマウント(aquamount)(Thepen et al. (2000) Nat. Biotechnol. 18:48-51)で包埋した。

【0267】

QIAamp DNA Minikit (Qiagen, Valencia, CA)でヘパリン化全血試料から単離されたゲノムDNAを対象に、Fc RIIaのPCRによる遺伝子型の決定を、Carlsson et al. (1998) Blood 92:1526-1531に記載されたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)ベースの遺伝子型の決定を使用した手順で実施した。配列決定によってアロタイプが決定されたFc RIIa-R/R131、IIa-R/H131、およびIIa-H/H131の個体に由来するDNA試料を内部対照として常に含めた。

【0268】

アロタイプが決定されたFc RIIa-H131ホモ接合性患者(n=2)に由来する皮膚生検は、MDE-9とのインキュベーション時に陽性細胞を示したが、Fc RIIa-R131ホモ接合性患者(n=2)は、バックグラウンドの染色のみを示した。ヘテロ接合性の個体では、Fc RIIa-H131分子の存在が検出された。しかしながら、後者の染色は、Fc RIIa-H/H131ホモ接合性の皮膚生検(n=3)の染色と比較して強度が低かった。

【0269】

これらの実験から、MDE-9が、Fc RIIa-H131を検出する免疫組織化学アッセイ法における使用に適していることがわかった。

【0270】

実施例8：MDE-9を使用する1本のチューブによるFc RIIaアロタイプ決定

この実施例では、フローサイトメトリーによるFc RIIaのアロタイプ決定におけるMDE-9の使用を、ヘパリン化全血、ならびにFITC標識MDE-9およびCy3標識41H16を使用して評価した。ヘパリン化血液を、Fc RIIaのアロタイプ(遺伝子型はPCRおよび配列決定によって決定)が既知の健康なボランティア(n=15)から得た。50 μ lの全血を25 μ lのMDE-9-FITC(最終濃度10 μ g/ μ l)、および25 μ lの41H16-Cy3(最終濃度4 μ g/ml)と室温で30分間インキュベートした。次にFACS溶解溶液(Becton Dickinson)を10分間かけて添加し、細胞をIFBで洗浄して懸濁し、フローサイトメトリー解析を、FACSCaliburフローサイトメーターを使用して実施した。PMNのFITCまたはCy-3による蛍光強度のドットプロットダイアグラムをFc RIIaのアロタイプ決定に使用した。

【0271】

フローサイトメトリーによるFc RIIaのアロタイプ決定の結果は、マッチさせた実験におけるPCRによる遺伝子型決定の結果と完全に一致した。MDE-9抗体は、ヘテロ接合性の個体と比較して、Fc RIIa-H/H131の個体に関して約1.5倍高い平均蛍光強度を示し、ホモ接合性のIIa-R/R131の個体の場合より約7倍高い強度を示した。41H16-Cy3による染色は逆のパターンを示し、IIa-R/R131ホモ接合性の個体で最高の平均蛍光が見られ、IIa-R/H131ヘテロ接合性の個体では中間の平均蛍光が見られ、IIa-H/H131ホモ接合性の個体では低い蛍光強度が見られた。血液試料を室温で一晩保存しても、フローサイトメトリーの結果に影響は認められなかった。

【0272】

これらの実験からMDE-9が、フローサイトメトリーによる1本のチューブによるFc RIIaのアロタイプ決定における使用に適していることがわかった。したがって本発明では、FITC標識Fc RIIa-H131を認識するmAb(MDE-9)とCy-3標識Fc RIIa-R131を認識するmAb (41H16)を組み合わせたフローサイトメトリーによるFc RIIaアロタイプ決定のための迅速なアッセイ法を提供する。フローサイトメトリーで得られたデータは、PCRによる遺伝子型

10

20

30

40

50

決定で得られたデータと完全に相関していた。41H16がFc RIIbに対する結合に寄与しているにもかかわらず、MDE-9の併用は、Fc RIIaのアロタイプ決定に適している。

【0273】

実施例9：mAb MDE-9および41H16を使用する、単球上におけるFc RIIa-H131とFc RIIbの発現レベルの区別

この実施例では、IIa-H/H131ホモ接合性の個体に由来する末梢血単核球上におけるFc RIIa-H131およびFc RIIbの発現レベルを、MDE-9(Fc RIIa-H131に結合する)、ならびに41H16(Fc RIIbおよびFc RIIa-R131に結合し、後者はH/H131ホモ接合性の個体には存在しない)を使用して、細胞のサイトカイン処理を実施または実施せずに調べた。

【0274】

MACS細胞ソーティングでPBMCから非単球を、製造業者の指示書(Myleni Biotec, Bergisch Gladbach, Germany)に従って除去することで単球を精製した。Fc RIIa-H/H131ホモ接合性の健康なドナー(n=7)に由来する単球を、培地のみ、800 U/mlのIFN- (Boehringer Ingelheim, Alkmaar, The Netherlands)が添加された培地、IL-4(200 ng/ml)が添加された培地、またはIL-10(10 ng/ml ; いずれもSigma, Saint Louis, MOから入手)が添加された培地のいずれかと48時間インキュベートした。単球(5 x 10⁵細胞/ウェル)を、1%ペニシリン、硫酸ストレプトマイシン、およびグルタミン、ならびに10%ヒト熱不活性化プールA B⁺血清(Red Cross Blood Transfusion Center, Utrecht, The Netherlands)が添加された総量1 mlのRPMI 1640培地(Gibco Invitrogen, Breda, Netherlands)を含む24ウェルの平底マイクロタイタープレート内で37 でインキュベートした(5% CO₂、加湿空気)。培養後に単球を氷上で回収し、Fc RIIb (mAb 41H16を使用)およびFc RIIa-H131(mAb MDE-9を使用)を染色した。フローサイトメトリー解析を、実施例8に記載された手順で実施した。

【0275】

図12Aに示すように、MDE-9および41H16を利用することで、Fc RIIa-H131 (MDE-9-FITCと結合)およびFc RIIb (41H16-Cy3と結合)の、IIa-H/H131ホモ接合性の個体の末梢血単核球の表面における発現の検出が可能であった。サイトカインによる、単球上におけるFc RIIaおよびFc RIIbの調節に差があることが判明した(図12Bに要約)。Fc RIIa-H131の表面発現は、IFN (-12%)の場合と有意に変わらなかった。対照培養物(n=6)と比較して、IL-4はFc RIIaの発現レベルを阻害した(-61%)が、IL-10は同レベルを有意に促進した(+43%)。Fc RIIb (41H16)の表面発現は、対照培養物と比較してIFN またはIL-4については変わらなかったが、IL-10によって有意に促進された(+74%)。

【0276】

等価物

当業者であれば、常用の実験法で、本明細書に記載された発明の特定の態様の多くの等価物の存在を理解するか、または確認できると思われる。等価物は、添付の特許請求の範囲に含まれることが意図される。

【0277】

参照による引用

本明細書で引用された全ての特許、係属中の特許出願、および他の出版物は、それらの全体が参照により本明細書に組み入れられる。

【0278】

配列表の概要

10

20

30

40

SEQ ID NO:	配列	SEQ ID NO:	配列
1	MDE-8のVH CDR1アミノ酸	13	MDE-9のVH CDR1アミノ酸
2	MDE-8のVH CDR2アミノ酸	14	MDE-9のVH CDR2アミノ酸
3	MDE-8のVH CDR3アミノ酸	15	MDE-9のVH CDR3アミノ酸
4	MDE-8のVK CDR1アミノ酸	16	MDE-9のVK CDR1アミノ酸
5	MDE-8のVK CDR2アミノ酸	17	MDE-9のVK CDR2アミノ酸
6	MDE-8のVK CDR3アミノ酸	18	MDE-9のVK CDR3アミノ酸
7	MDE-8のVHアミノ酸	19	MDE-9のVHアミノ酸
8	MDE-8のVKアミノ酸	20	MDE-9のVKアミノ酸
9	MDE-8のVHヌクレオチド	21	MDE-9のVHヌクレオチド
10	MDE-8のVKヌクレオチド	22	MDE-9のVKヌクレオチド
11	VH 3-33生殖系列アミノ酸	23	VH DP-44生殖系列アミノ酸
12	VK L18生殖系列アミノ酸	24	VK L15生殖系列アミノ酸

10

20

30

40

50

【図面の簡単な説明】

【0279】

【図1A】MDE-8ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 9)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 1)領域、CDR2 (SEQ ID NO: 2)領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 3)領域を示し、ならびにV、D、およびJの生殖系列の由来を示す。

【図1B】MDE-8ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 10)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 8)を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 4)領域、CDR2 (SEQ ID NO: 5)領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 6)領域を示し、ならびにVおよびJの生殖系列の由来を示す。

【図2】MDE-8の重鎖可変領域のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 7)と、ヒト生殖系列のV_H 3-33のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 11)のアラインメントを示す。

【図3】MDE-8の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 8)と、ヒト生殖系列のV_K L18のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 12)のアラインメントを示す。

【図4A】MDE-9ヒトモノクローナル抗体の重鎖可変領域のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 21)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 19)を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 13)領域、CDR2 (SEQ ID NO: 14)領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 15)領域を示し、ならびにV、D、およびJの生殖系列の由来を示す。

【図4B】MDE-9ヒトモノクローナル抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列(SEQ ID NO: 22)およびアミノ酸配列(SEQ ID NO: 20)を示す。CDR1 (SEQ ID NO: 16)領域、CDR2 (SEQ ID NO: 17)領域、およびCDR3 (SEQ ID NO: 18)領域を示し、ならびにVおよびJの生殖系列の由来を示す。

【図5】MDE-9の重鎖可変領域のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 19)と、ヒト生殖系列のV_H DP-44のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 23)のアラインメントを示す。

【図6】MDE-9の軽鎖可変領域のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 20)と、ヒト生殖系列Vk L15のアミノ酸配列(SEQ ID NO: 24)のアラインメントを示す。

【図7A】(Fc RIIa-R131、Fc RIIa-H131、Fc RIIb1^{*}、CD64、CD16A、CD89、またはCD20のいずれかを発現する)トランスフェクトされた細胞のパネルに対するMDE-8の結合を示すグラフである。フローサイトメトリーで決定されたデータを平均蛍光強度で表す。MDE-8を黒いバーで示す。白いバーは、正の対照であるmAb (CD32 (Fc RIIa)の場合はmAb IV.3、CD32 (Fc RIIaおよびb)の場合はmAb AT10、CD64の場合はmAb H22、CD16の場合はmAb Gran-1、CD89の場合はmAb A77、CD20の場合はmAb B1)の結合を示す。

【図7B】MDE-8がF(ab)部分を介してFc RIIaと結合することを示す、Fc RIおよびFc RIIaを発現する単球細胞系THP-1に対するMDE-8の結合を示すグラフである。THP-1に対するMDE-8のIgGの結合()、Fc RIブロッキングmAb 197の存在下におけるMDE-8のIgGの結合()、またはMDE-8のF(ab')₂断片の結合()を示す。データは、同様の結果が得られた5回の実験の代表である。

【図8】MDE-8が、ヒト赤血球上のEA口ゼット形成を阻害することを示すグラフである。ヒト単球を白いバーで示し、Fc RIIaでトランスフェクトしたIIA1.6細胞を灰色のバーで示す。負の対照は、PBSおよびヒトIgG1 CD89抗体とした。正の対照は、CD32ブロッキングmAb IV.3とした。データは、本質的に同一の結果が得られた3回の個別の実験の代表である。

【図9】図9A~9Dは、HuMAb MDE-8が細胞表面におけるFc RIIaの発現を下方調節することを示すグラフである。THP-1細胞を異なる濃度のMDE-8 IgG()、またはMDE-8のF(ab')₂断片()と一晩インキュベートした。対照として、細胞をヒト化CD64 mAb H22(黒色の菱形)とインキュベートした。Fc RIIaの発現は、FITC標識mAb Fli8.26を使用して翌日に評価した(図9Aおよび図9C)。Fc RIの発現は、FITC標識CD64 mAb 32.2を使用して評価した(図9Bおよび図9D)。非処理細胞上におけるFc RIIaおよびFc RIのレベルを100%とした。モジュレーションを、受容体発現の低下率(%)で示した。データは、別の日に実施した5回の個別の実験で得られた平均±SDで示す。

【図10】HuMAb MDE-8が、マウスモデルにおける自己免疫性溶血性貧血の発を阻害することを示すグラフである。8週齢の雌のFc RIIaトランスジェニックマウスまたはNTgマウス(対照)の静脈内にMDE-8(5 μg/g)または生理食塩水(対照)を投与した。60分後に、mIgG1抗マウス赤血球抗体105.2Hを腹腔内に投与した。さまざまな時点における赤血球数を、Ce II-Dyne 1700マルチパラメーター血球計数機を使用して決定した。データは、4匹のマウスで得られた値の平均を示す。*^{*}P < 0.01、*P < 0.05。

【図11】図11A~11Dは、HuMAb MDE-9の結合特性を示すグラフである。図11Aでは、Fc RIIa-R131またはIIa-H131をトランスフェクトしたIIA1.6細胞を、異なる濃度のmAb MDE-9、CD32 mAb IV.3-FITC(正の対照)、またはhuIgG1 CD89 mAb(アイソタイプ対照)とインキュベートした。MDE-9の結合を、FITC標識ヤギ抗ヒトIgG- を使用して判定した。データをフローサイトメトリーで解析し、同様の結果を示した5回の独立した実験を示す。図11Bでは、MDE-9-FITC (10 μg/ml)の結合をIIA1.6トランスフェクタントを対象に評価した。図11Cでは、MDE-9-FITC (10 μg/ml)の結合を、健康ボランティアから単離されたPMNおよび単球を対象に、Fc RIIa-R/R131またはFc RIIa-H/H131アロタイプのいずれかを使用して評価した。図11Dでは、IIA1.6 IIa-H131トランスフェクタントを、図の下に示すようにFITC標識マウスのCD32抗体と、さらに続けてMDE-9(10 μg/ml)とプレインキュベートした。MDE-9結合は、FITC標識ヤギ抗ヒトIgG- を使用して検出した(n=5)。

【図12】図12A~12Bは、mAb MDE-9および41H16を使用して、末梢血単核球上にFc RIIaおよびFc IIbが検出されたことを示すグラフである。図12Aは、Fc RIIaおよびFc IIbのH/H131ドナーの末梢血単核球上における発現を示す(灰色の点: PMN、黒色の点: 単球およびリンパ球)。図12Bでは、Fc RIIa-H/H131ドナー(n=6)の単球を次に、炎症促進性サイトカイン(IFN-)、および抗炎症性サイトカイン(IL-4またはIL-10)と48時間インキュベートした。阻害性のFc RIIb (mAb 41H16)および活性性のFc RIIa-H131 (mAb MDE9)の相対平均蛍光強度(MFI)を、培地のみで培養した単球上における発現レベル(100%と設定、点

10

20

30

40

50

線)に対するパーセンテージで示す。平均値 ±SDを示す。星印(*)は、培地のみの培養時と比較して変化が有意であることを意味する。

【 図 1 A 】

抗CD32 MDE-8 VH

Vセグメント: 3-33
Dセグメント: 未決定
Jセグメント: JH4b

1 Q V H L V E S G G G V V Q P G R S L
CAG GTG CAC CTG GTG GAG TCT GGG GGA GGC GTG GTC CAG CCT GGG AGG TCC CTG
CDR1

55 R L S C A A S G F T F S S Y G M H W
AGA CTC TCC TGT GCA GCG TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT GGC ATG CAC TGG
CDR2

109 V R Q A P G K G L E W V A V I W Y D
GTC CGC CAG GCT CCA GGC AAG GGG CTG GAG TGG GTG GCA GTT ATA TGG TAT GAT
CDR2

163 G S N Y Y T D S V K G R F T I S R
GGA AGT AAT TAC TAT ACA GAC TCC GTG AAG GGC CGA TTC ACC ATC TCC AGA

217 D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D
GAC AAT TCC AAG AAC ACG CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC CTG AGA GGC GAG GAC
CDR3

271 T A V Y Y C A R D L G A A A S D Y W
ACG GCT GTG TAT TGT GCG AGA GAT CTG GGG GCA GCA GCT TCT GAC TAC TGG

325 G Q G T L V T V S S
GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

【 図 1 B 】

抗CD32 MDE-8 VK

Vセグメント: L18
Jセグメント: JK2

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D R
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC AGA
CDR1

55 V T I T C R A S Q G I N S A L A W Y
GTC ACC ATC ACT TGC GGG GCA AGT CAG GGC ATT AAC AGT GCT TTA GCC TGG TAT
CDR2

109 Q O K P G K A P K L L I Y D A S S L
CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC TCC AGT TTG
CDR2

163 E S G V P S R F S G S G S G T D F T
GAA AGT GGG GTC CCA TCA AGG TTC AGC GGC AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT
CDR2

217 L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q O
CTC ACC ATC AGC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT TAT TAC TGT CAA CAG
CDR3

271 F N S Y P H T F G Q G T K L E I K
TTT AAT AGT TAC CCT CAT ACT TTT GGC CAG GGG ACC AAG CTG GAG ATC AAA

【 図 5 】

抗CD32 MDE-9 VH領域

```

DP-44 生種系列  E V Q L V Q S G G G L V H P G G S L R L S C A G S G F T F S S Y A M H M W V R
MDE-9 VH          - - - - - I - L - - - - - A - - - - - S T - - - - - I -
                    CDR1

DP-44 生種系列  Q A P G K G L E W V S A I G T G G G T Y Y A D S V K G R F T I S R D N A K N
MDE-9 VH          - - - - - I - L - - - - - S - - - - - I - G - - - - - I - - - - -
                    CDR2

DP-44 生種系列  S L Y L Q M N S L R A E D M A V Y Y C A R
MDE-9 VH          - - - - - V - - - - - G Y F D W V D Y F D Y W G G G T L
                    CDR3

MDE-9 VH          V T V S S
    
```

【 図 6 】

抗CD32 MDE-9 VK領域

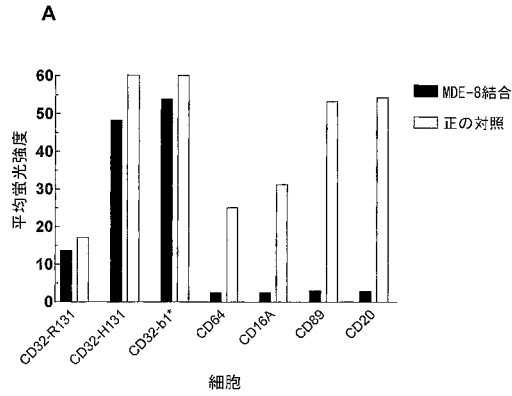
```

L15 生種系列  D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q G I S S W L A W Y
MDE-9 VK      - - - - - CDR1

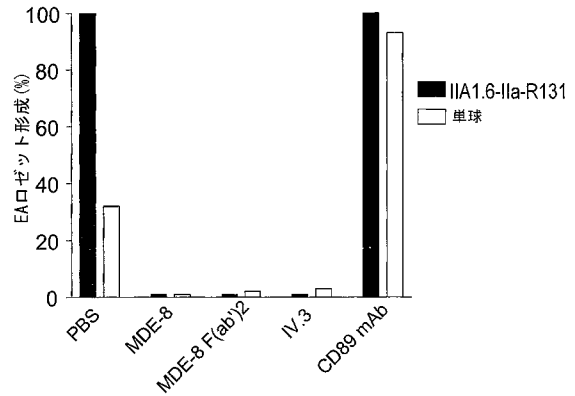
L15 生種系列  Q Q K P E K A P K S L I Y A A S S L Q S G V P S R F S G S G S G T D F T
MDE-9 VK      - - - - - CDR2

L15 生種系列  L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y N S Y P P
MDE-9 VK      - - - - - CDR3
                    T F G G G T K V E I K
    
```

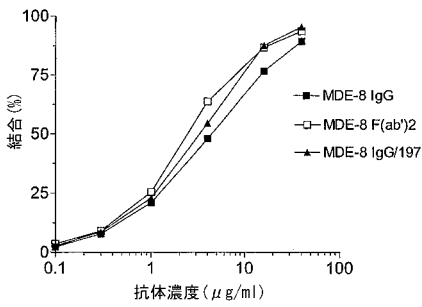
【 図 7 】



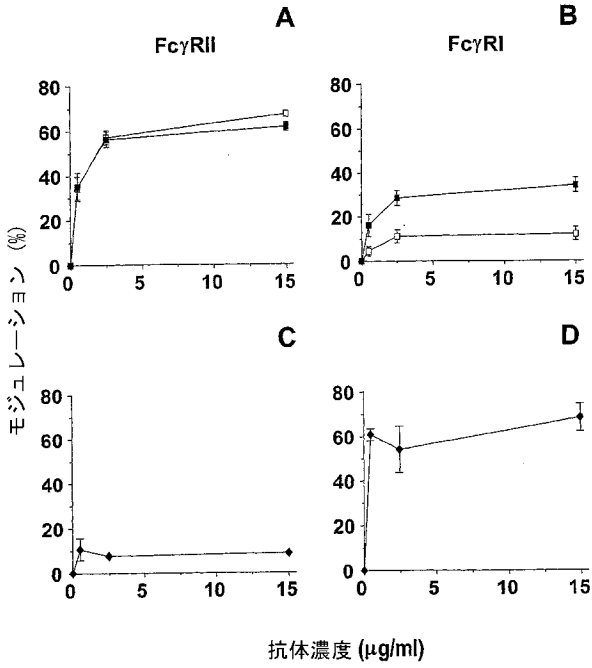
【 図 8 】



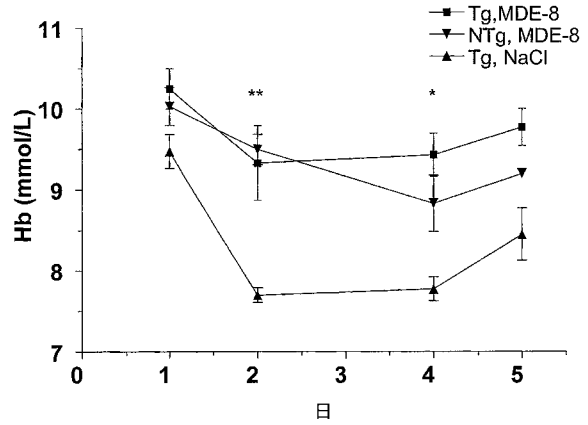
B



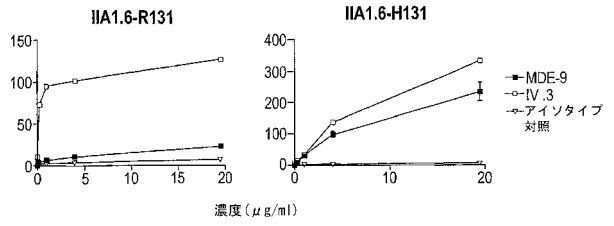
【 図 9 】



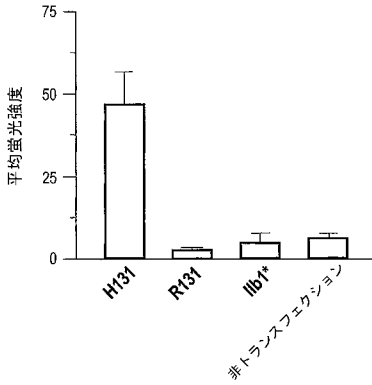
【 図 10 】



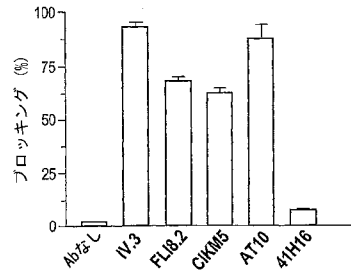
【 図 11 A 】



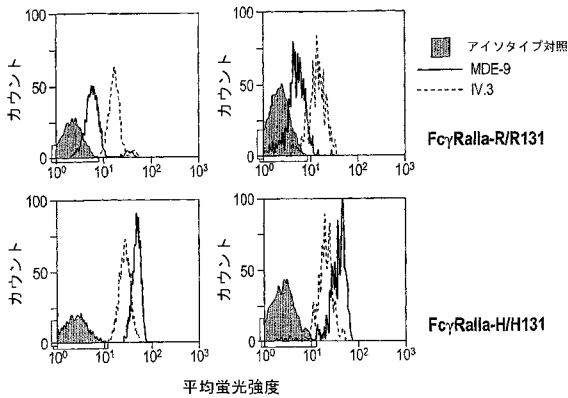
【 図 11 B 】



【 図 11 D 】

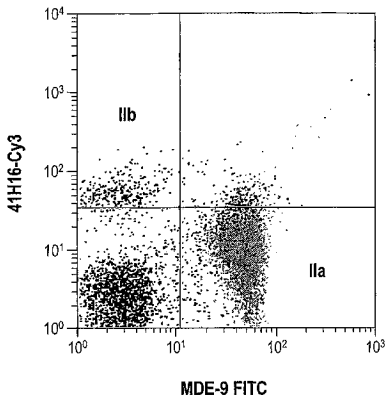


【 図 11 C 】

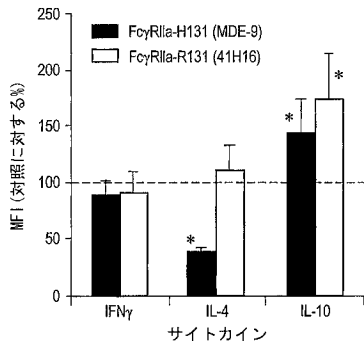


【 図 1 2 】

A



B



【 配 列 表 】

2008516586000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/035055

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61P31/04		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data bases consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, Sequence Search		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	VELY F ET AL: "A NEW SET OF MONOCLONAL ANTIBODIES AGAINST HUMAN FCGAMMARII (CD32) AND FCGAMMARIII (CD16): CHARACTERIZATION AND USE IN VARIOUS ASSAYS" HYBRIDOMA, LIEBERT, NEW YORK, NY, US, vol. 16, no. 6, 1997, pages 519-528, XP009046827 ISSN: 0272-457X abstract -/-	1-62
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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.</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 23 February 2007		Date of mailing of the international search report 09/03/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 6818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 851 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Rankin, Robert

6

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

60700540032
page 1 of 2
09. 8. 2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/035055

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>WARMERDAM P A M ET AL: "A SINGLE AMINO ACID IN THE SECOND Iγ-LIKE DOMAIN OF THE HUMAN FC-GAMMA RECEPTOR II IS CRITICAL FOR HUMAN IGG2 BINDING" JOURNAL OF IMMUNOLOGY, THE WILLIAMS AND WILKINS CO. BALTIMORE, US, vol. 147, no. 4, 1991, pages 1338-1343, XP002361202 ISSN: 0022-1767 abstract</p>	1-62
X	<p>TUIJNAM WB ET AL: "Human low-affinity Igg receptor FcγRIIa (CD32) introduced into mouse fibroblasts mediates phagocytosis of sensitized erythrocytes" BLOOD, W.B. SAUNDERS, PHILADELPHIA, VA, US, vol. 79, no. 7, 1 April 1992 (1992-04-01), pages 1651-1656, XP002107228 ISSN: 0006-4971 the whole document</p>	1-62
X	<p>US 2003/119071 A1 (WOGNUM ALBERTUS WERNERUS [CA] ET AL) 26 June 2003 (2003-06-26) paragraph [0006] - paragraph [0007] claims; examples</p>	1-62
A	<p>WO 2004/016750 A2 (MACROGENICS INC [US]; KOENIG SCOTT [US]; VERI MARIA-CONCETTA [US]) 26 February 2004 (2004-02-26) page 2, line 5 - line 24 page 12, line 1 - line 11 claims; examples</p>	1-62
P,A	<p>VAN ROYEN-KERKHOFF ANNET ET AL: "A novel human CD32 mAb blocks experimental immune haemolytic anaemia in Fc gamma RIIA transgenic mice" BRITISH JOURNAL OF HAEMATOLOGY, vol. 130, no. 1, July 2005 (2005-07), pages 130-137, XP002413809 ISSN: 0007-1048 the whole document</p>	1-62

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2005/035055**Box 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:
Although claims 58-61 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
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 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:

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 an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/035055

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2003119071 A1	26-06-2003	US 2007026468 A1	01-02-2007
WO 2004016750 A2	26-02-2004	AU 2003262650 A1	03-03-2004
		CA 2495251 A1	26-02-2004
		EP 1534335 A2	01-06-2005
		JP 2006506977 T	02-03-2006

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード(参考)
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	4 C 0 8 5
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 A	4 H 0 4 5
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 N	5/00 B	
A 0 1 K	67/027 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 0 1 K	67/027	
A 6 1 P	7/06 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 U	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 K	39/12 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	39/02 (2006.01)	A 6 1 K	39/395 Y	
A 6 1 K	39/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/12	
A 6 1 K	51/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/02	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 K	39/00 H	
G 0 1 N	33/543 (2006.01)	A 6 1 K	43/00	
G 0 1 N	33/48 (2006.01)	G 0 1 N	33/53 N	
		G 0 1 N	33/543 5 9 7	
		G 0 1 N	33/53 Y	
		G 0 1 N	33/48 P	

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

(72)発明者 ヴァン ダイク マーカス アントニウス
オランダ王国 ビルソーベン ガーイラーン 1 6

(72)発明者 ジェリッツェン アルノート エフ.
オランダ王国 ブニック ホエンダーコパーショーク 3 1

Fターム(参考) 2G045 BB03 BB20 BB25 CB21 DA20 DA36 DA37 DA78 FA37
4B024 AA01 AA15 BA53 CA02 CA07 DA02 EA04 HA01 HA15
4B064 AG27 CA01 CA10 CA19 CA20 CC24 DA01 DA13
4B065 AA01X AA72X AA90X AA90Y AB01 AB04 AC14 BA02 CA25 CA44
CA46
4C084 AA12 AA17 NA14 ZA552 ZB072
4C085 AA14 AA21 BA07 BA51 BB07 CC05
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 BA41 BA71 BA72 CA40 DA76 EA22
EA54 FA72 FA74

专利名称(译)	针对Fcγ受体II (CD32) 的人单克隆抗体		
公开(公告)号	JP2008516586A	公开(公告)日	2008-05-22
申请号	JP2007534766	申请日	2005-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	米德列斯公司		
申请(专利权)人(译)	Medarex股份有限公司Retiddo		
[标]发明人	ヴァンデウインケルジャンジー ヴァンダイクマーカスアントニウス ジェリッツエンアルノートエフ		
发明人	ヴァン デ ウィンケル ジャン ジー. ジェイ. ヴァン ダイク マーカス アントニウス ジェリッツエン アルノート エフ.		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/10 C12P21/08 A01K67/027 A61K39/395 A61P7/06 A61K45/00 A61K39/12 A61K39/02 A61K39/00 A61K51/00 G01N33/53 G01N33 /543 G01N33/48		
CPC分类号	A01K2267/01 A61P7/06 A61P37/00 C07K16/283 C07K2317/21 C07K2317/34 C07K2317/54 C07K2317 /56 C07K2317/565 C07K2317/76 C07K2317/92 C07K2319/31 G01N33/564 G01N2333/70535 Y02A50 /58		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C07K16/28 C07K16/46 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12N5/00.A C12N5/00.B C12P21/08 A01K67/027 A61K39/395.U A61P7/06 A61K45/00 A61K39/395.Y A61K39/12 A61K39/02 A61K39/00.H A61K43/00 G01N33/53.N G01N33/543.597 G01N33/53.Y G01N33/48.P		
F-TERM分类号	2G045/BB03 2G045/BB20 2G045/BB25 2G045/CB21 2G045/DA20 2G045/DA36 2G045/DA37 2G045 /DA78 2G045/FA37 4B024/AA01 4B024/AA15 4B024/BA53 4B024/CA02 4B024/CA07 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/HA01 4B024/HA15 4B064/AG27 4B064/CA01 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064 /CA20 4B064/CC24 4B064/DA01 4B064/DA13 4B065/AA01X 4B065/AA72X 4B065/AA90X 4B065 /AA90Y 4B065/AB01 4B065/AB04 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C084/AA12 4C084/AA17 4C084/NA14 4C084/ZA552 4C084/ZB072 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085 /BA07 4C085/BA51 4C085/BB07 4C085/CC05 4H045/AA10 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/BA71 4H045/BA72 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA22 4H045/EA54 4H045 /FA72 4H045/FA74		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/615429 2004-09-30 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及以高亲和力结合CD32并抑制与配体结合，下调CD32表面表达，或特异性结合FcγRIIa-H131同种异型但与FcγRIIa-R131同种异型结合的方法。特别是人抗体，其具有特定的功能特性，例如彼此不结合。还提供了编码本发明抗体的核酸分子，表达载体，宿主细胞和表达本发明抗体的方法。还提供了药物组合物，其包含免疫缀合物，双特异性分子，疫苗缀合物和本发明的抗体。本发明涉及检测CD32的方法，特别是用于检测FcγRIIa-H131同种异型的方法，使用本发明的抗体的治疗方法，例如用于治疗自身免疫性溶血性贫血，同样。

SEQ ID NO:	配列	SEQ ID NO:	配列
1	MDE-8のVH CDR1アミノ酸	13	MDE-9のVH CDR1アミノ酸
2	MDE-8のVH CDR2アミノ酸	14	MDE-9のVH CDR2アミノ酸
3	MDE-8のVH CDR3アミノ酸	15	MDE-9のVH CDR3アミノ酸
4	MDE-8のVK CDR1アミノ酸	16	MDE-9のVK CDR1アミノ酸
5	MDE-8のVK CDR2アミノ酸	17	MDE-9のVK CDR2アミノ酸
6	MDE-8のVK CDR3アミノ酸	18	MDE-9のVK CDR3アミノ酸
7	MDE-8のVHアミノ酸	19	MDE-9のVHアミノ酸
8	MDE-8のVKアミノ酸	20	MDE-9のVKアミノ酸
9	MDE-8のVHヌクレオチド	21	MDE-9のVHヌクレオチド
10	MDE-8のVKヌクレオチド	22	MDE-9のVKヌクレオチド
11	VH 3-33生殖系列アミノ酸	23	VH DP-44生殖系列アミノ酸
12	VK L18生殖系列アミノ酸	24	VK L15生殖系列アミノ酸

【図面の簡単な説明】