

(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2006-505277

(P2006-505277A)

(43) 公表日 平成18年2月16日(2006.2.16)

(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 4 B O 2 4
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D 4 B O 6 4
A 6 1 K 47/48 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T 4 B O 6 5
A 6 1 K 49/00 (2006.01)	A 6 1 K 47/48	4 C O 7 6
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 49/00	A 4 C O 8 4
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 88 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2004-551530 (P2004-551530)	(71) 出願人	504039155
(86) (22) 出願日	平成15年11月5日 (2003. 11. 5)		イミュノジェン・インコーポレーテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年6月24日 (2005. 6. 24)		アメリカ合衆国マサチューセッツ州O 2 1
(86) 国際出願番号	PCT/US2003/032737		3 9 - 4 2 3 9, ケンブリッジ, シドニー
(87) 国際公開番号	W02004/043344		・ストリート 1 2 8
(87) 国際公開日	平成16年5月27日 (2004. 5. 27)	(74) 代理人	100089705
(31) 優先権主張番号	60/424, 332		弁理士 社本 一夫
(32) 優先日	平成14年11月7日 (2002. 11. 7)	(74) 代理人	100076691
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 増井 忠武
		(74) 代理人	100075270
			弁理士 小林 泰
		(74) 代理人	100080137
			弁理士 千葉 昭男
		(74) 代理人	100096013
			弁理士 富田 博行
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 抗CD33抗体、及びそれを用いた急性骨髄性白血病の治療方法

(57) 【要約】

本発明は、CD33と結合する抗体に関するものである。より詳細には、本発明は、抗CD33抗体、前記抗体のフラグメント及びホモログ、前記抗体のヒト化及び表面再構築化型、前記抗体の機能的等価物及び改良型、免疫複合体、及び前記抗体を含む組成物、ならびに、診断、研究及び治療への適用におけるそれらの使用に関するものである。本発明はまた、該抗体をコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、該ポリヌクレオチドを用いて形質転換された宿主細胞、及び抗体の産生方法に関するものである。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

配列番号 1 ～ 6 :

S Y Y I H (配列番号 1)、

V I Y P G N D D I S Y N Q K F X G (配列番号 2)、ここで X は K または Q である、

E V R L R Y F D V (配列番号 3)、

K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A (配列番号 4)、

W A S T R E S (配列番号 5)、

H Q Y L S S R T (配列番号 6)、

からなる群より選択されたアミノ酸配列を有する、少なくとも 1 つの相補性決定領域を含み、そして C D 3 3 への結合能を有する、単離された抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。 10

【請求項 2】

少なくとも 1 つの重鎖可変領域及び少なくとも 1 つの軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、配列番号 1 ～ 3 :

S Y Y I H (配列番号 1)、

V I Y P G N D D I S Y N Q K F X G (配列番号 2)、ここで X は K または Q である、

E V R L R Y F D V (配列番号 3)、

によってそれぞれ表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含み、そして前記軽鎖可変領域が、配列番号 4 ～ 6 :

K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A (配列番号 4)、

W A S T R E S (配列番号 5)、

H Q Y L S S R T (配列番号 6)、

によってそれぞれ表されるアミノ酸配列を有する 3 つの相補性決定領域を含む、抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。 20

【請求項 3】

前記重鎖可変領域が、配列番号 7 :

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G A G T T V T V S S 30

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有する、請求項 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 4】

前記重鎖可変領域が、配列番号 7 :

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G A G T T V T V S S

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも 95 % の配列同一性を有する、請求項 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 5】

前記重鎖可変領域が、配列番号 7 :

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G A G T T V T V S S

によって表されるアミノ酸配列を有する、請求項 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。 40

【請求項 6】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 8 :

N I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L 50

T I S S V Q S E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G G G T K L E I K R

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項7】

前記軽鎖可変領域が、配列番号8：

N I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q S E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G G G T K L E I K R

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する、請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

10

【請求項8】

前記軽鎖可変領域が、配列番号8：

N I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q S E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G G G T K L E I K R

によって表されるアミノ酸配列を有する、請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項9】

前記重鎖可変領域が、配列番号9：

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F Q G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G Q G T T V T V S S

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

20

【請求項10】

前記重鎖可変領域が、配列番号9：

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F Q G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G Q G T T V T V S S

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有する、請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

30

【請求項11】

前記重鎖可変領域が、配列番号9：

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F Q G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G Q G T T V T V S S

によって表されるアミノ酸配列を有する、請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項12】

前記軽鎖可変領域が、配列番号10：

E I V L T Q S P G S L A V S P G E R V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P R L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q P E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G Q G T K L E I K R

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を有する、請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

40

【請求項13】

前記軽鎖可変領域が、配列番号10：

E I V L T Q S P G S L A V S P G E R V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P R L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q P E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G Q G T K L E I K R

50

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも 95% の配列同一性を有する、請求項 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 14】

前記軽鎖可変領域が、配列番号 10：

E I V L T Q S P G S L A V S P G E R V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P R L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q P E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G Q G T K L E I K R

によって表されるアミノ酸配列を有する、請求項 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 15】

C D 33 と特異的に結合する、精製抗体またはそのエピトープ結合フラグメントであって、前記抗体またはエピトープ結合フラグメントの重鎖可変領域の一部が、配列番号 7：

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G A G T T V T V S S

によって表されるアミノ酸配列を有し、そして前記抗体またはエピトープ結合フラグメントの軽鎖可変領域の一部が、配列番号 8：

N I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q S E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G G G T K L E I K R

によって表されるアミノ酸配列を有する、前記精製抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 16】

C D 33 と特異的に結合する、ヒト化もしくは表面再構築化された抗体またはそのエピトープ結合フラグメントであって、前記抗体またはエピトープ結合フラグメントの重鎖可変領域の一部が、配列番号 9：

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F Q G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G Q G T T V T V S S

によって表されるアミノ酸配列を有し、そして前記抗体またはエピトープ結合フラグメントの軽鎖可変領域の一部が、配列番号 10：

E I V L T Q S P G S L A V S P G E R V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P R L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q P E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G Q G T K L E I K R

によって表されるアミノ酸配列を有する、前記ヒト化もしくは表面再構築化された抗体またはそのエピトープ結合フラグメント。

【請求項 17】

薬物またはプロドラッグに連結した、請求項 1 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを含む、免疫複合体。

【請求項 18】

薬物またはプロドラッグに連結した、請求項 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを含む、免疫複合体。

【請求項 19】

前記薬物またはプロドラッグが、メイタンシノイド、タキソイド、C C-1065、C C-1065 アナログ、ドラスタチン、ドラスタチンアナログ、メトトレキサート、ダウノルビシン、ドキシルビシン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、メルファラン、マイトマイシン C、クロラムブシル、カリケアマイシン、及びその誘導体からなる群より選択される、請求項 17 に記載の免疫複合体。

【請求項 20】

前記薬物またはプロドラッグが、メイタンシノイド、タキソイド、CC-1065、CC-1065アナログ、ドラスタチン、ドラスタチンアナログ、メトトレキサート、ダウノルビシン、ドキシルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、カリケマイシン、及びその誘導体からなる群より選択される、請求項18に記載の免疫複合体。

【請求項21】

請求項1に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント、及び、薬物またはプロドラッグを含む、組成物。

【請求項22】

請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント、及び、薬物またはプロドラッグを含む、組成物。 10

【請求項23】

請求項1に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント、及び医薬的に許容可能な剤を含む、医薬組成物。

【請求項24】

請求項2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント、及び医薬的に許容可能な剤を含む、医薬組成物。

【請求項25】

請求項17に記載の免疫複合体及び医薬的に許容可能な剤を含む、医薬組成物。

【請求項26】

請求項18に記載の免疫複合体及び医薬的に許容可能な剤を含む、医薬組成物。 20

【請求項27】

請求項21に記載の組成物及び医薬的に許容可能な剤を含む、医薬組成物。

【請求項28】

請求項22に記載の組成物及び医薬的に許容可能な剤を含む、医薬組成物。

【請求項29】

前記抗体または抗体フラグメントが標識された、請求項1に記載の抗体を含む診断試薬。

【請求項30】

前記抗体または抗体フラグメントが標識された、請求項2に記載の抗体を含む診断試薬。 30

【請求項31】

前記標識が、ビオチン標識、酵素標識、放射性標識、フルオロフォア、クロモフォア、造影剤及び金属イオンからなる群より選択される、請求項29に記載の診断試薬。

【請求項32】

前記標識が、ビオチン標識、酵素標識、放射性標識、フルオロフォア、クロモフォア、造影剤及び金属イオンからなる群より選択される、請求項30に記載の診断試薬。

【請求項33】

CD33を発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞を請求項1または2に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントと接触させることを含む、前記方法。 40

【請求項34】

CD33を発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞を請求項17または18に記載の免疫複合体と接触させることを含む、前記方法。

【請求項35】

CD33を発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞を請求項21または22に記載の組成物と接触させることを含む、前記方法。

【請求項36】

CD33を発現する細胞の増殖を阻害する方法であって、前記細胞を請求項23～28から選択される医薬組成物と接触させることを含む、前記方法。 50

【請求項 37】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体に請求項 1 または 2 に記載の抗体またはエピトープ結合フラグメントの有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 38】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体に請求項 1 7 または 1 8 に記載の免疫複合体の有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 39】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体に請求項 2 1 または 2 2 に記載の組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

10

【請求項 40】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体に請求項 2 3 または 2 4 の医薬組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 41】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体に請求項 2 5 または 2 6 に記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 42】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体に請求項 2 7 または 2 8 に記載の医薬組成物の有効量を投与することを含む、前記方法。

【請求項 43】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体の 1 またはそれより多くの細胞を、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの有効量と *ex vivo* で接触させることを含む、前記方法。

20

【請求項 44】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体の 1 またはそれより多くの細胞を、請求項 1 7 または 1 8 に記載の免疫複合体の有効量と *ex vivo* で接触させることを含む、前記方法。

【請求項 45】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体の 1 またはそれより多くの細胞を、請求項 2 1 または 2 2 に記載の組成物の有効量と *ex vivo* で接触させることを含む、前記方法。

30

【請求項 46】

C D 3 3 を発現している疾患を有する個体を治療する方法であって、前記個体の 1 またはそれより多くの細胞を、請求項 2 3 ～ 2 8 から選択される医薬組成物の有効量と *ex vivo* で接触させることを含む、前記方法。

【請求項 47】

前記疾患が、骨髄異形成症候群 (MDS)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML) 及び前骨髄球性白血病 (PML) からなる群より選択される疾患である、請求項 3 7 に記載の治療方法。

【請求項 48】

前記疾患が、骨髄異形成症候群 (MDS)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML) 及び前骨髄球性白血病 (PML) からなる群より選択される疾患である、請求項 3 8 に記載の治療方法。

40

【請求項 49】

前記疾患が、骨髄異形成症候群 (MDS)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML) 及び前骨髄球性白血病 (PML) からなる群より選択される疾患である、請求項 3 9 に記載の治療方法。

【請求項 50】

前記疾患が、骨髄異形成症候群 (MDS)、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML) 及び前骨髄球性白血病 (PML) からなる群より選択される疾患である

50

、請求項 40 に記載の治療方法。

【請求項 51】

前記疾患が、骨髓異形成症候群（MDS）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）及び前骨髓球性白血病（PML）からなる群より選択される疾患である、請求項 41 に記載の治療方法。

【請求項 52】

前記疾患が、骨髓異形成症候群（MDS）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）及び前骨髓球性白血病（PML）からなる群より選択される疾患である、請求項 42 に記載の治療方法。

【請求項 53】

前記疾患が、骨髓異形成症候群（MDS）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）及び前骨髓球性白血病（PML）からなる群より選択される疾患である、請求項 43 に記載の治療方法。

【請求項 54】

前記疾患が、骨髓異形成症候群（MDS）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）及び前骨髓球性白血病（PML）からなる群より選択される疾患である、請求項 44 に記載の治療方法。

【請求項 55】

前記疾患が、骨髓異形成症候群（MDS）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）及び前骨髓球性白血病（PML）からなる群より選択される疾患である、請求項 45 に記載の治療方法。

【請求項 56】

前記疾患が、骨髓異形成症候群（MDS）、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）及び前骨髓球性白血病（PML）からなる群より選択される疾患である、請求項 46 に記載の治療方法。

【請求項 57】

生体試料が骨髓性癌細胞を含有するかどうかを判定する方法であって、以下：

（a）前記生体試料を請求項 29 または 30 に記載の診断試薬と接触させること；

及び、

（b）前記試薬の前記試料内での分布を検出すること；

を含む、前記方法。

【請求項 58】

前記癌が、急性骨髓性白血病（AML）、慢性骨髓性白血病（CML）及び前骨髓球性白血病（PML）からなる群より選択される癌である、請求項 57 に記載の方法。

【請求項 59】

CD33 と特異的に結合する改良抗体またはそのエピトープ結合フラグメントであって、以下：

（a）配列番号 7 及び配列番号 8 の少なくとも 1 つを含む、抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをコードする DNA を、提供すること；

（b）前記 DNA によってコードされる前記抗体またはそのエピトープ結合フラグメントのアミノ酸配列を変えるように、前記 DNA に少なくとも 1 つのヌクレオチド変異、欠失、挿入または付加を導入すること；

（c）前記抗体またはエピトープ結合フラグメントを発現させること；

（d）前記の発現させた抗体またはエピトープ結合フラグメントを前記改良のためにスクリーニングし、それによって改良抗体またはエピトープ結合フラグメントを調製すること；

によって調製された、前記改良抗体または抗体フラグメント。

【請求項 60】

CD33 と特異的に結合する改良抗体またはそのエピトープ結合フラグメントであって、以下：

10

20

30

40

50

(a) 配列番号 9 及び配列番号 10 の少なくとも 1 つを含む、抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをコードする DNA を、提供すること；

(b) 前記 DNA によってコードされる前記抗体またはそのエピトープ結合フラグメントのアミノ酸配列を変えるように、前記 DNA に少なくとも 1 つのヌクレオチド変異、欠失、挿入または付加を導入すること；

(c) 前記抗体またはエピトープ結合フラグメントを発現させること；

(d) 前記の発現させた抗体またはエピトープ結合フラグメントを前記改良のためにスクリーニングし、それによって改良抗体またはエピトープ結合フラグメントを調製すること；

によって調製された、前記改良抗体または抗体フラグメント。

10

【請求項 61】

前記改良が CD33 に対する親和性の増加である、請求項 59 または 60 に記載の改良抗体または抗体フラグメント。

【請求項 62】

前記の少なくとも 1 つのヌクレオチド変異、欠失、挿入または付加が、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的突然変異誘発、カセット突然変異誘発、変異性 (error-prone) PCR、DNA シャフリング及び大腸菌 (E. coli) 突然変異誘発株の使用からなる群より選択される方法によってなされる、請求項 59 または 60 に記載の改良抗体または抗体フラグメント。

【請求項 63】

請求項 1 または 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをコードする、単離されたポリヌクレオチド。

20

【請求項 64】

請求項 1 または 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの軽鎖または重鎖をコードする、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項 65】

請求項 63 に記載のポリヌクレオチドを含む、組換えベクター。

【請求項 66】

請求項 64 に記載のポリヌクレオチドを含む、組換えベクター。

【請求項 67】

請求項 65 に記載の組換えベクターで形質転換された、宿主細胞。

30

【請求項 68】

請求項 66 に記載の組換えベクターで形質転換された、宿主細胞。

【請求項 69】

CD33 への結合能を有する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを産生する方法であって、(a) 請求項 67 で請求されるような宿主細胞を、前記宿主細胞が抗体またはエピトープ結合フラグメントを発現するような条件下で培養すること；及び、(b) このように発現された抗体またはエピトープ結合フラグメントを回収すること；を含む、前記方法。

【請求項 70】

CD33 への結合能を有する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを産生する方法であって、(a) 請求項 68 で請求されるような宿主細胞を、前記宿主細胞が抗体またはエピトープ結合フラグメントを発現するような条件下で培養すること；及び、(b) このように発現された抗体またはエピトープ結合フラグメントを回収すること；を含む、前記方法。

40

【請求項 71】

生体材料から CD33 を得る方法であって、以下：

(a) 生体材料を、請求項 1 または 2 に記載の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントと接触させること；

(b) 請求項 1 または 2 に記載の抗体またはエピトープ結合フラグメントが、前記生体

50

材料中のCD33に結合することを可能にすること；及び、

(c) CD33に結合した抗体またはエピトープ結合フラグメントを、生体材料から分離し、それによって生体材料からCD33を得ること；
を含む前記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[01] 本出願は、2002年11月7日に出願された仮出願番号60/424,332の利益を請求し、その開示を、本明細書において参照によって援用する。

【0002】

10

発明の属する技術分野

[02] 本発明は、CD33に結合する抗体に関するものである。より詳細には、本発明は、抗CD33抗体、前記抗体のフラグメント及びホモログ、前記抗体のヒト化型及び表面再構築化型、前記抗体の機能的等価物及び改良型、免疫複合体、及び前記抗体を含む組成物、ならびに、診断、研究及び治療への応用にそれらを用いることに関するものである。

【0003】

[03] 別の側面において、本発明は、該抗体をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含むベクター、該ポリヌクレオチドで形質転換された宿主細胞、及び該抗体の産生方法に関するものである。

20

【背景技術】

【0004】

発明の背景

[04] 白血球の分化抗原CD33は、ミエリンに関連する糖タンパク質及びCD22を含むシアロアドヘシンファミリーのメンバー、ならびにシアロアドヘシン自体と配列相同性を有する、364アミノ酸の膜貫通型糖タンパク質である(S. Peiper, 2002年、Leucocyte Typing VII, White Cell Differentiation, Antigens, Proceedings of the Seventh International Workshop and Conference, オックスフォード大学プレス、777ページ)。

30

【0005】

[05] CD33の発現は、造血区画に非常に特異的であるように見え、骨髓前駆細胞による強い発現を伴う(S. Peiper, 2002年)。これは、成熟及び分化すると発現は低減するが、CFU-GEMM、CFU-GM、CFU-G及びBFU-Eなどの骨髓前駆細胞、単球/マクロファージ、前骨髓球及び骨髓球などの顆粒球前駆体、ならびに、発現レベルは低い、成熟顆粒球によって、発現される(S. Peiper, 2002年)。

【0006】

[06] 対照的に、*in vitro*にて「芽球コロニー」を生じさせる多能性造血幹細胞(Leary, A. G. ら、1987年、Blood 69:953)及び造血性長期40
骨髓培養物を誘導する多能性造血幹細胞(Andrews R. G. ら、1989年、J. Exp. Med. 169:1721; Sutherland, H. J. ら、1989年、Blood 74:1563)は、CD33の発現を欠くように見える。

【0007】

[07] CD33の具体的な機能は不明であるが、そのシアロアドヘシンとの相同性は、レクチンファミリーの糖結合特性における役割を示唆し、役割は後に確認された(S. Peiper, 2002年)。

【0008】

[08] 重要なことには、抗CD33モノクローナル抗体は、クローン原性の急性骨髄性白血球(AML)細胞が、ヒト症例の80%超においてCD33を発現することを示した50

(LaRussa, V. F. ら、1992年、Exp. Hematol. 20:442-448)。

【0009】

[09] CD33を選択的に発現することから、AML細胞の選択的ターゲティングに、細胞毒性薬物を、CD33を特異的に認識しそして結合するモノクローナル抗体と組み合わせた免疫複合体を用いることが提案されている。このような治療には、幹細胞及び初期造血前駆体を影響を受けないままにすることが期待される。抗CD33抗体を利用する免疫複合体には、AML細胞に非常に致死的であるが(Roy, D. C. ら、1991年、Blood 77:2404; Lambert, J. M. ら、1991年、Biochemistry 30:3234) 正常な造血及び造血再形成を支持する幹細胞は残す(LaRussa, V. F. ら、1992年、Exp. Hematol. 20:442-448) ことが示されている、抗CD33-リシン免疫複合体が含まれる。

10

【0010】

[10] 免疫複合体を用いた追加の試験は、静脈内投与した場合に、放射性標識抗CD33抗体の末梢血及び髄の中の白血芽細胞に対する迅速なターゲティングを示した(Scheinberg, D. A. ら、1991年、J. Clin. Oncol. 9:478-490; Schwartz, M. A. ら、1993年、J. Clin. Oncol. 11:294-303)。標的細胞による抗体の迅速なインターナリゼーションは、in vitro試験においても認められた(Tanimoto, M. ら、1989年、Leukemia 3:339-348; Divgi, C. R. ら、1989年、Cancer Res. Suppl. Vol. 30:404a)。強力な抗腫瘍抗生物質であるカリケアマイシンと結合したヒト化抗CD33抗体(ゲムツズマブ・オゾガマイシン)の前臨床試験における評価は、HL-60細胞培養物、マウスにおけるHL-60腫瘍異種移植片、及びAML患者由来の髄試料において、白血球細胞の特異的な死滅を示した(Hamann, P. R. ら、2002年、Bioconjugate Chem. 13:47-58)。

20

【0011】

[11] これら前臨床試験の正の結果に基づき、ゲムツズマブ・オゾガマイシンを、第I及びII相臨床試験において評価した。第I相試験において、認められた主な毒性は、骨髓前駆細胞上にCD33が発現することによる骨髓抑制であった(Sievers, E. L. ら、1999年、Blood 93:3678-3684; Sievers, E. L. ら、2001年、J. Clin. Oncol. 19:3244-3254)。9mg/m²の用量を4時間かけて静脈内注射し14日後に反復した第II相試験は、30%の奏功率をもたらした。ゲムツズマブ・オゾガマイシンの販売承認は、2000年5月に食品医薬品局(FDA)によって認められ、その適応は、60歳かまたはそれより高齢であってそして細胞毒性化学療法の候補であると思われ、CD33陽性AMLを伴う初回再発患者の治療に対するものであった。市販後報告は、重大な毒性、特に静脈閉塞病(VO D)の潜在性を示唆し、添付文書の改訂及び患者のサーベイランスプログラムの開始をもたらした。この毒性の多くは、前臨床モデルにおいて肝毒性を引き起こすことが示された薬物成分カリケアマイシンに関連する可能性があり、それゆえCD33を標的とすることの直接的な結果でない可能性がある。

40

【0012】

[12] 先に論じた結果は、抗CD33抗体及び細胞毒性薬物を含む免疫複合体が、AMLの治療において用いられることに成功する可能性があることを示唆するが、一方で、安全かつ効果的な免疫複合体の要求がある。本発明は、これら及びその他の重要な結果を対象とする。

【発明の開示】

【課題を解決するための手段】

【0013】

発明の概要

[13] したがって、特異的にCD33に結合しそしてAMLの治療に用いられる可能性

50

のある抗体を提供することが、本発明の目的である。

[14] それゆえに、第一の態様において、C D 3 3 への結合能を有する抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが提供される。

【0014】

[15] 第二の態様において、ネズミ抗体M y 9-6 が提供され、その軽鎖及び重鎖可変領域双方のアミノ酸配列、軽鎖及び重鎖可変領域の遺伝子のc D N A 配列、そのC D R（相補性決定領域）の同定、その表面アミノ酸の同定、及び、組換え型でそれを発現する手段に関して、本明細書において完全に特徴付けられる。

【0015】

[16] 第三の態様において、M y 9-6 抗体またはそのエピトープ結合フラグメントの表面露出残基を、より厳密に公知のヒト抗体表面に類似するように、軽鎖及び重鎖双方において置換した、ヒト化または表面再構築化型M y 9-6 抗体が提供される。このようなヒト化抗体は、ネズミM y 9-6 と比較して、治療または診断剤としての有用性が増加する可能性がある。抗体M y 9-6 のヒト化型もまた、軽鎖及び重鎖可変領域双方のそれぞれのアミノ酸配列、軽鎖及び重鎖可変領域の遺伝子のD N A 配列、C D R の同定、その表面アミノ酸の同定、及び、組換え型でそれらを発現する手段の開示に関して、本明細書において完全に特徴付けられる。

【0016】

[17] さらに態様において、配列番号1～6：

S Y Y I H（配列番号1）、

V I Y P G N D D I S Y N Q K F X G（配列番号2）、ここでXはKまたはQである、

E V R L R Y F D V（配列番号3）、

K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A（配列番号4）、

W A S T R E S（配列番号5）、

H Q Y L S S R T（配列番号6）、

からなる群より選択されるアミノ酸配列を有する少なくとも1つの相補性決定領域を含み、そしてC D 3 3 への結合能を有する、抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが提供される。

【0017】

[18] さらに態様において、少なくとも1つの重鎖可変領域及び少なくとも1つの軽鎖可変領域を含む、抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが提供され、ここで前記重鎖可変領域は、配列番号1～3：

S Y Y I H（配列番号1）、

V I Y P G N D D I S Y N Q K F X G（配列番号2）、ここでXはKまたはQである、

E V R L R Y F D V（配列番号3）、

によってそれぞれ表されるアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域を含み、そして、前記軽鎖可変領域は、配列番号4～6：

K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A（配列番号4）、

W A S T R E S（配列番号5）、

H Q Y L S S R T（配列番号6）、

によってそれぞれ表されるアミノ酸配列を有する3つの相補性決定領域を含む。

【0018】

[19] さらに態様において、配列番号7：

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G A G T T V T V S S、
によって表されるアミノ酸配列と少なくとも90%の配列同一性を、さらに好ましくは配列番号7と95%の配列同一性を、最も好ましくは配列番号7と100%の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有する、重鎖可変領域を有する抗体が提供される。

【0019】

10

20

30

40

50

[20] 同様に、配列番号 8 :

N I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L
A W Y Q Q I P G Q S P K L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q S E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G G G T K L E I K R、

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を、さらに好ましくは配列番号 8 と 95 % の配列同一性を、最も好ましくは配列番号 8 と 100 % の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有する、軽鎖可変領域を有する抗体が提供される。

【0020】

[21] さらに態様において、配列番号 9 :

Q V Q L Q Q P G A E V V K P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y Y I H W I K Q 10
T P G Q G L E W V G V I Y P G N D D I S Y N Q K F Q G K A T L T A D K S S T T A
Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R E V R L R Y F D V W G Q G T T V T V S S、

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を、さらに好ましくは配列番号 9 と 95 % の配列同一性を、最も好ましくは配列番号 9 と 100 % の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有する、ヒト化または表面再構築化された重鎖可変領域を有する抗体が提供される。

【0021】

[22] 同様に、配列番号 10 :

E I V L T Q S P G S L A V S P G E R V T M S C K S S Q S V F F S S S Q K N Y L 20
A W Y Q Q I P G Q S P R L L I Y W A S T R E S G V P D R F T G S G S G T D F T L
T I S S V Q P E D L A I Y Y C H Q Y L S S R T F G Q G T K L E I K R、

によって表されるアミノ酸配列と少なくとも 90 % の配列同一性を、さらに好ましくは配列番号 10 と 95 % の配列同一性を、最も好ましくは配列番号 10 と 100 % の配列同一性を共有するアミノ酸配列を有する、ヒト化または表面再構築化された軽鎖可変領域を有する抗体が提供される。

【0022】

[23] さらに態様において、本発明は、直接的に、または切断可能であるかもしくは切断可能でないリンカーを介して、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントに共有結合した、薬物またはプロドラッグを含む免疫複合体を提供する。好ましい態様において、薬物またはプロドラッグは、メイタンシノイド、タキソイド、CC-1065、 30
CC-1065 アナログ、ドラスタチン及びドラスタチンアナログなどの細胞毒性薬物またはプロドラッグである。

【0023】

[24] さらに態様において、本発明は、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメント、ならびに、薬物またはプロドラッグを含む、組成物を提供する。

[25] さらに態様において、本発明は、1 またはそれより多くの医薬的に許容可能な薬剤の存在下で、本発明の抗体、そのエピトープ結合フラグメントまたは免疫複合体を、単独で、あるいは薬物もしくはプロドラッグまたは他の治療剤と組み合わせて含む、医薬組成物を含む。

【0024】

[26] さらに態様において、本発明は、研究または診断への適用のために標識した抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを提供する。好ましい態様において、標識は、40
ビオチン標識、酵素標識、放射性標識、フルオロフォア、クロモフォア、造影剤または金属イオンである。

【0025】

[27] さらに態様において、本発明は、本発明の抗体、そのエピトープ結合フラグメントまたは免疫複合体を、単独で、あるいは薬物もしくはプロドラッグまたは他の治療剤と組み合わせ、さらには、単独で、あるいは 1 またはそれより多くの医薬的に許容可能な薬剤の存在下で用いることを介して、CD33 を発現している細胞の増殖を阻害する方法を提供する。

【0026】

[28] さらに態様において、本発明は、CD33を発現する疾患を有する個体の治療方法を提供し、該方法は、本発明の抗体、そのエピトープ結合フラグメントまたは免疫複合体を、単独で、あるいは別の薬物もしくはプロドラッグまたは別の治療剤と組み合わせ、さらには、単独で、あるいは1またはそれより多くの医薬的に許容可能な薬剤の存在下で投与することを含む。疾患は、例えば、骨髄異形成症候群(MDS)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)及び前骨髄球性白血病(PML)、あるいはCD33を発現することが未だ判定されていない他疾患の、1またはそれより多くであってもよい。

【0027】

10

[29] 治療方法は、単独で、あるいは薬物もしくはプロドラッグまたは他の治療剤と組み合わせ、さらには、単独で、あるいは1またはそれより多くの医薬的に許容可能な薬剤の存在下において、本発明の抗体、抗体フラグメント及び免疫複合体をin vivo、ex vivo及びin vitroにて適用することを含む。

【0028】

[30] さらに態様において、生体試料が骨髄性癌細胞を含有するかどうかを判定する方法が提供され、該方法では、生体試料を本発明の標識した抗体またはそのエピトープ結合フラグメントなどの診断試薬と接触させ、そして試料内の試薬の分布を検出する。この方法を、急性骨髄性白血病(AML)、慢性骨髄性白血病(CML)及び前骨髄球性白血病(PML)などの癌を診断するのに用いてもよい。

20

【0029】

[31] さらに態様において、改良された特性を有する、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントが提供される。例えば、CD33への親和性が改良された抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを、動物免疫化、ハイブリドーマ形成、及び特異的な性質を備えた抗体の選択という標準的な技術によって、作製してもよい。

【0030】

[32] 改良された抗体を、例えば、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的突然変異誘発、カセット突然変異誘発、変異性(error-prone)PCR、DNAシャフリング及び大腸菌(E. coli)突然変異誘発株の使用を介して、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントを親和性成熟させることによって、作製してもよい。

30

【0031】

[33] さらに態様において、本発明は、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをコードするポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含む組換えベクター、組換えベクターで形質転換された宿主細胞、及び、前記抗体及びそのエピトープ結合フラグメントを前記宿主細胞を培養することによって産生する方法を、提供する。

【0032】

[34] 最終の態様において、本発明は、本発明の抗体及びそのエピトープ結合フラグメントを用いて、CD33を生体物質から得る方法を提供する。

【0033】

発明の詳細な説明

40

[62] 本発明は、新規ネズミ抗CD33抗体及びこの抗体のヒト化型を提供する。さらに、CD33を特異的に認識しそして結合するネズミ抗CD33抗体またはそのヒト化型のCDRを1またはそれより多く含む抗体を、提供する。

【0034】

ネズミMy9-6抗体

[64] 本発明のネズミ抗CD33抗体を、本明細書では「My9-6」、「ネズミMy9-6」及び「muMy9-6」と様々に表し、軽鎖及び重鎖可変領域の双方の推定生殖系列アミノ酸配列(図10)、軽鎖及び重鎖可変領域の双方のアミノ酸配列(図8A及びB)、CDRの同定(図9)、表面アミノ酸の同定(図13A及びB)、及びそれを組換え型で発現する手段に関して、完全に特徴付ける。

50

【0035】

[65] My 9-6 抗体をさらに機能的に特徴付け、そして、CD 33 陽性の U-937 細胞表面の CD 33 と高い親和性で結合することを示した (図 1)。^{1 2 5} I-標識 My 9-6 は、U-937 細胞に結合し、そして、非標識 My 9-6 及びすでに特徴付けられた抗 CD 33 抗体 My 9 (バイオジェネックス、カタログ番号 267M) と、細胞外で競合する。

【0036】

[66] 「可変領域」の語を、本明細書では、抗体間で配列が異なりそして特定の抗体それぞれのその抗原に対する結合性及び特異性に協調する、抗体重鎖及び軽鎖の特定部分を記載するのに用いる。可変性は、通常は、抗体可変領域全体にわたって均等に分布しない。これは、軽鎖及び重鎖可変領域の双方における、相補性決定領域 (CDR) または超可変領域と称される可変領域の 3 つのセグメント内に、典型的には集中する。より高度に保存された可変領域の一部分は、フレームワーク領域と称される。重鎖及び軽鎖の可変領域は、大部分が β -シートの立体配置を取る 4 つのフレームワーク領域を含み、各フレームワーク領域は、 β -シート構造と連結するループを形成しそして時には β -シート構造の一部を形成する、3 つの CDR と連結する。各鎖の CDR は、フレームワーク領域によって非常に近接して保持され、そして、もう一方の鎖由来の CDR とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (E. A. Kabat ら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版、1991 年、米国国立衛生研究所 (NIH))。

10

20

【0037】

[67] 「定常」領域は、抗体の抗原との結合には直接的に関与しないが、しかし、抗体の抗体依存性細胞毒性への関与などの様々なエフェクター機能を示す。

【0038】

[68] ヒト化 My 9-6 抗体

[69] My 9-6 のヒト化型を、本明細書では「hu My 9-6」及び「ヒト化 My 9-6」と様々に表し、これもまた調製した。

【0039】

[70] ヒト化の目的は、ネズミ抗体などの異種抗体の免疫原性を、抗体の抗原結合親和性及び特異性を完全に維持しながら、ヒトへ導入する目的で低減させることである。

30

[71] ヒト化抗体を、表面再構築化及び CDR グラフトなどのいくつかの技術を用いて作出してもよい。本明細書では、表面再構築化の技術は、標的宿主の公知の抗体の表面に類似するように抗体可変領域の非 CDR 表面を変えるために、分子モデリング、統計解析及び変異誘発の組み合わせを用いる。

【0040】

[72] 抗体の表面再構築化の戦略及び方法、ならびに異宿主内で抗体の免疫原性を低減させる他の方法は、米国特許第 5,639,641 (Pedersen ら) に開示されており、本明細書ではそのすべてを参照によって援用する。簡潔に言えば、好ましい方法において、(1) 抗体の重鎖及び軽鎖可変領域プールの位置アラインメントを、一連の重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークの表面に曝露する位置を与えるように行い、ここで、すべての可変領域に対するアラインメント位置は少なくとも約 98% 同一である；(2) 一連の重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークの表面に露出するアミノ酸残基を、げっ歯類抗体 (またはそのフラグメント) について定め；(3) 一連のげっ歯類の表面に露出するアミノ酸残基と極めて同一である、一連の重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークの表面に露出するアミノ酸残基を同定し；(4) 工程 (2) において定義した、一連の重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークの表面に露出するアミノ酸残基を、げっ歯類抗体の相補性決定領域の任意の残基の任意の原子から 5 Å 以内にある、これらのアミノ酸残基を除いて、工程 (3) において定義した、一連の重鎖及び軽鎖可変領域フレームワークの表面に露出するアミノ酸残基で置換し；そして、(5) 結合特異性を有するヒト化げっ歯類抗体を作出する。

40

50

【0041】

[73] 抗体を、種々の他の技術を用いてヒト化することが可能であり、該技術には、CDRグラフト（EP 0 239 400；WO 91/09967；米国特許第5, 530, 101；及び5, 585, 089）、ベニアリングまたは表面再構築化（EP 0 592 106；EP 0 519 596；Padlan E. A., 1991年、Molecular Immunology 28 (4/5)：489-498；Studnicka G. M. ら、1994年、Protein Engineering 7 (6)：805-814；Roguska M. A. ら、1994年、PNAS 91：969-973）、及び鎖シャフリング（米国特許第5, 565, 332）が含まれる。ヒト抗体を、ファージ・ディスプレイ法を含む、当該技術分野において公知の種々の方法によって作製することが可能である。米国特許第4, 444, 887、4, 716, 111、5, 545, 806及び5, 814, 318；及び、国際特許出願公開番号WO 98/46645、WO 98/50433、WO 98/24893、WO 98/16654、WO 96/34096、WO 96/33735、及びWO 91/10741もまた、参照されたい（前記参考文献は、そのすべてを参照によって援用する）。 10

【0042】

[74] 本明細書においてさらに記載されるように、My9-6のCDRをモデリングによって同定し、そしてその分子構造を予測した。次いで、ヒト化My9-6抗体を作製し、そして完全に特徴付けた。いくつかのhuMy9-6抗体の軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列を、図16A及び16Bに示す。ネズミ及びヒト化My9-6抗体の結合値の比較を、図17に提供する。抗体の結合曲線を、図18に示す。 20

【0043】

[75] My9-6抗体のエピトープ結合フラグメント

[76] ネズミMy9-6抗体及びヒト化My9-6抗体のエピトープ結合フラグメントについて、本明細書では、ネズミMy9-6抗体及びそのヒト化型とは別々に論じるが、本発明の「抗体（単数形）」または「抗体（複数形）」の語は、完全長のmuMy9-6及びhuMy9-6抗体の双方ならびにこれらの抗体のエピトープ結合フラグメントを含んでもよいことが、理解される。

【0044】

[77] 本明細書では、「抗体フラグメント」は、一般に「エピトープ結合フラグメント」と称される、CD33への結合能を保持する抗体の任意の一部を含む。抗体フラグメントの例には、好ましくは、非限定的に、Fab、Fab'及びF(ab')₂、Fd、一本鎖Fvs（scFv）、一本鎖抗体、ジスルフィドで連結されたFvs（sdFv）、及びV_LまたはV_Hドメインのいずれかを含むフラグメントが含まれる。一本鎖抗体を含む、エピトープ結合フラグメントは、可変領域（単数形もしくは複数形）を、単独で、あるいは以下：ヒンジ領域、C_H1、C_H2及びC_H3ドメインの全体または一部分と組み合わせて含んでもよい。 30

【0045】

[78] このようなフラグメントは、片方もしくは両方のFabフラグメントまたはF(ab')₂フラグメントを含有してもよい。3、4または5つのCDRなど、このような領域をすべてよりも少なく含有するフラグメントもまた機能的ではあるが、好ましくは、抗体フラグメントは、抗体全体のすべての6つのCDRを含有する。さらには、機能的等価物は、以下の免疫グロブリンクラス：IgG、IgM、IgA、IgDまたはIgE、及びそのサブクラスのいずれか一つのメンバーであってもよい、あるいは組み合わせてもよい。 40

【0046】

[79] Fab及びF(ab')₂フラグメントを、パパイン（Fabフラグメント）またはペプシン（F(ab')₂フラグメント）などの酵素を用いて、タンパク質分解性切断によって作出してもよい。

【0047】

[80] 一本鎖 F V (s c F v) フラグメントは、抗体軽鎖可変領域 (V_L) の少なくとも 1 つのフラグメントと連結した、抗体重鎖可変領域 (V_H) の少なくとも 1 つのフラグメントを含有する、エピトープ結合フラグメントである。リンカーは、それらが一本鎖抗体フラグメントの由来する抗体全体の標的分子結合特異性を維持するように連結すると、(V_L) または (V_H) 領域の適切な三次元の折り畳み構造が生じることを確実にするように選択された、短くフレキシブルなペプチドであってもよい。(V_L) または (V_H) 配列のカルボキシル末端を、相補的な (V_L) または (V_H) 配列のアミノ酸末端と、リンカーで共有結合させてもよい。一本鎖抗体フラグメントを、分子クローニング、抗体ファージディスプレイライブラリーまたは当業者に周知の同様な技術によって、作製してもよい。これらのタンパク質を、例えば、真核細胞、または細菌を含む原核細胞において産生してもよい。

10

【 0 0 4 8 】

[81] 本発明のエピトープ結合フラグメントもまた、当該技術分野において公知の種々のファージディスプレイ法を用いて作製してよい。ファージディスプレイ法において、機能的な抗体ドメインを、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示する。特に、このようなファージを、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー (例えば、ヒトまたはネズミ) から発現させたエピトープ結合ドメインを提示するのに利用することが可能である。目的の抗原と結合するエピトープ結合ドメインを発現しているファージを、抗原を用いて、例えば、標識 C D 3 3、または固体表面もしくはビーズに結合もしくは捕捉された C D 3 3 を用いて、選択または同定することが可能である。これらの方法において用いるファージは、典型的には、ファージ遺伝子 I I I または遺伝子 V I I I タンパク質のいずれかと組換え技術により融合させた、F a b、F v またはジスルフィドで安定化した F v 抗体ドメインとともにファージから発現する、f d 及び M 1 3 結合ドメインを含む、繊維状ファージである。

20

【 0 0 4 9 】

[82] 本発明のエピトープ結合フラグメントを作製するのに用いることが可能なファージディスプレイ法の例には、B r i n k m a n ら、1 9 9 5 年、J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 8 2 : 4 1 - 5 0 ; A m e s ら、1 9 9 5 年、J . I m m u n o l . M e t h o d s 1 8 4 : 1 7 7 - 1 8 6 ; K e t t l e b o r o u g h ら、1 9 9 4 年、E u r . J . I m m u n o l . 2 4 : 9 5 2 - 9 5 8 ; P e r s i c ら、1 9 9 7 年、G e n e 1 8 7 : 9 - 1 8 ; B u r t o n ら、1 9 9 4 年、A d v a n c e s i n I m m u n o l o g y 5 7 : 1 9 1 - 2 8 0 ; P C T 出願第 P C T / G B 9 1 / 0 1 1 3 4 ; P C T 公開 W O 9 0 / 0 2 8 0 9 ; W O 9 1 / 1 0 7 3 7 ; W O 9 2 / 0 1 0 4 7 ; W O 9 2 / 1 8 6 1 9 ; W O 9 3 / 1 1 2 3 6 ; W O 9 5 / 1 5 9 8 2 ; W O 9 5 / 2 0 4 0 1 ; 及び、米国特許第 5, 6 9 8, 4 2 6 ; 5, 2 2 3, 4 0 9 ; 5, 4 0 3, 4 8 4 ; 5, 5 8 0, 7 1 7 ; 5, 4 2 7, 9 0 8 ; 5, 7 5 0, 7 5 3 ; 5, 8 2 1, 0 4 7 ; 5, 5 7 1, 6 9 8 ; 5, 4 2 7, 9 0 8 ; 5, 5 1 6, 6 3 7 ; 5, 7 8 0, 2 2 5 ; 5, 6 5 8, 7 2 7 ; 5, 7 3 3, 7 4 3 及び 5, 9 6 9, 1 0 8 において開示されたものが含まれ ; そのそれぞれは、本明細書においてそのすべてを参照によって援用する。

30

40

【 0 0 5 0 】

[83] ファージを選択した後、フラグメントをコードするファージの領域を単離し、そしてエピトープ結合フラグメントを、例えば以下に詳細に記載するような組換え D N A 技術を用いて、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母及び細菌を含む、選択した宿主における発現を介して作製するのに用いることが可能である。例えば、F a b、F a b ' 及び F (a b ')₂ フラグメントを組換え技術により作出する技術もまた、P C T 公開 W O 9 2 / 2 2 3 2 4 ; M u l l i n a x ら、1 9 9 2 年、B i o T e c h n i q u e s 1 2 (6) : 8 6 4 - 8 6 9 ; S a w a i ら、1 9 9 5 年、A J R I 3 4 : 2 6 - 3 4 ; 及び、B e t t e r ら、1 9 8 8 年、S c i e n c e 2 4 0 : 1 0 4 1 - 1 0 4 3 において開示されたものなどの、当該技術分野において公知の方法を用いて使用することが

50

可能であり；前記参考文献は、そのすべてを参照によって援用する。一本鎖Fvおよび抗体を産生するために用いることができる技術の例には、米国特許第4,946,778および5,258,498；Hustonら、1991年、Methods in Enzymology 203:46-88；Shuら、1993年、PNAS 90:7995-7999；Skerrraら、1988年、Science 240:1038-1040；に記載のものが含まれる。

【0051】

[84] 機能的等価物

[85] My9-6抗体及びヒト化My9-6抗体の機能的等価物もまた、本発明の範囲内に含まれる。「機能的等価物」の語には、例えば各機能的等価物とそのCD33への結合能によって定義される、相同配列を有する抗体、キメラ抗体、修飾抗体及び人工抗体が含まれる。当業者は、「抗体フラグメント」と称される分子群及び「機能的等価物」と称される群に重複があることを、理解するであろう。

10

【0052】

[86] 相同配列を有する抗体とは、本発明のネズミMy9-6及びヒト化My9-6抗体のアミノ酸配列と配列同一性または相同性を有するアミノ酸配列を有する、これらの抗体である。好ましくは、同一性は、本発明のネズミMy9-6及びヒト化My9-6抗体の可変領域のアミノ酸配列とである。本明細書においてアミノ酸配列に適用されるような「配列同一性」及び「配列相同性」を、例えばPearson及びLipman、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-2448 (1988年)にしたがったFASTA検索法によって決定されるように、別のアミノ酸配列と、少なくとも約90%、91%、92%、93%または94%の配列同一性を、さらに好ましくは少なくとも約95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性を有する配列として、定義する。

20

【0053】

[87] 本明細書では、キメラ抗体とは、抗体の異なる一部分が異なる動物種に由来する抗体である。例えば、ヒト免疫グロブリン定常領域と組にして、ネズミモノクローナル抗体由来の可変領域を有する抗体である。キメラ抗体を作出する方法は、当該分野において公知である。例えば、Morrison, 1985年、Science 229:1202；Oiら、1986年、BioTechniques 4:214；Gilliesら、1989年、J. Immunol. Methods 125:191-202；米国特許第5,807,715；4,816,567；及び、4,816,397を参照されたく、そのすべてを本明細書では参照によって援用する。

30

【0054】

[88] 人工抗体には、scFvフラグメント、二重特異性抗体、三重特異性抗体、四重特異性抗体及びmruが含まれ(Winter, G. 及びMilstein, C.、1991年、Nature 349:293-299；Hudson, P. J., 1999年、Current Opinion in Immunology 11:548-557による総説を参照されたい)、そのそれぞれは抗原結合能を有する。一本鎖Fvフラグメント(scFv)において、抗体のV_H及びV_Lドメインは、フレキシブルペプチドによって連結される。典型的には、このリンカーペプチドは、約15アミノ酸残基長である。リンカーが例えば5アミノ酸と、それよりもかなり小さいならば、二価のscFv二量体である二重特異性抗体が形成される。リンカーが、3アミノ酸残基よりも少なく低減されるならば、三重特異性抗体または四重特異性抗体と称される三量体及び四量体構造が形成される。抗体の最小結合単位はCDRであり、典型的には、単独で用いることが可能な、十分な特異的認識及び結合性を有する重鎖のCDR2である。このようなフラグメントは、分子認識単位またはmruと称される。いくつかのこのようなmruを、短いリンカーペプチドで連結して合わせることが可能であり、したがって、1つのmruよりも高度な結合力を有する人工の結合タンパク質が形成される。

40

【0055】

50

[89] 本出願の機能的等価物には、例えば任意の種類分子と抗体との共有結合によって修飾される抗体などの、修飾抗体も含まれる。例えば、修飾抗体には、例えばグリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、公知の保護基／封鎖基による誘導体化、タンパク質分解性切断、細胞のリガンドまたは他のタンパク質との連結などによって修飾されている抗体が含まれる。共有結合は、抗体が抗イデオタイプ反応を起こすことを妨げない。これらの修飾は、公知の技術によって実行されてもよく、非限定的に、特異的な化学的切断、アセチル化、ホルミル化、ツニカマイシンの代謝合成などを含む。加えて、修飾抗体は、1またはそれより多くの非古典的アミノ酸を含有してもよい。

【0056】

[90] 機能的等価物を、異なる鎖上の異なるCDRを異なるフレームワーク内で交換することによって、作出してもよい。したがって、例えば、異なる分類の抗体は、所与の一連のCDRについて、異なる重鎖を置換することによって可能であり、それによって、例えばIgG_{1~4}、IgM、IgA_{1~2}、IgD、IgE抗体種類及びアイソタイプを作出してもよい。同様に、本発明の範囲内の人工抗体を、所与の一連のCDRを完全合成したフレームワーク内に組込むことによって、作出してもよい。

【0057】

[91] 機能的等価物を、当該技術分野において公知の多種多様な方法を用いて、特定の一連のCDRに隣接する可変及び／または定常領域配列内で変異、欠失及び／または挿入を行うことによって、容易に作出してもよい。

【0058】

[92] 本発明の抗体フラグメント及び機能的等価物は、ネズミMy9-6抗体と比較した場合に、検出可能な程度のCD33との結合性を有するこれらの分子を包含する。検出可能な程度の結合性には、ネズミMy9-6抗体のCD33への結合能の、少なくとも10~100%の範囲内のすべての値、好ましくは少なくとも50%、60%または70%、より好ましくは少なくとも75%、80%、85%、90%、95%または99%が含まれる。

【0059】

[93] 改良抗体

[94] CDRは、エピトープ認識及び抗体結合に最も重要である。しかしながら、抗体がその同族のエピトープを認識しそして結合する能力を妨げずに、CDRを含む残基を変えてもよい。例えば、エピトープ認識には影響を与えないが、エピトープに対する抗体の結合親和性を増加させる変化を行ってもよい。

【0060】

[95] このように、特異的にCD33を認識しそして結合し、好ましくは親和性の増加を伴った、ネズミ及びヒト化抗体双方の改良型もまた、本発明の範囲に含まれる。

[96] いくつかの試験によって、抗体の配列中の種々の位置に1またはそれより多くのアミノ酸の変更を導入する影響が、第一抗体配列の知見ならびに結合性及び発現レベルなどのその特性に基づき、調査された(Yang, W. P. ら、1995年、J. Mol. Biol., 254, 392-403; Rader, C. ら、1998年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95, 8910-8915; Vaughan, T. J. ら、1998年、Nature Biotechnology, 16, 535-539)。

【0061】

[97] これらの試験では、オリゴヌクレオチドを介した部位特異的突然変異誘発、カセット突然変異誘発、変異性PCR、DNAシャフリングまたは大腸菌(E. coli)突然変異誘発株などの方法を用いて、CDR1、CDR2、CDR3またはフレームワーク領域において重鎖及び軽鎖遺伝子配列を変えることによって、第一の抗体の等価物が作製された(Vaughan, T. J. ら、1998年、Nature Biotechnology, 16, 535-539; Adey, N. B. ら、1996年、第16章、277~291ページ、「Phage Display of Peptides and

Proteins」中、Kay, B. K. ら編集、アカデミック・プレス）。第一の抗体の配列を変えるこれらの方法は、結果として第二の抗体の親和性の改良をもたらした（Gram, H. ら、1992年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89, 3576-3580; Boder, E. T. ら、2000年、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97, 10701-10705; Davies, J. 及び Reichmann, L.、1996年、Immunotechnology, 2, 169-179; Thompson, J. ら、1996年、J. Mol. Biol., 256, 77-88; Short, M. K. ら、2002年、J. Biol. Chem., 277, 16365-16370; Furukawa K. ら、2001年、J. Biol. Chem., 276, 27622-27628）。

10

【0062】

[98] 抗体の1またはそれより多くのアミノ酸残基を変更するという同様な方向性のストラテジーによって、本明細書に記載される抗体配列を、CD33に対する改良された親和性を含む、改良された機能を伴う抗CD33抗体を開発するのに用いることが可能である。

【0063】

[99] 改良抗体には、動物の免疫化、ハイブリドーマ形成及び特異的な特徴を有する抗体の選択という標準的な技術によって作製される、改良された特徴を有するこれらの抗体もまた含まれる。

【0064】

20

[100] 免疫複合体

[101] 本発明はまた、薬物またはプロドラッグと連結させた、本明細書において開示されるような抗体、抗体フラグメント、機能的等価物、改良抗体及びそのアナログを含む、免疫複合体も対象とする。好ましい薬物またはプロドラッグは細胞毒性剤であり、そして例えば、メイタンシノイド類及びメイタンシノイドアナログ、タキソイド類、CC-1065及びCC-1065アナログ、ドラスタチン及びドラスタチンアナログが含まれる。

【0065】

[102] 該免疫複合体を、in vitro方法によって作製してもよい。薬物またはプロドラッグを抗体と連結させるために、連結基が用いられる。適当な連結基は、当該技術分野において周知であり、そして、ジスルフィド基、チオエーテル基、酸に不安定な基、光に不安定な基、ペプチダーゼに不安定な基及びエステラーゼに不安定な基が含まれる。好ましい連結基は、ジスルフィド基及びチオエーテル基である。例えば、複合体を、ジスルフィド交換反応を用いるか、または抗体と薬剤もしくはプロドラッグとの間にチオエーテル結合を形成することによって、構築することが可能である。

30

【0066】

[103] メイタンシノイド類及びメイタンシノイドアナログは、好ましい細胞毒性剤に含まれる。適切なメイタンシノイド類の例には、メイタンシノール及びメイタンシノールアナログが含まれる。適切なメイタンシノイド類は、米国特許第4, 424, 219; 4, 256, 746; 4, 294, 757; 4, 307, 016; 4, 313, 946; 4, 315, 929; 4, 331, 598; 4, 361, 650; 4, 362, 663; 4, 364, 866; 4, 450, 254; 4, 322, 348; 4, 371, 533; 6, 333, 410; 5, 475, 092; 5, 585, 499及び5, 846, 545に開示されている。

40

【0067】

[104] メイタンシノイド類に関して、連結基は、反応性化学基を含んでもよい。好ましい態様において、反応性化学基は、ジスルフィド結合によって連結した部分を介してメイタンシノイドと共有結合することが可能である。

【0068】

[105] 特に好ましい反応性化学基は、N-スクシンイミジルエステル類及びN-スル

50

ホスクシンイミジルエステル類である。

[106] 反応性化学基を含有する連結基を含む、特に好ましいメイタンシノイド類は、連結部分がジスルフィド結合を含有し、そして化学反応基がN-スクシンイミジルまたはN-スルホスクシンイミジルエステルを含む、メイタンシノールのC-3エステル類及びそのアナログである。

【0069】

[107] メイタンシノイド類における多くの位は、連結部分と化学的に連結するための位として働くことが可能である。例えば、ヒドロキシル基を有するC-3位、ヒドロキシメチルで修飾されたC-14位、ヒドロキシで修飾されたC-15位及びヒドロキシ基を有するC-20位は、いずれも有用であることが期待される。しかしながら、C-3位が好ましく、そしてメイタンシノールのC-3位が特に好ましい。

10

【0070】

[108] 他の化学結合には、酸に不安定な結合、光に不安定な結合、ペプチダーゼに不安定な結合及びエステラーゼに不安定な結合が含まれる。本明細書において援用する、米国特許第5,208,020の開示は、このような結合を有するメイタンシノイド類の産生について教示している。

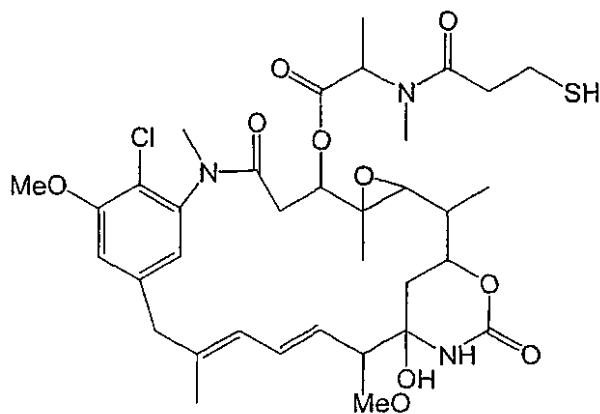
【0071】

[109] 以下に詳細に記載するように、免疫複合体My9-6-DM1は、チオールを含有するメイタンシノイド(DM1)を利用する。DM1は、以下の構造式(1)によって表される：

20

【0072】

【化1】



(1)

30

【0073】

[110] タキサン類もまた、好ましい細胞毒性剤である。本発明において用いるのに適したタキサン類は、米国特許第6,372,738及び6,340,701に開示されている。本発明のタキサン類と細胞結合剤との複合体を、現在公知の、または後に開発される任意の技術を用いて、形成することが可能である。複合体形成の多数の方法が、USP 5,416,064及びUSP 5,475,092において教示される。

40

【0074】

[111] CC-1065及びそのアナログもまた、本発明において用いるのに好ましい細胞毒性薬物である。CC-1065及びそのアナログは、米国特許第6,372,738; 6,340,701; 5,846,545; 及び、5,585,499において開示されている。CC-1065は、ストレプトマイセス・ゼレンシス(*Streptomyces zelensis*)の培養液から単離された、強力な抗腫瘍抗生物質である。CC-1065は、ドキソルビシン、メトトレキサート及びビンクリスチンなどの一般的に用いられている抗癌剤よりも、*in vitro*で約1000倍強力である(B. K. Bhuyanら、*Cancer Res.*, 42, 3532-3537(1982年))。

【0075】

50

[112] メトトレキサート、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ビンクリスチン、ビンブラスチン、メルファラン、マイトマイシンC、クロラムブシル、カリケアマイシン、ドラスタチン及びドラスタチンアナログなどの薬物もまた、本発明の複合体を作製するのに適している。薬物分子はまた、血清アルブミンなどの中間キャリア分子を介して抗体分子と連結することが可能である。

【0076】

[113] CD33を発現する細胞の増殖阻害

[114] CD33を発現する細胞の増殖を阻害する方法もまた、本発明に含まれる。これらの方法は、本発明の抗体または免疫複合体、ならびに、1またはそれより多くの追加の治療剤と結合した本発明の抗体または免疫複合体を利用する。適切な治療剤には、CD 10
33を発現する細胞の増殖を直接的または間接的に阻害するものが含まれる。

【0077】

[115] 本明細書では、「阻害する」及び「阻害している」の語は、細胞死を含む、細胞増殖における任意の阻害効果を含むことが理解されるべきである。阻害効果には、一時的な効果、持続的な効果、及び恒久的な効果が含まれる。

【0078】

[116] 治療への適用

[117] 本発明はまた、本発明の抗体及び免疫複合体の治療への適用を含み、ここで、抗体または免疫複合体を、医薬的に許容可能な剤形で個体に投与してもよい。これらは、ボラスまたは時間をかけた持続注入によって静脈内に、筋肉内、皮下、動脈内、滑液囊 20
内、くも膜下腔内、経口、局所または吸入経路で、投与することが可能である。これらは、局所ならびに全身性の治療効果を及ぼすために、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内または病巣周囲経路でも投与してよい。

【0079】

[118] 医薬的に許容可能な剤形には、一般的には、キャリア、希釈剤及び賦形剤などの医薬的に許容可能な剤が含まれるであろう。これらの剤は周知であり、そして最も適切な剤を、当業者が、臨床状況を根拠に決定することが可能である。適当なキャリア、希釈剤及び／または賦形剤の例には：(1) 約1mg/ml～25mg/mlのヒト血清アルブミンを含有する、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩液、pH ～7.4、(2) 0.9%生理食塩液(0.9%w/v NaCl)、及び、(3) 5%(w/v)ブドウ糖が含ま 30
れる。

【0080】

[119] 他の治療への適用においては、本発明の抗体または免疫複合体を、1またはそれより多くの追加の治療剤と同時投与する。治療剤は、宿主に対して最小のダメージでありながら、癌細胞を殺すかまたはその増殖を制限しようとするこれらの剤である。このように、こういった剤は、癌細胞の特性(例えば、代謝、血管新生または細胞表面での抗原提示)における健常宿主細胞との任意の違いを活用してもよい。腫瘍形態学における違いは、介入する可能性のある部位である。例えば、治療剤は、固形腫瘍内部の血管新生を遅らせ、その結果としてその増殖速度を遅くするのに有用な、抗VEGF抗体などの抗体であることが可能である。 40

【0081】

[120] 適切な治療剤には、非限定的に、細胞毒性剤または細胞増殖抑制剤が含まれる。タキソールは、細胞毒性剤でもある、好ましい治療剤である。他の治療剤には、非限定的に、グラニセトロンHCLなどの補助剤、酢酸ロイプロリドなどのアンドロゲン阻害剤、ドキソルビシンなどの抗生物質、タモキシフェンなど抗エストロゲン、インターフェロンα-2aなどの代謝拮抗剤、rasファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤などの酵素阻害剤、アルデスロイキンなどの免疫調節物質、及びメルファランHCLなどのナイトロジェンマスタード誘導体等が含まれる。

【0082】

[121] 抗体は、凍結乾燥された状態でなく水溶性剤形にて存在する場合に、この範囲 50

外の幅広いバリエーションは許容されるが、典型的には約0.1 mg/ml～100 mg/mlの濃度で処方されるであろう。疾患の治療に関しては、抗体または複合体の適切な用量は、先に定義したような治療される疾患の種類、疾患の重症度及び経過、抗体を予防または治療のいずれの目的で投与するか、以前の治療経過、患者の既往歴及び抗体への応答、及び主治医の判断によって決まるであろう。抗体を、一度または一連の治療にわたって、患者に適切に投与する。

【0083】

[122] 疾患の種類及び重症度に応じて、抗体約0.015～15 mg/kg患者体重が、例えば、1またはそれより多くの別々の投与であっても、持続注入であっても、患者へ投与する最初の候補用量である。数日またはそれより長期にわたる反復投与については、状態に応じて、所望の疾患症状の抑制が起こるまで治療を繰り返す。しかしながら、他の投与計画が、有用である可能性もあり、そして除外されない。

10

【0084】

[123] 本発明の治療への応用には、疾患を有する個体の治療方法が含まれる。本発明の方法にて治療される疾患は、CD33発現によって特徴付けられるものである。このような疾患には、骨髓異形成症候群(MDS)、ならびに急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病(CML)及び前骨髓球性白血病(PML)などの癌が含まれる。当業者は、本発明の方法を、未だ記載されていないがしかしCD33の発現によって特徴付けられる、他疾患を治療するのに用いてよいことを、理解するであろう。

【0085】

20

[124] 本発明の治療への適用を、*in vitro*及び*ex vivo*で実行することも可能である。

[125] *In vitro*での使用例には、骨髓系細胞などのCD33陽性細胞が混入した細胞集団を精製することが含まれる。該方法は、細胞毒性My9-6免疫複合体の存在下で細胞集団を培養し、次いで死滅したCD33陽性細胞を除去することを含む。非臨床*in vitro*での使用における条件は、周知である(例えば、Uckunら、1986年、J. Exp. Med. 163, 347-368; Uckunら、1985年、J. Immunol. 134, 3504-3515; Ramakrishnanら、1985年、J. Immunol. 3616-3622を参照されたい)。

【0086】

30

[126] 臨床*ex vivo*での使用例には、異常または悪性の骨髓系細胞を死滅させるために、同じ患者にそれらを注入するのに先立って、自家骨髓の処理をすることが含まれる(Roy D. C. ら、1995年、J. Clin. Immunol. 15, 51-57)。

【0087】

[127] 診断及び研究への応用

[128] 本明細書において論じる抗体の治療への使用に加えて、本発明の抗体を、多くの公知の診断及び研究への適用において使用することが可能である。本発明の抗体を、*in vitro*及び*in vivo*双方での診断法に含まれる、例えばCD33の精製、検出及びターゲティングに用いてもよい。例えば、抗体を、生体試料中の細胞によって発現されるCD33レベルを定性的及び定量的に測定するためのイムノアッセイに用いてもよい。例えば、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual (コールドスプリングハーバー研究所プレス、第二版、1988年)を参照されたく、本明細書ではそのすべてを参照によって援用する。

40

【0088】

[129] 本発明の抗体を、例えば、競合的結合アッセイ、直接的及び間接的サンドイッチアッセイ、及び免疫沈降アッセイにおいて用いてもよい(Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, 147～158ページ(CRCプレスInc.、1987年))。

【0089】

50

[130] 本発明の抗体はまた、*in vivo*画像診断にも有用であり、ここで、放射線不透過剤または放射性同位体などの検出が可能な部分で標識した抗体を、個体に、好ましくは血流中に投与し、そして宿主中の標識抗体の存在及び位置をアッセイする。この画像診断技術は、悪性腫瘍の病期分類及び治療に有用である。抗体は、核磁気共鳴、放射線医学または当該技術分野において公知の他の検出手段のいずれによっても、宿主中において検出が可能な任意の部分で標識してもよい。

【0090】

[131] 標識は、直接的あるいは間接的に検出が可能なシグナルを作り出すことが可能な、検出が可能な任意の部分であることが可能である。例えば、標識は、ビオチン標識、酵素標識（例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ及びセイヨウワサビペルオキシダーゼ）、放射性標識（例えば、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 及び ^{125}I ）、蛍光または化学発光化合物などのフルオロフォア（例えば、フルオレセイン・イソチオシアネート、ローダミン）、造影剤（例えば、 $\text{Tc-}^{99\text{m}}$ 及びインジウム（ ^{111}In ））及び金属イオン（例えば、ガリウム及びユーロピウム）であってもよい。

【0091】

[132] 当該技術分野において公知の、抗体を標識と結合させる任意の方法を使用してもよく、Hunterら、1962年、*Nature* 144:945；Davidら、1974年、*Biochemistry* 13:1014；Painら、1981年、*J. Immunol. Meth.* 40:219；Nygren, J., 1982年、*Histochem. and Cytochem.* 30:407によって記載されたこれらの方法が含まれる。

【0092】

[133] 本発明の抗体はまた、親和性精製剤としても有用である。この過程では、抗体を、セファデックス樹脂またはろ紙などの適当な担体上に、当該技術分野において周知の方法を用いて固定化する。このように、CD33を、生体試料から単離及び精製してもよい。

【0093】

[134] ポリヌクレオチド、ベクター、宿主細胞、及び抗体の作製方法

[135] 本発明は、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをコードするヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを、さらに提供する。

【0094】

[136] 本発明はまた、CD33と結合が可能なポリペプチドをコードし、そしてストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件下で本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドとハイブリダイズする、ポリヌクレオチドも包含し、ここで、前記ストリンジェントなハイブリダイゼーションの条件は、以下： $6\times\text{SSC}$ 、0.5%SDS、 $5\times\text{Denhardt's}$ 溶液及び $100\mu\text{g/ml}$ 熱変性サケ精子DNA中で、 60°C にて2時間のプレハイブリダイゼーション； 60°C にて18時間のハイブリダイゼーション； $4\times\text{SSC}$ 、0.5%SDS、0.1%ピロリン酸ナトリウム中で 60°C にて30分間の2回洗浄、及び、 $2\times\text{SSC}$ 、0.1%SDS中で 60°C にて30分間の2回洗浄、を含む。

【0095】

[137] 当該技術分野において公知の任意の方法によって、ポリヌクレオチドを得て、そしてポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定してもよい。例えば、抗体のヌクレオチド配列が公知であるならば、抗体をコードするポリヌクレオチドを、化学合成オリゴヌクレオチドから構築してもよく（例えば、Kutmeierら、1994年、*BioTechniques* 17:242において記載されるように）、これは、簡潔に言えば、抗体をコードする配列の一部分を含有する重複したオリゴヌクレオチドの合成、これらのオリゴヌクレオチドのアニーリング及び連結、次いで連結したオリゴヌクレオチドのPCRによる増幅を伴う。

【0096】

[138] 抗体のコード配列ならびに適切な転写及び翻訳制御シグナルを含有する組換えベクターの構築方法は、当該技術分野において周知である。これらの方法には、例えば、*in vitro*組換えDNA技術、合成技術及び*in vivo*遺伝子組換えが含まれる。このように、本発明は、本発明の抗体分子、またはその重鎖もしくは軽鎖、または重鎖もしくは軽鎖可変ドメイン、または任意のこれらのエピトープ結合フラグメントをコードする、プロモーターに機能可能なように連結されたヌクレオチド配列を含む、複製可能なベクターを提供する。

【0097】

[139] 組換えベクターを慣用の技術によって宿主細胞へ移行させ、次いでトランスフェクトされた細胞を慣用の技術によって培養し、本発明の抗体を産生する。このように、本発明は、本発明の抗体またはそのエピトープ結合フラグメントをコードする、異種プロモーターに機能可能なように連結されたポリヌクレオチドを含有する、宿主細胞を含む。好ましい態様において、免疫グロブリン分子全体を発現させるために、重鎖及び軽鎖の双方をコードするベクターを、宿主細胞中で同時発現させてもよい。

【0098】

[140] 多様な宿主-発現ベクター系を、本発明の抗体分子を発現させるのに利用してもよい。このような宿主-発現系とは、それによって目的のコード配列を産生し、続いて精製してもよい媒体を表すが、しかし、適切なヌクレオチドのコード配列を用いて形質転換またはトランスフェクトされた場合は、本発明の抗体分子を*in situ*にて発現してもよい細胞もまた表す。これらには、限定されるわけではないが、抗体のコード配列を含有する組換えバクテリオファージDNA、プラスミドDNAまたはコスミドDNA発現ベクターを用いて形質転換された細菌（例えば、大腸菌、枯草菌（*B. subtilis*））などの微生物体；抗体のコード配列を含有する組換え酵母発現ベクターを用いて形質転換された酵母（例えば、サッカロマイセス（*Saccharomyces*）、ピキア（*Pichia*））；抗体のコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、バキュロウイルス）を用いて感染させた昆虫細胞系；抗体のコード配列を含有する組換えウイルス発現ベクター（例えば、カリフラワーモザイクウイルス、CaMV；タバコモザイクウイルス、TMV）を用いて感染させた植物細胞系、または、抗体のコード配列を含有する組換えプラスミド発現ベクター（例えば、Tiプラスミド）を用いて形質転換された植物細胞系；あるいは、哺乳動物細胞ゲノム由来のプロモーター（例えば、メタロチオネインプロモーター）または哺乳動物ウイルス由来のプロモーター（例えば、アデノウイルス後期プロモーター；ワクシニアウイルス7.5Kプロモーター）を含有する、組換え発現コンストラクトを保有する哺乳動物細胞系（例えば、COS、CHO、BHK、293、3T3細胞）が含まれる。

【0099】

[141] 特に組換え抗体分子全体を発現させるためには、好ましくは大腸菌などの細菌細胞、及びより好ましくは真核細胞を、組換え抗体分子の発現に用いる。例えば、ヒトサイトメガロウイルス由来の主な中間初期遺伝子プロモーターエレメント（intermediate early gene promoter element）などのベクターと連動した、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）などの哺乳動物細胞は、抗体に対する効果的な発現系である（Foeckingら、1986年、Gene 45:101；Cockettら、1990年、Bio/Technology 8:2）。

【0100】

[142] 長期にわたって組換えタンパク質を高収率に産生するには、安定した発現が好ましい。例えば、抗体分子を安定に発現する細胞株を、操作してもよい。ウイルスの複製起点を含有する発現ベクターを用いずに、宿主細胞を、適切な発現制御エレメント（例えば、プロモーター、エンハンサー、配列、転写ターミネーター、ポリアデニル化部位など）及び選択マーカーによって制御されたDNAを用いて形質転換することが可能である。外来DNAの導入後に、操作した細胞を、強化培地中で1～2日間増殖させてもよく、次いで、選択培地へと切り替える。組換えプラスミド中の選択マーカーは、選択に対する耐

10

20

30

40

50

性を与え、そして、細胞がその染色体内にプラスミドを安定に組込み、そして、増殖して、今度はクローニング及び細胞株へと発展させることが可能な巣 (foci) を形成することを可能にする。この方法を、有利には、抗体分子を発現する細胞株を操作するのに用いてもよい。このような操作された細胞株は、直接または間接的に抗体分子と相互作用する化合物をスクリーニング及び評価する場合に、特に有用である。

【0101】

[143] 本発明の抗体分子を組換え技術によって発現させた後、例えば、クロマトグラフィ (例えば、イオン交換、特にプロテインAの後、特異抗原に対する親和性による親和性、及びサイジングカラムクロマトグラフィ)、遠心分離、溶解度の差、またはタンパク質精製のための他の任意の標準的な技術などの、当該技術分野において公知の任意の免疫グロブリン分子精製法によってこれを精製してもよい。

10

【実施例】

【0102】

[144] (実施例)

[145] これより、本発明を以下の実施例に関して記載するが、該実施例は一例に過ぎず、そして本発明を限定することを意図しない。

【0103】

[146] 実施例1. ネズミMy9-6抗体

[147] この最初の実施例において、本発明のネズミMy9-6抗体の完全な一次アミノ酸構造及びcDNA配列を、その結合特性及び組換え型でそれを発現させる手段とともに、開示する。したがって、免疫学の当業者が、必要以上の実験をすることなく前記抗体を作製することが可能なように、本発明の抗体及びその作製についての十分かつ完全な開示が提供される。

20

【0104】

[148] 1. 1. My9-6抗体の作製、産生及び特徴付け

[149] CD33抗原を用いて形質転換された3T3ネズミ線維芽細胞株を、免疫化に用いた。

[150] 5ヶ月齢のBALB/c雌マウスを、形質転換された3T3ネズミ線維芽細胞株 (0.2 mL PBS中に懸濁した、 2.5×10^6 細胞) で、第0日に腹腔内投与により免疫化した。動物を、0.2 mLの細胞懸濁液で以下のように追加免疫した：第13日に 5×10^6 細胞；第21日に 5×10^6 細胞。第24日に、マウスを屠殺し、そしてその脾臓を取り出した。

30

【0105】

[151] 脾臓を、2つの凍らせたスライドガラス間で粉碎し、単一の細胞懸濁液を得て、ペニシリン及びストレプトマイシン (SFM) を含有する無血清RPMI培地で洗浄した。脾臓細胞ペレットを、赤血球を溶解させるために氷上で10分間、0.83% (w/v) 塩化アンモニウム水溶液10 mL中に再懸濁し、次いで、無血清培地 (SFM) で洗浄した。脾臓細胞 (1.6×10^8) を、非分泌型マウス骨髓腫細胞株P3X63Ag8.653 (ATCC、ロックビル、メリーランド州；カタログ番号CRL1580) 由来の骨髓腫細胞 (5.4×10^7) とともにチューブ中にプールし、そして無血清RPMI-1640培地 (SFM) で洗浄した。上清を除去し、そして細胞ペレットを 2×10^7 細胞/mLとなるよう希釈した。細胞を、15 mg/mLコンカナバリンAでコーティングした組織培養プレート上に、 2×10^7 細胞/プレートにて播いた。プレートを、37°Cにて1時間インキュベートした。上清を、穏やかにプレートから除去した。1 mLのポリエチレングリコール溶液 (40% PEG w/v) を、一滴ずつ緩徐に加えた。プレートを回旋させ、そして30秒間インキュベートした。PEGを除去し、そして捨てた。プレートを、5 mLのSFMを緩徐に加え、次いで捨てることによって、二度洗浄した。最終洗浄後に、5 mLの5%胎児ウシ血清 (FBS) 添加SFMを加えた。プレートを37°Cにて一晩インキュベートした。インキュベート後に、細胞を、細胞スクレーパーを用いてプレートからこすり落とし、そしてプールした。プレートをすすぎ、そして細胞とともに

40

50

にプールした。細胞を遠心分離によって沈澱させ、そして5% FBS、ペニシリンースト
レプトマイシン及びヒポキサンチン／アミノプテリン／チミジン（HAT）添加RPMI
-1640増殖培地中に再懸濁した。細胞を、マクロファージ支持細胞層を含有する96
ウェル平底組織培養プレートに、 2×10^5 細胞／ウェルにて播いた。免疫化及びハイブ
リドーマ作出に用いた一般的条件は、J. Langone及びH. Vunakis（編集
、Methods in Enzymology, 第121巻、「Immunochemical
Techniques, Part I」；1986年；アカデミックプレス、
フロリダ州）及びE. Harlow及びD. Lane（「Antibodies: A Laboratory
Manual」；1988年；コールドスプリングハーバー研究所
プレス、ニューヨーク州）によって記載されたとおりである。他の免疫化及びハイブリ
ドーマ作出技術を、当業者に周知のように用いることも可能である。 10

【0106】

[152] ハイブリドーマクローンから得た培養上清を、CD33抗原をトランスフェク
トされた細胞及びヒト組織球性リンパ腫細胞株U-937（ATCC CRL-1953
、2）への結合、ならびにマウス線維芽細胞株への結合の欠如について、スクリーニング
した。これらのクローンを、増やしそしてサブクロニングした。サブクロンの培養上
清を、前述の結合アッセイによってさらにスクリーニングした。この手順により、サブク
ローン3E7-H2-3D8（My9-6）を選択し、そして以下に記載するように重鎖
及び軽鎖遺伝子をクローニングしそして配列決定した。

【0107】

[153] CD33抗原への特異的結合についてのハイブリドーマ上清のスクリーニング
を、この抗原を発現する細胞株及びこの抗原に対して陰性の細胞株において、ELISA
を用いて行った。細胞を組織培養フラスコから別々に回収し、10% FBS含有増殖培地
中に懸濁し、遠心分離によって沈澱させ、そしてPBSで洗浄した。洗浄した細胞（約
 $1 \sim 3 \times 10^6$ 細胞/mL 100 μ L）を、フィットヘマグルチニン（20 μ g/mL P
HA 100 μ L）でコーティングしたイムロン-2HBプレートのウェルに加え、遠心
分離し、そして10分間、PHAでコーティングしたウェルに接着させた。細胞の付いた
プレートを軽く叩いてPBSを除去し、次いで37℃にて一晚乾燥させた。ウェルを、5
mg/mL BSAを含むPBS溶液で37℃にて1時間ブロッキングし、そしてPBS
でやさしく洗浄した。次いで、ハイブリドーマクローンから得た上清のアリコット（10
0 μ L；ブロッキングバッファー中に薄めた）を、CD33抗原発現細胞及びCD33を
発現していない細胞を含有するウェルに加え、そして外界温度にて1時間インキュベート
した。ウェルをPBSで洗浄し、ヤギ抗マウスIgG抗体-セイヨウワサビペルオキシダー
ゼ複合体（100 μ L；ブロッキングバッファー中）とともに1時間インキュベートし
、続いて洗浄し、次いで結合をABTS/H₂O₂基質を用いて検出した。CD33抗原
を過剰発現している細胞とともにインキュベートした場合に3E7ハイブリドーマサブク
ローンから得られた典型的な上清は、CD33抗原に陰性の細胞とともにインキュベート
した場合に得られた0.10吸光度単位の値とは対照的に、0.50吸光度単位のシグナ
ルをもたらした。 30

【0108】

[154] ハイブリドーマを、BALB/cマウスの腹水中で増殖させた。凍結ハイブリ
ドーマ細胞のバイアルを解凍し、そして細胞を組織培養フラスコ中で増やし、腹水での産
生に必要な細胞数を得た。初回抗原刺激を受けたBALB/cマウス（10～14日前に
、プリスタン0.5mLをマウスに腹腔内注射しておいた）に、リン酸緩衝生理食塩液（
PBS）0.5mL中の 1×10^6 細胞を腹腔内注射した。細胞を注射後第12～18日
に、腹水をマウス腹腔からシリンジで回収した。プールした腹水を1000rpmにて5
分間遠心分離し、次いで上清を、12,000rpmにて30分間の遠心分離にかけた。
抗体を、清澄な上清から以下のように精製した：工程1：硫酸沈澱。氷上の上清を二倍量
の冷PBSで希釈し、攪拌し、次いで一倍量の冷飽和（100%）硫酸溶液で緩徐に処理
した。沈澱物を遠心分離によって回収したとき、溶液は、約5時間氷上に立てたままであ 40 50

った

。ペレットを少量のPBS中に溶解し、そしてその結果生じた溶液を、プロテインAを用いた親和性精製工程のため、バッファー中に透析した。工程2：セファロースプロテインAでの親和性精製。ネズミMy9-6のアイソタイプは、 κ 軽鎖を有するIgG1である。したがって、親和性カラムを、3M NaCl、pH8.0を含有する0.1MトリスHClバッファー中で平衡化した。同じバッファーの抗体溶液をカラムに通し、カラムを平衡化バッファーでよく洗浄し、次いで0.15M NaClを含有する0.1M酢酸で溶出した。画分を、280nmにてUV吸光度を測定することによってアッセイした。抗体を含有する画分を混ぜ合わせ、1Mトリスで中和し、次いで、使用及び保管のためPBS中に透析した。

10

【0109】

[155] 最初に、精製抗体を、トランスフェクトされたマウス3T3線維芽細胞株及びヒトU-937細胞株などのCD33発現細胞との結合、ならびに、ハイブリドーマ上清のスクリーニングについて先に記載したような、抗原に陰性の細胞株との結合の欠如について、特徴付けた。

【0110】

[156] CD33抗原へのその結合特異性をさらに確かめるために、標識muMy9-6と商業的に入手可能な抗CD33抗体My9との間で、競合的結合実験を行った。結合実験を、Goldmacherら(1989年、J. Cell. Physiol. 141, 222-234)によって記載された方法を用いて行った。ネズミMy9-6抗体を、ヨードジェン(Iodogen)技術(Fraker, P. J. 及びSpeck, J. C., 1978年、Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 849-857)を用いて、 ^{125}I で放射性標識した。 ^{125}I -標識muMy9-6の一定量(3×10^{-9} M)を、非標識muMy9-6または非標識My9のいずれかである非放射性標識抗体の濃度増加を伴ったものと混合し、そして、混合物を、4℃にて30分間、細胞(一試料につき 1×10^6 細胞)とともにインキュベートした。これらのインキュベーションを、2.5%ヒト血清を添加した、懸濁培養用に改変された最小必須培地(SMEM)からなるバッファー60 μl 中で行った。次いで、細胞を、1.009 g/mlの密度のシリコン油(アルドリッチ)及びパラフィン油(ベーカー)の混合物を介した遠心分離によって、非結合物質を含有する培地から分離した。次いで、細胞ペレットを、油の界面にて遠心分離用チューブを切ることによって取り出し、そしてガンマ計数器(LKBのモデルRIAGamma 1274)にて細胞に付随した放射活性を測定するのに用いた。測定した細胞に付随した放射活性を、非標識競合抗体の濃度に対してプロットした。結果を、図1に示す：My9及びMy9-6の双方の抗体は、非常に類似した競合結合曲線を与えた。このことは、My9及びMy9-6が同じ抗原に結合し、そしてさらに、双方の抗体が非常に類似した結合力を有することを実証する。My9は公開されそして認容された抗CD33標準品であることから、My9-6は抗CD33抗体であると結論づけられた。My9抗体は、バイオジェネックス(サンラモン、カリフォルニア州94583；カタログ番号AM267-5M)から商業的に入手可能である。

20

30

【0111】

[157] 1. 2. My9-6抗体の重鎖及び軽鎖遺伝子のクローニング

[158] 全RNAを、My9-6ハイブリドーマ細胞でコンフルエントなT175フラスコから、Molecular Protocols (NB1455-p173)において記載されるように、精製した。RNA完全性を、1%MOPSゲル上で確認し、そして濃度をUV分光光度法によって測定した。RT反応を、ギブコ・スーパースクリプトIIキット、及びオリゴdTまたはランダム六量体プライマーのいずれかを用いて、4~5 μg のトータルRNAで行った。

【0112】

[159] PCR反応を、Coら(1992年、J. Immunol. 148(4): 1149-54)において記載されたRACE法を用いること、及びWangら(2000

40

50

年、J. Immunol. Methods. 233:167-177)において記載された縮重プライマーを用いることの双方によって、行った。RACE PCRは、第一鎖cDNAの3'末端にポリdGテールを加える中間工程を必要とした。RT反応物を、Qiagen easy (キアゲン) カラムで精製し、そして50 µlの1x NEBバッファー4中に溶出した。dGテーリング反応は、1x NEBバッファー4中、0.25 mM CoCl₂、1 mM dGTP、および5ユニットのターミナルトランスフェラーゼ (NEB) とともにある溶出物で行った。混合物を、37℃にて30分間インキュベートし、次いで反応混合物の1/5 (10 µl) を、鋳型DNAとして働くようにPCR反応混合物に直接加えた。

【0113】

[160] RACE及び縮重PCR反応は、プライマー及び鋳型の違いを除き同一であった。前述のように、末端トランスフェラーゼ反応混合物を、RACE PCRの鋳型に対して直接使い、一方で、RT反応混合物を、縮重PCR反応に対して直接用いた。双方の反応セットにおいて、同じ3'軽鎖プライマーHindKL:

TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGATACAGTTGGTGC (配列番号11)

及び、3'重鎖プライマーBgl2IgG1:

GGAAGATCTATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTGGC (配列番号12)

を用いた。

【0114】

[161] RACE PCRでは、1つのポリdC 5'プライマーであるEcoPolydC: TATATCTAGAAATTC CCCCCCCCCCCCCCCCCC (配列番号13) を、重鎖及び軽鎖の双方について用いたが、一方、縮重5'末端PCRプライマーは、軽鎖については、Sac1MK: GGGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA (配列番号14)、ならびに重鎖については、EcoR1MH1: CTCCTCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTCTC (配列番号15) 及びEcoR1MH2: CTCCTCGGAATTC SARGTNMAGCTGSAGSAGTCTCWGG (配列番号16) の等量混合物であった (混合塩基: H=A+T+C、S=G+C、Y=C+T、K=G+T、M=A+C、R=A+G、W=A+T、V=A+C+G、N=A+T+G+C)。

【0115】

[162] PCR反応を、Wangら (2000年、J. Immunol. Methods. 233:167-177) から改作したプログラム: 1) 94℃にて3分間; 2) 94℃にて15秒間; 3) 45℃にて1分間; 4) 72℃にて2分間; 5) 工程2に戻って29回サイクルを行い; 6) 72℃にて10分間の最終伸長工程で終了する、を用いて、MJリサーチの温度サイクラーで行った。PCRプライマーによって作り出されたPCR産物を、制限酵素を用いてpBluescript II SK+ (ストラタジーン) 中にクローニングした。重鎖及び軽鎖のクローンを、ラク・テクノロジーズまたはSeqwrightのシーケンシングサービスによって、配列決定した。

【0116】

[163] RACE PCRは、My9-6軽鎖については決して成功しなかった。したがって、5'末端cDNA配列を確認するために、追加の縮重PCR及びクローニングを行った。縮重PCRクローンから決定されたMy9-6軽鎖のcDNA配列を、NCBIのブラストサーチウェブサイト (ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/) に入力し、そして、シグナル配列を有する、提示された上位5つのネズミ抗体配列を、保存した。縮重PCRプライマーを、コードホップ (Codehop) ウェブソフトウェア (blocks.fhcrc.org/codehop.html) を用いて、これらのシグナルペプチドから設計した。EcoRI制限酵素認識部位を、コードホップ縮重プライマーの3つ (図2) に加え、そしてこれらを、前述のようなRT-PCR反応において用

10

20

30

40

50

いた。

【0117】

[164] 1. 3. 重鎖及び軽鎖試料の調製及び配列決定

[165] muMy9-6抗体の重鎖及び軽鎖を、還元条件下でSDS-PAGEによって分離した。還元及び変性させた抗体を、12%トリス・グリシンゲル（ノベックス、サンディエゴ、カリフォルニア州）上で電気泳動した。電気泳動後に、ゲルを、CAPS/MeOHバッファーを用いてイモビロン^{PSQ}膜上にブロッティングした。転写後に、膜をボンソーSで染色した。軽鎖及び重鎖に相当するバンドを、タンパク質の配列決定のために切り取った。

【0118】

10

[166] 抗体の軽鎖を、自動エドマン分解化学反応によって、ABI 494 Prociseシーケンサーで膜から直接的に配列決定した。

[167] 重鎖のN-末端を遮断し、そして、タンパク質を、in situにて、Gharahdaghiら（1996年）にしたがいトリプシンで消化した。次いで、消化混合物を、MALDI-TOF質量分析法によって、Kratos Kompact SEQ装置で解析した。選択されたペプチドは、その配列を決定するためにMS/MSにかけた。

【0119】

[168] 実施例2. 表面再構築化による抗体可変領域のヒト化

[169] 治療剤または診断剤に適したヒト化型を提供するための、My9-6抗体の表面再構築化を、米国特許第5,639,641に開示された原理及び方法にしたがい、そして以下のように、一般的には進める。

20

【0120】

[170] 2. 1. 表面の予測

[171] 構造が解明されている抗体セットの可変領域残基の溶媒露出度を、ネズミMy9-6抗体可変領域の表面残基を予測するのに用いた。127の独特の抗体構造ファイルのセット（図3）について、アミノ酸の溶媒露出度を、MCソフトウェアパッケージ（Pedersenら、1994年、J. Mol. Biol. 235（3）：959-973）を用いて計算した。この127の構造のセットに由来する、最も類似した10の軽鎖及び重鎖アミノ酸配列を、NCBIウェブサイト（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/）の配列整列化ソフトウェアを用いて決定した。これらの10の抗体可変領域の各可変領域残基についての平均溶媒露出度を、エクセル集計表を用いて計算し、そして30%よりも大きな平均露出度を伴う位置を、表面残基とみなした。25%～35%の平均露出度を伴う位置を、両側に隣接する2つの同一な残基を有するこれらの構造のみについて、個々の残基の露出度を計算することによって、さらにみなした。

30

【0121】

[172] 2. 2. 分子モデリング

[173] ネズミMy9-6の可変領域の分子モデルを、オックスフォード・モレキュラー・ソフトウェアパッケージAbMを用いて作製した。抗体フレームワークを、最も類似したアミノ酸配列を有する抗体（軽鎖についてはlsbs、及び重鎖についてはlbbj）についての構造ファイルから構築し、そして非正準のCDRを、重複のない解明されている構造を含有するC-a構造データベースを検索することによって、構築した。モデルを、グラクソ・スミス・クライン・スイス-Pdbビューアーを用いて視覚化し、そしてCDRから5 Å以内に位置する残基を決定した。

40

【0122】

[174] 2. 3. ヒト抗体の選択

[175] ネズミMy9-6可変領域の表面位置を、Kabatデータベース（Johnson及びWu、2001年、Nucleic Acids Res. 29（1）：205-6）中のヒト抗体の配列において対応する位置と比較した。抗体データベース管理ソ

50

フトウエアSR (Searle, 1998年)を用いて、天然の重鎖及び軽鎖ヒト抗体対に由来する表面残基を抽出及び整列化した。CDRから5 Å以内に入る位置を特別に考慮して、最も同一性の表面残基を有するヒト抗体可変領域の表面を、ネズミMy9-6抗体可変領域の表面残基を置換するのに選んだ。

【0123】

[176] 2. 4. PCR突然変異誘発によるヒト化抗体遺伝子の構築

[177] PCR突然変異誘発を、ネズミMy9-6可変領域のcDNAクローンについて行い、まず5'末端配列をペプチド配列と一致するように変え、次いで表面再構築化ヒトMy9-6遺伝子を構築した。プライマーセットを、最初の縮重PCRクローンにおいて元々配列決定されなかったネズミ残基(軽鎖位置N1、M3、L4及びS7、ならびに重鎖位置Q3及びP7)を作出するように、設計した。

10

【0124】

[178] ヒト化のプライマーセットを、hMy9-6のすべての型に必要なとされる6アミノ酸の変更を行うように設計し、そして追加のプライマーを、4つの5 Å残基を選択的に変えるように設計した(図4)。PCR反応を、以下のプログラムを用いてMJリサーチの温度サイクラーで行った: 1) 94 °Cにて1分間; 2) 94 °Cにて15秒間; 3) 55 °Cにて1分間; 4) 72 °Cにて1分間; 5) 工程2に戻って29回サイクルを行い; 6) 72 °Cにて4分間の最終伸長工程で終了する。PCR産物を、それらに対応する制限酵素で消化し、pBluescriptクローニングベクター中にクローニングした。クローンを配列決定してアミノ酸の変化を確認した。

20

【0125】

[179] 2. 5. ヒト化抗体の発現ベクター

[180] 軽鎖及び重鎖対の配列を、一つの哺乳動物発現ベクター中にクローニングした。ヒト可変配列に対するPCRプライマーは、ヒトシグナル配列をpBluescript IICクローニングベクター中に加えることを可能にする制限酵素認識部位を作出した。次いで、軽鎖または重鎖の可変配列それぞれを、EcoRI及びBsiWIまたはHindIII及びApaIを有する哺乳動物発現プラスミド中にクローニングすることが可能であった(図5)。軽鎖可変配列を、ヒトIgKappa定常領域上にインフレームでクローニングし、そして重鎖可変配列を、ヒトIgGamma1定常領域配列中にクローニングした。最終的な発現プラスミドでは、ヒトCMVプロモーターが、軽鎖及び重鎖双方のcDNA配列の発現を駆動する。

30

【0126】

[181] 2. 6. ヒト化抗体の一時的な発現

[182] 293T細胞を、ダルベッコ改変イーグル培地(DMEM、バイオウィッタカー、12-614F)、10%熱不活化胎児ウシ血清(ハイクロン、SH30071.03)、4mM L-グルタミン(バイオウィッタカー、17-604E)及び1%ペニシリン/ストレプトマイシン混合物(バイオウィッタカー、17-603E)中で、6%CO₂下で、37°Cインキュベーターにて培養した。細胞を、週に3回、1:10希釈で分割し、サブコンフルエントな集団を維持した。トランスフェクションの24時間前に、細胞をトリプシン(バイオウィッタカー、17-161E)処理し;生細胞を、トリパンブルー排除法で計数し、そして10cmの組織培養処理プレート(コーニング、430167)上に2x10⁶細胞/プレートの密度で播いた。トランスフェクションの直前に、細胞をリン酸緩衝生理食塩液(バイオウィッタカーの10xPBS、17-517Qから薄めたPBS)で穏やかに洗浄し、そして細胞を、1%超低IgG血清(ギブコBRL、16250-078)を含むハイブリドーマSFM(インビトロジェン、12045-076)7mLで覆った。

40

【0127】

[183] 一過性トランスフェクション法を、標準的なキアゲン・ポリフェクトプロトコールから改作した。1枚の10cmプレートにトランスフェクトするのに、8µgのCsClグレードDNAを、ハイブリドーマSFM 300µL及びポリフェクトトランスフ

50

ェクション試薬 80 μ L (キアゲン、301107) と混合した。トランスフェクション混合物を、低速度で約 5 秒間ボルテックスし、そして外界温度にて 5 分間インキュベートした。インキュベーション後に、1 mL のハイブリドーマ SFM、1 % 超低 IgG 血清をトランスフェクション混合物に加え、そしてピペット操作を上下に約 5 回行うことによって混合した。次いで、トランスフェクション混合物を、細胞を覆っているハイブリドーマ SFM 7 mL に加え、そして、均等な分布を保証するために、プレートを穏やかに回旋させた。トランスフェクション反応物を、組織培養インキュベーターにて、一晚、一般的には 16 時間インキュベートした。次いで、トランスフェクション培地を注意深く細胞から取り除き、そして 20 mL のハイブリドーマ SFM、1 % 超低 IgG 血清と取り替えた。次いで、トランスフェクトされた細胞をインキュベーターに 72 時間戻した後に、上清を回収し、そして抗体産生を ELISA で定量した。回収した上清は、精製するまで 4 $^{\circ}$ C にて保管した。

10

【0128】

[184] 2. 7. ヒト化抗体の精製

[185] 上清を、1 / 10 量の 1 M トリス / HCl バッファー、pH 8. 0 を加えることによって、プロテイン A 親和性クロマトグラフィ用に調製した。pH を調整した上清を、0. 22 μ m フィルター膜を通してろ過し、そして、結合バッファー (PBS、pH 7. 3) で平衡化したプロテイン A セファロースカラム (ハイトラップ・プロテイン A HP、1 mL、アマシャム・バイオサイエンス) に添加した。Q-セファロースプレカラム (10 mL) を、DNA などの細胞物質からの混入を低減するために、試料添加中にプロテイン A カラムの上流に連結した。試料添加後に、プレカラムを除去し、そして、洗浄及び溶出を行うために、プロテイン A カラムの方向を逆にした。カラムを、280 nm にて吸光度のない安定なベースラインを得るまで、結合バッファーで洗浄した。抗体を、0. 15 M NaCl、pH 2. 8 を含有する 0. 1 M 酢酸バッファーで、0. 5 mL / 分の流速を用いて溶出した。およそ 0. 25 mL の画分を集め、そして 1 / 10 量の 1 M トリス / HCl、pH 8. 0 を加えることによって中和した。ピークの画分を、PBS、pH 7. 3 に対して一晚透析した。抗体量を、280 nm における吸光度を測定することによって定量し、そして抗体濃度を、 $E_{280}^{0.1\%} = 1.4$ と想定して計算した。吸光スペクトル分析及び SDS-PAGE を、抗体画分について、その純度を確認するために行った。

20

30

【0129】

[186] 実施例 3. ヒト化抗体の試験

[187] 3. 1. 結合解析用細胞の増殖

[188] HL-60 細胞を、米国菌培養収集所 (American Type Culture Collection) から得た (ATCC# CCL-240)。これを、5 % CO₂ 雰囲気 37 $^{\circ}$ C ウォータージャケット付きインキュベーター (ナプコ・サイエンティフィック Co.、チュアリタン、オレゴン州) 中に維持した。細胞を、10 % 胎児ウシ血清 (ハイクロン、ローガン、ユタ州) に加えて 50 μ g / mL の硫酸ゲンタマイシン (ライフテクノロジーズ、グランドアイランド、ニューヨーク州) を含有する、L-グルタミン添加 RPMI 培地 (バイオウィッタカー、ウォーカーズビル、メリーランド州) 中で増殖させた。

40

【0130】

[189] 3. 2. HL-60 細胞における直接的結合アッセイ

[190] HL-60 細胞を T75 フラスコ (NUNC LON T M、カタログ番号 153732) から回収し、そして、4 $^{\circ}$ C にて、約 300 x g で 5 分間、オムニフュージ RT 卓上遠心分離機 (ヘレウス・セパレーションズ、ドイツ) 中で遠心分離した。細胞を、3 x 10⁶ 細胞 / mL の密度で、2 % (v / v) ヤギ血清 (シグマケミカル Co.、セントルイス、ミズーリ州) を含む L-グルタミン添加 MEM アルファ培地 (ライフテクノロジーズ、グランドアイランド、ニューヨーク州) からなる FACS バッファー中に再懸濁した。マルチチャンネルピペッターを用いて、3 x 10⁵ 細胞を、ファルコン 96 ウェル丸底

50

プレート（カタログ番号 3077）のウェルに加え、次いで氷上に置いた。ファルコン 96 ウェルフレキシブルアッセイプレート（カタログ番号 353911）を用いて、11 の各試験品または対照品の 2 倍段階希釈物を、FACS バッファーで、開始濃度 2×10^{-8} M から、二つ組で作製した。次に、試験品又は対象品のいずれかを細胞に混合した。対照ウェルには、FACS バッファーのみを入れた。プレートを氷上で 1 時間インキュベートし、次いで、冷却遠心分離機中で、 $300 \times g$ にて 5 分間遠心分離した。試薬を、10 % 漂白剤を含有する廃棄用ビーカー上で速やかに逆さまにすることによって、プレートのウェルから取り除いた。細胞を、穏やかにボルテックスすることによって再懸濁し、冷 FACS バッファーで一度洗浄し、遠心分離し、次いで、穏やかにボルテックスしながら再懸濁した。FITC 標識ヤギ抗ヒト IgG（ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ、ウエストグロブ、ペンシルバニア州、カタログ番号 109-096-003）及び FITC 標識ヤギ抗マウス IgG（ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ、ウエストグロブ、ペンシルバニア州、カタログ番号 109-095-088）を FACS バッファー中に 1:100 希釈し、そして $100 \mu\text{l}$ をアッセイプレートの適切なウェルに加えた。次いで、プレートをさらに 1 時間、氷上で遮光してインキュベートした。結合していない二次抗体を、上記と同じ方法で、ウェルから洗浄した。細胞を、穏やかにボルテックスすることによって再懸濁し、次いで $120 \mu\text{l}$ / ウェルの 1 % ホルムアルデヒドを含むリン酸緩衝食塩液（PBS、10 mM リン酸カルシウム、150 mM 塩化ナトリウム、pH 7.2）を加えることによって固定化した。次いで、アッセイプレートを、自動 96 ウェルサンプリング装置とインターフェースで接続した FACS scan フローサイトメーター（ベクトン・ディッキンソン、マウンテンビュー、カリフォルニア州）において、解析した。

【0131】

[191] 3. 3 形質膜の調製

[192] 形質膜を、Vater ら（1995 年）に記載された手順にしたがって調製した。簡潔に言えば、HL-60 細胞を、10 % 胎児ウシ血清及び $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ の硫酸ゲンタマイシンを含有する、L-グルタミン添加 RPMI 中で、 1×10^6 細胞/ mL の密度となるまで増殖させた。全部で 1×10^9 細胞を得たときに、細胞を回収し、オムニフュージ RT 遠心分離機で約 $300 \times g$ にて回転させ、ハンクス平衡塩溶液（ライフテクノロジーズ、カタログ番号 14175-095）で洗浄し、そして 1 本の 50 mL コニカル遠心分離用チューブ中に合わせた。次いで、ペレットを、細胞の溶解及び均質化を促進するため、 -80°C にて少なくとも 24 時間凍結した。形質膜を調製するために、ペレットを 37°C にて速やかに解凍し、次いで氷上に保管し；その後のすべての工程を、 4°C にて行った。HL-60 細胞ペレットを、1 mM EDTA、0.25 M ショ糖及び 1 mM フッ化フェニルメチルスルホニル（PMSF）を含有する、8 mL の 10 mM トリス-HCl バッファー、pH 7.0 中に再懸濁した。次いで、細胞ペレットを、細胞を破壊する（ぴったりはまるハウケイ酸ガラス乳棒で 20 打）ために、15 mL ダウンス組織グライNDER（ウィートン、ミリビル、ニュージャージー州）に移した。ホモジネートを、SS-34 ローター（ウィルミントン、デラウェア州）を用いて、ソーバル RC-5B 冷却超高速遠心分離機で、 6000 rpm にて 10 分間遠心分離し、そして上清を注意深くペレットから除いた。ペレットを、8 mL のバッファーでもう一度洗浄し、そして前述のように処理した。混ぜ合わせた上清を、10 mM トリス-HCl、1 mM PMSF、1 mM EDTA、pH 7.0 の 37 % ショ糖クッションバッファー 1 mL 上に層状に重ね、そしてさらに、SW55ti ローター（ベックマン・インスツルメンツ、パロアルト、カリフォルニア州）を用いて、予め冷却しておいたベックマン L8-M 超遠心分離機で、 $33,000 \text{ rpm}$ にて 70 分間処理した。ショ糖クッションのすぐ上にあるオパールのような光彩を放つ膜の層を、各チューブから取り除き、そして 4 倍量の 10 mM トリス-HCl、1 mM EDTA、1 mM PMSF、pH 7.0 で希釈した。次いで、この溶液を、超遠心分離機で、 $18,000 \text{ rpm}$ にてさらに 30 分間遠心分離した。上清を注意深く抜き取り、そして結果として得られたペレットを、10 mM トリス-HCl、1 mM E

D T A、1 m M P M S F、p H 7. 0 中に再懸濁した。H L - 6 0 膜調製物を、1. 5 m L 無菌スクリーキャップエッペンドルフチューブに等分して入れ、液体窒素中で凍らせ、次いで - 8 0 ° C にて、使用のために保管した。最終調製物の総タンパク質濃度を、ピアス T M B C A アッセイ（ピアス・ケミカルカンパニー、ロックフォード、イリノイ州、カタログ番号 2 3 2 3 5）を用いて測定した。

【0 1 3 2】

[193] 3. 4. H L - 6 0 膜における直接的結合アッセイ

[194] 前述のように調製した H L - 6 0 膜を、脱イオン水中の開始濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ にて、イムロン 2 9 6 ウェルアッセイプレート（ダイネックス・ラボラトリーズ、チャンティリー、バージニア州）のポリスチレン表面上で、ラボコンコの吸引デシケーター（ラボコンコ、Corp、カンサスシティ、ミズーリ州）を用いて、外界温度にて一晩乾燥させた。次いで、E L I S A プレートを、1 % ウシ血清アルブミン画分 V（シグマールドリッチ、Inc.、セントルイス、ミズーリ州、カタログ番号 A - 3 2 9 4）、0. 0 5 % T w e e n - 2 0（シグマールドリッチ・Inc.、セントルイス、ミズーリ州、カタログ番号 P - 2 2 8 7）溶液を含むトリス緩衝生理食塩液（5 0 m M トリス - H C l、1 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7. 5、T B S）で、3 0 0 μL /ウェルにて、3 7 ° C で 1 時間ブロッキングした。このブロッキング工程の後に、プレートからブロッキングバッファーを流し出し、そしてペーパータオル上に水分を吸い取った。試験または対照試薬の、2 つの 3 倍段階希釈物を、ブロッキングバッファー中で 3.13×10^{-9} M から開始して 5.29×10^{-14} M に漸減させて、フレキシブル 9 6 ウェルアッセイプレートに四つ組で作製した。陰性対照ウェルは、ブロッキングバッファーのみを含有した。5 0 μL の各希釈物を、膜でコーティングしたアッセイプレートの指定したウェルに移し、次いでこのプレートを 4 ° C にて一晩インキュベートした。次いで、ウェルの中身を吸引して 1 0 %（v/v）漂白剤を含有する廃棄用フラスコに入れ、そしてプレートを、0. 1 %（v/v）T w e e n - 2 0（洗浄バッファー）を含有する T B S で 3 回洗浄し、そしてペーパータオル上に水分を吸い取った。結合している抗 M y 9 - 6 抗体量を、適切なウェルにおいて、ブロッキングバッファー中で 1 : 1 0 0 0 希釈したヤギ抗マウス I g G - H R P またはロバ抗ヒト I g G - H R P を用いて検出した。これらの二次抗体を、アッセイプレートで、遮光、室温にて 1 時間インキュベートした。前述同様に、プレートを洗浄しそして水分を吸い取った。プレートを、T M B（バイオ F X ラボラトリーズ、ランダルズタウン、メリーランド州、カタログ番号 T M B W - 0 1 0 0 - 0 1）を用いて発色し、次いで停止溶液（バイオ F X ラボラトリーズ、ランダルズタウン、メリーランド州、カタログ番号 S T P R - 0 1 0 0 - 0 1）で反応を止めた。アッセイプレートを、タイターテック（登録商標）マルチスキャンプラス M K I I プレートリーダー（ハンツビル、アラバマ州）を用いて、A 4 5 0 n m にて読み取った。

【0 1 3 3】

[195] 3. 5. H L - 6 0 膜における競合的結合アッセイ

[196] 前述のように調製した H L - 6 0 膜を、脱イオン水中の開始濃度 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ にて、イムロン 2 9 6 ウェルアッセイプレート（ダイネックス・ラボラトリーズ、チャンティリー、バージニア州）のポリスチレン表面上で、ラボコンコの吸引デシケーター（ラボコンコ、Corp、カンサスシティ、ミズーリ州）を用いて、室温にて一晩乾燥させた。次いで、E L I S A プレートを、1 % ウシ血清アルブミン画分 V（シグマールドリッチ、Inc.、セントルイス、ミズーリ州、カタログ番号 A - 3 2 9 4）、0. 0 5 % T w e e n - 2 0（シグマールドリッチ・Inc.、セントルイス、ミズーリ州、カタログ番号 P - 2 2 8 7）溶液を含むトリス緩衝生理食塩液（5 0 m M トリス - H C l、1 5 0 m M 塩化ナトリウム、p H 7. 5、T B S）で、3 0 0 μL /ウェルにて、3 7 ° C で 1 時間ブロッキングした。このブロッキング工程の後に、プレートからブロッキングバッファーを流し出し、そしてペーパータオル上に水分を吸い取った。試験または対照試薬の、2 つの 2 倍段階希釈物を、ブロッキングバッファー中で 1.25×10^{-8} M から開始して 2.44×10^{-11} M（2 x 最終濃度が必要）に漸減させて、フレキシブル 9 6 ウ

エルアッセイプレートに四つ組で作製した。次いで、これらの非標識競合試薬を、等量の 2.5×10^{-10} M ビオチン化ネズミ抗 My 9-6 (イムノジェン, Inc.、ケンブリッジ、マサチューセッツ州) と混合した; 陽性対照は競合試薬を含有せず、一方、陰性対照はブロッキングバッファーのみを含有した。これらの混合物 $50 \mu\text{l}$ を、膜でコーティングしたアッセイプレートの指定したウェルに移し、次いでそのプレートを 4°C にて一晚インキュベートした。次いで、ウェルの中身を吸引して 10% (v/v) 漂白剤を含有する廃棄用フラスコに入れ、そしてプレートを、 0.1% (v/v) Tween-20 を含有する TBS (洗浄バッファー) で 3 回洗浄した。プレートは、ペーパータオル上で水分を吸い取り、そして、結合しているビオチン化ネズミ抗 My 9-6 量を、ブロッキングバッファー中で $1:5,000$ 希釈した $100 \mu\text{L}$ /ウェルのストレプトアビジン-アルカリホスファターゼ (ジャクソン・イムノリサーチ・ラボラトリーズ、ウエストグロブ、ペンシルバニア州、カタログ番号 016-050-084) を用いて検出した。室温及び遮光で 1 時間インキュベートした後に、結合していない二次抗体試薬をウェルから洗浄し、そして TMB (バイオ F X ラボラトリーズ、ランダルズタウン、メリーランド州、カタログ番号 TMBW-0100-01) を用いて発色し、停止溶液 (バイオ F X ラボラトリーズ、ランダルズタウン、メリーランド州、カタログ番号 STPR-0100-01) で反応を止めた。アッセイプレートを、タイターテック (登録商標) マルチスキャンプラス MK II プレートリーダー (ハンツビル、アラバマ州) を用いて、 450 nm にて読み取った。

【0134】

[197] 3. 6. ネズミ My 9-6 抗体可変領域のクローニング

[198] ネズミ My 9-6 抗体可変領域を、前述の RT-PCR 法によってクローニングした。いくつかの個々の軽鎖及び重鎖クローンを、ポリメラーゼによって生じる起こりうる配列エラーを同定しそして回避するために、配列決定した。軽鎖については 1 つの配列のみを得たが、しかし、重鎖の RT-PCR クローンからは、2 つの別な配列が得られた。

【0135】

[199] ネズミ My 9-6 軽鎖可変領域の実際の配列を確かめるために、ペプチド配列を、エドマン分解、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) 及びタンデム質量分析 (MS-MS) によって解析した。My 9-6 軽鎖のアミノ末端における 22 残基を、エドマン分解によって配列決定し、そして図 6 A に与える。縮重 RT-PCR クローンに由来する最初の cDNA 配列は、縮重プライマーによって生成したと思われる 4 つの残基を除き、一致した。エドマン分解によって決定したペプチド配列は、後に、5' 末端シグナルペプチド配列中の縮重プライマーによって生成した RT-PCR クローンによって、確認された。トリプシン消化フラグメントを MS-MS 分析することにより、軽鎖 CDR 1 及び 2 の配列もまた確認された (図 6 B)。総合すると、これらのペプチド解析は、RT-PCR により生成した cDNA クローンに由来する、予測されるネズミ My 9-6 軽鎖アミノ酸配列を確認する。

【0136】

[200] 重鎖配列に一般的であるように、mu My 9-6 重鎖アミノ末端は、ピログルタミン残基によって遮断され、それゆえ N 末端エドマン分解によって配列決定することができなかった。代わりに、内部配列データを、トリプシン消化及び、マトリックス支援レーザー脱離イオン化 (MALDI) による分析及びタンデム質量分析 (MS-MS) によって作成した。1788 Da フラグメントを、cDNA クローン 2 の一部分と同一の予測された配列を用いて同定した (図 7)。この配列は、cDNA クローン 2 の CDR 3 に由来する 5 残基を含み、それゆえ、mu My 9-6 重鎖について確実な同定を行うのに理想的なペプチドである。縮重 RT-PCR クローン 2 から元々得られた配列のみを産生する多重 RACE PCR クローンによっても、このペプチド配列が確認された。

【0137】

[201] 種々の cDNA クローン及びペプチド配列解析から得た蓄積データは、図 8 に

示される最終的なネズミ My 9-6 軽鎖及び重鎖配列を提供した。K a b a t 及び A b M 定義を用いて、3つの軽鎖及び重鎖 C D R を同定した（図 8 及び 9）。N C B I I g B l a s t データベースの検索により、m u M y 9-6 抗体軽鎖可変領域は、マウス I g V ? 8-27 生殖系列遺伝子に由来する可能性が最も高く、一方、重鎖可変領域は、I g V h V 102 生殖系列遺伝子に由来する可能性が最も高いことが、示唆される（図 10）。

【0138】

[202] 3. 7. My 9-6 抗体の可変領域表面残基の決定

[203] P e d e r s e n ら（1994年、J. M o l. B i o l. 235:959-973）及び R o g u s k a ら（1996年、P r o t e i n E n g. 9:895-904）によって記載された抗体の表面再構築化技術は、ネズミ抗体可変配列の表面残基を予測することにより始まる。表面残基を、水分子に接近可能なその総表面積の少なくとも30%を有するアミノ酸として定義する。m u M y 9-6 の表面残基を見いだすのに解明された構造がないため、127の抗体構造のファイルセットの中で最も相同的な配列を有する10の抗体を、整列化した（図11A及びB）。各 K a b a t 位置の溶媒露出度を、これらの整列化した配列について平均し、そして各残基の相対的露出度の分布を図12に示す。

【0139】

[204] いくつかの表面位置は、25%~35%の平均露出度であった。これらを、両側に隣接する2つの同一な残基を有する抗体のみを平均することによって、より詳細に調べた（図13A及びB）。m u M y 9-6 重鎖の25の予測された表面残基は、追加の解析後にも変わらなかったが、しかし、軽鎖における K a b a t 位置15及び70は、さらなる考察を必要とした。軽鎖の位置15におけるアラニンは、すべての10の構造において34.4%の平均露出度であったが、しかし1つの構造1m c pのみが、m u M y 9-6 におけるものと同一の隣接残基を有した。この構造において、A l a 15は、ほんの18.2%の相対的露出度であった。この1つの構造において、A l a 15は、位置15の平均的な残基よりも極めて露出度が低かったため、隣接残基に1つだけ違いを有する3つの構造（1 a p 2、1 f r g、1 h i l）についても、まとめて平均した。これら3つの構造の平均露出度は、この場合も33.3%であり、A l a 15を、予測される表面残基とした。最終的には、表面再構築化された抗B4、C242、及び表面再構築化の特許自体が、軽鎖位置15は表面残基であると予測した。総合すると、保存的なアプローチとは、m u M y 9-6 軽鎖の位置15が表面残基であると仮定することである。

【0140】

[205] m u M y 9-6 軽鎖の位置70もまた、それが表面残基であるとの保存的な予測を最終的にもたらず、特別な考慮を必要とする。軽鎖に対する表面を予測する最初の作業を、5つの最も相同的な軽鎖構造のみに由来するM C データを用いて行い、そしてこの群において、A s p 70が予測された表面残基であった。その後、追加の5つの最も相同的な構造を用いて、位置70は、図13Aに示すように、29.1%の平均露出度であることが見いだされた。加えて、10のうち9の構造は同一の隣接残基を有し、そしてこのセットの平均は29.2%の露出度であった。この残基は、30%カットオフ点に非常に近いようであり、そして表面再構築化の特許は、位置70を表面位置と称するため、露出度のデータをさらに精査した。構造1 l v e の位置70は、22.5%の相対的露出度であり、これは二番目に低い相対的露出度である27.5%よりも5%少ない。1 l v e は8番目に最も相同的な構造であり、そしてそれが低い外れ値であったことから、1 l v e を除いた同一の隣接残基を有する8の構造について平均を取り、そしてこのセットは30.1%の平均露出度であった。最初のm u M y 9-6 軽鎖の解析及び表面再構築化の特許が軽鎖の位置70を表面位置と称することと併せて、このことは、m u M y 9-6 軽鎖のA s p 70が表面残基であるとの保存的な予測をもたらしした。

【0141】

[206] 3. 8. どの残基がC D R から5 Å以内に入るかを決定するための分子モデ

リング

[207] A b Mソフトウェアパッケージを用いて作成した分子モデルを、どのm u M y 9-6表面残基がC D Rから5 Å以内に入るかを決定するために解析した。抗体の表面を再構築化するには、C D Rの外側のすべての表面残基を、そのヒト対応物に替えなければならないが、しかしC D R 5 Å以内に入る残基もまた、抗原の結合及び特異性に寄与する可能性がある。したがって、これらの5 Å残基は、ヒト化の過程全般を通じて、同定されそして考慮されなければならない。表面再構築化に用いられるC D Rの定義は、重鎖C D R 2にはA b Mの定義を、そして残りの5つのC D RにはK a b a tの定義を組み合わせる(図9)。ネズミモデルを、スイス・ビューアー・ソフトウェアを用いて解析し、そして図14は、軽鎖または重鎖配列のいずれかにおける任意のC D R残基から5 Å以内である残基を示す。 10

【0142】

[208] 3. 9. 最も相同的なヒト表面の選択

[209] m u M y 9-6の表面を再構築化するためのヒト抗体表面の候補を、S Rソフトウェアを用いて、K a b a t抗体配列データベースから得た。このソフトウェアは、抗体データベースから、特定の残基の位置のみを検索するインターフェースを提供する。天然の対を保つため、軽鎖及び重鎖双方の表面残基をまとめて比較した。K a b a tデータベースから得た最も相同的なヒト表面を、配列同一性の順位にしたがって整列化した。S R K a b a tデータベースソフトウェアによって整列化させた上位5つの表面を、図15に与える。次いで、どのヒト表面がC D Rから5 Å以内で最少の変更を必要とするであろうかを同定するために、表面を比較した。抗C型肝炎ウイルス抗体L C 3 b P B (I v a n o v s k i M. ら、1998年、B l o o d 91(7):2433-42)は、最少数の残基変更(総計10)を必要とし、そしてこれらの残基のうち4つのみが、C D Rから5 Å以内に入った。m u M y 9-6の全長可変領域配列もまた、S Rを用いたK a b a tヒト抗体データベースに対して整列化させ、そしてL C 3 b P Bを、14番目に最も類似したヒト可変領域配列として同定した(データは示さず)。L C 3 b P B抗体は、最も相同的な表面を提供し、そして最少数の5 Å残基の変更を必要とするため、これが、m u M y 9-6を表面再構築化するための最良の候補である。 20

【0143】

[210] 3. 10. ヒト化M y 9-6抗体のための、M y 9-6遺伝子の構築

[211] 10の表面残基の変更を、h u M y 9-6のために、前述のようなP C R突然変異誘発技術を用いて行った。L C 3 b P Bの表面残基のうち6つが、C D Rから5 Åよりも長く離れていたため、これらの残基を、ヒト化M y 9-6のすべての型においてマウスからヒトへ変更した(図16A及びB)。C D Rから5 Å以内に入る4つの表面残基である、K a b a tの軽鎖の位置1、3及び45ならびに重鎖の位置64を、M y 9-6の16のヒト化型を作製するために、ヒトへ変更するか、あるいはマウスと同じく保持した。これらのうち最もヒトに近いのは、すべての10のヒト表面残基を有することから、1. 0型である。最大の結合親和性を確実にする点で最も保存的な型は、C D Rから5 Å以内の4つのマウス表面残基を保持する1. 1型である。ヒト化M y 9-6抗体遺伝子のそれぞれを、一過性でそして安定なトランスフェクションを行うため、抗体発現プラスミド(図5)中にクローニングした。 40

【0144】

[212] 3. 11. 結合データ

[213] 表面再構築化によるヒト化の主要な長所は、非表面のネズミフレームワーク残基を保持することによって、ヒト化M y 9-6が、親和性を変化させずにC D 33と結合し続けるはずであることである。しかしながら、C D Rから5 Å以内に入る4つの表面残基は、抗原結合に寄与する可能性があり、それゆえに、これらの残基の変更は、結合に負の効果をもたらす恐れがある。この懸念に対処するために、ヒト化M y 9-6の16の型は、4つの5 Å残基位置のそれぞれにおいて、ヒトまたはネズミのいずれかの残基のすべての組み合わせを含む。これらは、すべてのC D Rでない表面位置にヒト残基を有する、 50

最良または最もヒトに近い 1.0 型から、4つの 5 Å 表面位置のそれぞれにネズミ残基を保持し、それゆえに野生型の結合性を保持するはずである、最も保存的な 1.1 型へ及ぶ。My 9-6 ヒト化型の結合親和性をネズミ My 9-6 と比較することによって、野生型の結合性を保持する最もヒトに近い型を、表面再構築化されたヒト化 My 9-6 として選択することが可能である。

【0145】

[214] ネズミ My 9-6 のヒト化型及び mu My 9-6 を用いた直接的及び競合的結合実験を、CD 33 を発現しているヒト白血病細胞株 HL-60 上で行った。最も保存的な型 (V1.1) に加えて、3つの最もヒトに近いバージョン (V1.0、V1.3、V1.6) についても、HL-60 膜または全細胞のいずれかで試験した。図 17 は、各条件に対する KD 値を与え、そして図 18 は、mu My 9-6 に対する hu My 9-6 V1.0 についての結合曲線の例を示す。最もヒトに近い 1.0 型を含むヒト化 My 9-6 の型について計算した KD 値は、ネズミ My 9-6 の KD 値の実験誤差の範囲内に入る。競合的結合の結果はまた、hu My 9-6 抗体が、CD 33 への結合について mu My 9-6 自体と十分同等に競合することが可能であることも実証する。これらのデータが、HL-60 膜及び全細胞において、完全ヒト化 My 9-6 V1.0 に対する野生型に近い結合親和性を実証したため、1.0 型が最適なヒト化 My 9-6 抗体であることから、追加の型について試験する必要はなかった。

10

【0146】

[215] ネズミ My 9-6 抗体を、結合活性を失うことなく完全にヒト化した。これらの表面残基のうちの 4つが CDR から 5 Å 以内にあったにもかかわらず、マウスからヒトへの表面残基のいずれの変更も、結合親和性の減少をもたらさなかった。CDR から 5 Å 以内の残基は、これらの CDR の構造に影響を与える可能性のある、潜在的に重大なファン・デル・ワールス接触を作るものと考えられる。

20

【0147】

[216] My 9-6 をヒト化した結果は、表面再構築化された抗体数が増えるにつれて、実際の結合データに基づいた徹底的な残基位置の解析が、単に CDR から 5 Å 以内にある任意の残基に目を向けるよりも、疑わしい残基を標的とする効果的な方法となる可能性があることを示唆する。

【0148】

[217] ヒト化 My 9-6 V1.0 (hu My 9-6) は、本明細書に記載された手順を用いてヒト化された 4 番目の抗体である。ネズミ抗体の可変領域のフレームワークを表面再構築化することによるヒト化は、CDR グラフトを含むヒト化の標準的な方法における改良技術として開発されたが、結合活性を維持するのに、広範な開発及び再操作を必要とする可能性もある。このことは、完全にヒト表面を有する十分に活性の抗体を作り出すのに 10 のみの表面残基の変更を伴った、表面再構築化された hu My 9-6 抗体とは、対照をなす。

30

【0149】

[218] 実施例 4. My 9-6-DM1 免疫複合体

[219] メイタンシノイド薬物である DM1 と結合させた My 9-6 抗体を用いて、マウスにおいてヒト腫瘍異種移植片を用いた前臨床有効性試験を行った。

40

【0150】

[220] 以下に論じるように、My 9-6-DM1 は、修飾されていない抗体の CD 33 に対する特異性及び結合親和性を維持し、そして、in vitro において CD 33 陽性腫瘍細胞に対して強力な抗原特異的細胞毒性を示した。確立された皮下 HL-60 腫瘍異種移植片を有する SCID マウスを My 9-6-DM1 で治療した結果、毒性を示さずそして最大耐用量を十分に下回る用量 (20 mg 結合抗体/kg/日、静脈内投与 x 5 日間) にて、完全に腫瘍が根絶された。対照的に、My 9-6 抗体のみでの治療は、ビヒクル対照と比較して、HL-60 腫瘍の増殖に効果がなかった。同様な治療有効性は、皮下 THP-1 異種移植片を有するマウスの治療において、My 9-6-DM1 で認められ

50

た。

【0151】

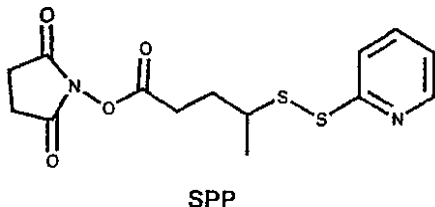
[221] 4. 1. 試薬

[222] 抗体は、上述のヒトCD33に対するネズミモノクローナルMy9-6抗体であった。

[223] 抗体修飾剤は、N-スクシンイミジル4-(2-ピリジルジチオ)ペンタノエート(SPP)であった：

【0152】

【化2】



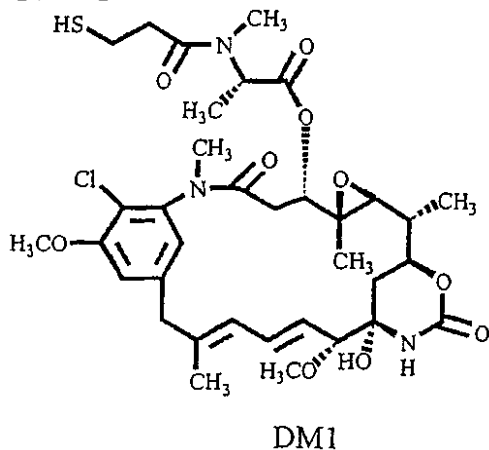
10

【0153】

[224] 細胞毒性薬物は、微生物の発酵産物であるアンサマイトシンP3から合成されるメイタンシンアナログであるDM1であった。DM1は、チューブリン重合の強力な阻害剤である。

【0154】

【化3】



30

【0155】

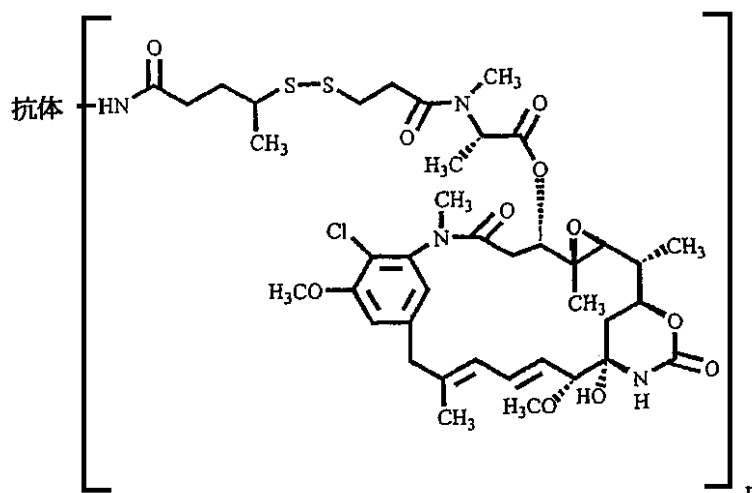
[225] 4. 2. My9-6-DM1の調製

My9-6-DM1を、抗体一分子につき3～5のピリジルジチオ基を導入するためにMy9-6抗体をSPPで修飾することによって、作製した。DM1のチオール置換基と抗体の活性ジスルフィド官能基との間でジスルフィド交換を行うことによって、DM1を含有する抗体複合体が提供された。

【0156】

40

【化 4】



10

(nは任意の整数であってよい)

【0157】

[227] 4. 3. フローサイトメトリーによる、抗体及び抗体複合体の結合性の解析

[228] HL-60を、様々な濃度のMy9-6抗体またはMy9-6-DM1とインキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、そしてFITC標識抗ネズミIgG二次抗体とインキュベートした。追加の洗浄を行った後に、細胞を2%ホルムアルデヒドで固定化し、そして細胞に付随した蛍光を、BD FACSscanフローサイトメーターを用いて定量した。My9-6-DM1は、修飾されていない抗体と同程度のCD33との特異的結合性を維持する(図19)。

20

【0158】

[229] 4. 4. In vitro細胞毒性アッセイ

[230] My9-6-DM1の細胞毒性を、CD33を発現しているTHP-1細胞及びCD33陰性細胞株であるNamalwaを用いて測定した。細胞を、96ウェルプレート中の複合体を含有する培地に播き、そしてコロニーが形成されるまで(2~3週間)37℃にてインキュベートした。次いで、コロニーを計数し、そして生存した画分を、演算におけるポアソン分布を用いて判定した。

30

【0159】

[231] 4. 5. In vivoマウス腫瘍異種移植試験

[232] 皮下腫瘍モデル — HL-60ヒト前骨髄球性白血病細胞(0.1mL中に 5×10^6 細胞)を、雌SCIDマウスの右側腹部に皮下接種した。マウスを、腫瘍の大きさが 100 mm^3 (大きな腫瘍モデルでは、 400 mm^3)に達したときに、側部尾静脈に静脈内注射することによって治療した。腫瘍の大きさ及びマウス体重を、週に2回測定した。生存モデル — HL-60細胞(0.1mL中に 5×10^6 細胞)を、雌SCIDマウスの側部尾静脈に静脈内注射した。腫瘍細胞を注射後第11日に、治療を開始した。マウスを、瀕死、腫瘍量または死亡について毎日確認した。体重を、週に2回測定した。

40

【0160】

[233] 4. 6. My9-6-DM1のin vitro特異性及び有効性

[234] CD33発現細胞(THP-1)に対するMy9-6-DM1の細胞毒性を、治療後に増殖することが可能なコロニー数を定量することによって殺細胞活性を測定する、クローン形成法を用いて、CD33陰性細胞株(Namalwa)と比較して試験した。My9-6-DM1は、in vitroにおいて、CD33陽性ヒト腫瘍細胞に対して強力な殺細胞活性を示す(図20)。CD33陰性細胞に対して有意な毒性は認められず、CD-33依存性の細胞毒性が、抗CD33抗体であるMy9-6による特異的なターゲティングに起因することが、示唆された。

50

【0161】

[235] 4. 7. マウスにおけるヒト腫瘍異種移植片に対するMy9-6-DM1の有効性

[236] *In vitro*におけるMy9-6-DM1の有効性を、ヒトHL-60腫瘍細胞異種移植片を有するSCIDマウスを用いて測定した。HL-60細胞を皮下注射し、そして腫瘍を平均 100 mm^3 の大きさに増殖させた。My9-6-DM1複合体を、図21に示した用量にて、1日1回5日間静脈内に送達した。用量は、複合体中のmg抗体として表し、抗体1mgにつきDM1およそ $15\text{ }\mu\text{g}$ のDM1用量に相当する。腫瘍体積を、治療有効性の指標として測定し、そしてマウス体重を、治療による毒性の指標とするためにモニターした。My9-6-DM1は、ほとんど毒性を引き起こさない用量にて、ヒトHL-60細胞異種移植片を有するマウスの長期治癒を誘導する（図21）。試験されたもっとも高い2用量（19及び 26 mg/kg ）において、腫瘍の完全な退縮が、10%より少ない最大体重減少とともに認められた（図21A及びB）。試験された最低用量（ 13 mg/kg ）においてでさえ、5例中2例のマウスは完全な治癒を示したが、一方、他の3例のマウスは、およそ20日間遅れての腫瘍の増殖を伴う、腫瘍の緩解を示した。同様な結果は、THP-1白血病細胞株を用いた場合にも認められ、該細胞株において、My9-6-DM1はヒトTHP-1腫瘍異種移植片を有するマウスの長期治癒を誘導した（データは示さず）。 10

【0162】

[237] これらの結果は、My9-6抗体のみでの治療によって得られたものとは著しく対照的である。抗体のみでは、 50 mg/kg においてでさえ腫瘍細胞の増殖に効果がない（図21C）。 20

【0163】

[238] My9-6-DM1の活性を、承認された抗CD33抗体－カリケアマイシン複合体であるゲムツズマブ・オゾガマイシンと比較した。ゲムツズマブ・オゾガマイシンを、3用量について4日毎に投与した。予備実験では、ゲムツズマブ・オゾガマイシンは、公表されたヌードマウスにおけるMTD（ 0.3 mg/kg ）では、SCIDマウスに対して毒性が強すぎることを実証された（データは示さず）。有意な毒性は、この実験において、100及び $200\text{ }\mu\text{g/kg}$ の用量でも認められた（図21F）。ゲムツズマブ・オゾガマイシンは、最大耐用量（ $100\text{ }\mu\text{g/kg}$ ）にて、このモデルにおいてごく中程度の腫瘍の緩解及び増殖遅延（約25日）を示した（図21E）。 30

【0164】

[239] 別の実験において、My9-6-DM1複合体の抗腫瘍活性を、非結合型の親薬物であるメイタンシンの活性と比較した。HL-60腫瘍異種移植片を有するマウスを、複合体 23 mg抗体/kg または $350\text{ }\mu\text{g DM1/kg}$ ；非結合型薬物 $350\text{ }\mu\text{g/kg}$ ；または非結合型抗体 23 mg/kg にて、1日1回5日間治療した。メイタンシンのみで治療された6例中3例のマウスは、治療後第2日に死亡し、この薬物レベルが非常に毒性であることが示された。しかしながら、この薬物は、残りの3例のマウスにおいて、腫瘍の増殖に有意な影響を示し、およそ10日の増殖遅延を伴った（図22）。 40

【0165】

[240] My9-6抗体のみでは、腫瘍の増殖に影響を及ぼさなかったが、My9-6-DM1複合体は、腫瘍の完全な緩解をもたらした。複合体での治療がマウス体重へ及ぼす影響（12%減少）は、前回の実験よりもわずかに大きく、そして、複合体の合成におけるバッチ間の差異を反映する可能性がある。複合体で治療された6例中2例のマウスにおいて、腫瘍の再増殖が、第70日より認められた。これらの動物は、初回の治療と同一の、My9-6-DM1による二度目の治療を受けた。二度目の治療は、結果として、「再発」腫瘍の完全な緩解を、有害毒性を認めることなくもたらし、腫瘍の再増殖が複合体耐性細胞の増殖に起因するものではないことが示唆された。 50

【0166】

[241] この異種移植モデルにおけるMy 9-6-DM1の高い有効性は、複合体が、大きなHL-60腫瘍に対してさえも効果的である可能性があることを示唆した。腫瘍を、治療開始に先立って、腫瘍体積 $>400\text{mm}^3$ に増殖させた。加えて、My 9-6-DM1活性の標準的な化学療法薬物との比較を行った。My 9-6-DM1は、SCIDマウスにおいて大きな腫瘍の完全な緩解をもたらした(図23A及びB)。この場合も、再発腫瘍(マウス6例中2例)は、My 9-6-DM1での二度目の治療に感受性であった。標準的な化学療法剤(Ara-C及びイダルビシン)は、腫瘍の増殖にほとんど効果がなかった。より高用量の薬物用量は、マウスに対して極めて毒性であった(示さず)。

【0167】

[242] 4. 8. HL-60細胞マウス生存モデルにおけるMy 9-6-DM1の有効性

10

[243] 腫瘍異種移植モデルにおけるMy 9-6-DM1の有効性は顕著であるが、一方で、HL-60細胞を直接マウス尾静脈に注射するマウス生存モデルにおいて、複合体の活性を調べることも重要である。このモデルでは、対照マウスは細胞注射後第30~50日に死亡する。細胞注射後第11日にMy 9-6-DM1で治療を開始されたマウスは、生存性の劇的な増加を示し、第70日において8例中7例のマウスが生存した(図24A)。メイタンシンのみでも、8例中2例のマウスが治療開始後まもなく死亡し、薬物毒性が示唆されたものの、このモデルにおいてマウスの生存性に有意な影響を示した。皮下異種移植モデルと比較した場合の、このモデルにおけるメイタンシンの相対的な有効性は、この場合において、HL-60腫瘍が、薬物作用に対してより感受性である可能性があることを示唆する。治療開始がさらに遅れると、標的薬物と非標的薬物との間により著しい差異が実証される可能性がある。しかしながら、このモデルにおいてでさえ、標準的な化学療法は、有意な生存性の増大を提供しなかった(図24B)。最も高用量の併用用量は、有意に明らかな薬物毒性を示した。My 9-6抗体のみ及びゲムツズマブ・オゾガマイシンの双方は、中程度の生存性増加を示した。

20

【0168】

[244] 寄託の陳述

[245] ネズミMy 9-6抗体を作るハイブリドーマを、2002年11月7日に、American Type Culture Collection, PO Box 1549, Manassas, VA 20108に、ブダペスト条約の条項にしたがって寄託し、そして寄託番号PTA-4786を割り当てられた。

30

【0169】

[246] 特定の特許及び印刷刊行物を、本開示において参照し、その教示は、そのすべてのそれぞれを、本明細書においてそれぞれ参照によって援用する。

[247] 本発明を詳細かつその特定の態様に関して記載したが、種々の変更及び修正を、その精神及び範囲から逸脱することなくこれに対して行うことが可能であることは、当業者にとって明らかであろう。

【図面の簡単な説明】

【0170】

【図1】[35] 図1は、競合結合実験の結果を示す。 ^{125}I -標識My 9-6抗体($3 \times 10^{-9}\text{M}$)のCD33陽性U-937細胞への結合を、濃度を増加させたMy 9あるいはMy 9-6抗体の存在下で、アッセイした。

40

【図2】[36] 図2は、軽鎖シグナル配列に対するMy 9-6縮重プライマーを示す。

【図3】[37] 図3は、muMy 9-6可変領域の表面を予測するのに用いたブルックヘブンのデータベースに由来する、127の抗体構造のファイル名を示す。

【図4】[38] 図4は、16のMy 9-6の表面再構築化型ならびにキメラMy 9-6抗体を構築するのに用いたPCRプライマーを示す。

【図5】[39] 図5は、ヒト化抗体を構築しそして発現するのに用いたプラスミドを示す。(A): 軽鎖クローニングプラスミド。(B): 重鎖クローニングプラスミド。(C): 哺乳動物抗体発現プラスミド。

50

【図 6】[40] 図 6 A は、R T - P C R により生成した m u M y 9 - 6 軽鎖の c D N A クローンに由来するアミノ酸配列と比較した、エドマン配列決定の結果を示す。

【0 1 7 1】

[41] 図 6 B は、C D R 1 及び C D R 2 配列をそれぞれ含有する、1 3 1 9 D a 及び 1 1 2 2 D a のペプチドフラグメントの M S - M S 配列解析による結果を示す。C D R 配列は、太字で表す。

【図 7】[42] 図 7 は、1 7 8 8 D a ペプチドの M S - M S 配列解析による結果、及び 2 つの c D N A クローンに由来する対応した配列を示す。

【図 8 - A】[43] 図 8 A は、ネズミ M y 9 - 6 抗体の軽鎖可変領域の c D N A 配列及び推定アミノ酸配列を示す。3 つの C D R を下線で示す。

【図 8 - B】[44] 図 8 B は、ネズミ M y 9 - 6 抗体の重鎖可変領域の c D N A 配列及び推定アミノ酸配列を示す。3 つの C D R を下線で示す。

【図 9】[45] 図 9 は、K a b a t の定義によって決定された軽鎖及び重鎖 C D R を示す。

【図 1 0】[46] 図 1 0 は、8 - 2 7 及び V 1 0 2 遺伝子の生殖系列配列とともに整列化させた、ネズミ M y 9 - 6 抗体の軽鎖及び重鎖アミノ酸配列を示す。点 (.) は、配列が同一であることを示す。

【図 1 1 - A】[47] 図 1 1 A 及び B は、ブルックヘブンのデータベースに解明されているファイルを有する、m u M y 9 - 6 配列に最も相同的な 1 0 の軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) 抗体配列を示す。配列を、最も相同的なものから最も相同的でないものへの順番で整列化した。

【図 1 1 - B】[47] 図 1 1 A 及び B は、ブルックヘブンのデータベースに解明されているファイルを有する、m u M y 9 - 6 配列に最も相同的な 1 0 の軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) 抗体配列を示す。配列を、最も相同的なものから最も相同的でないものへの順番で整列化した。

【図 1 2】[48] 図 1 2 A 及び B は、m u M y 9 - 6 抗体軽鎖 (A) 及び重鎖 (B) の各 K a b a t 位置の平均露出度を示す。1 0 の最も相同的な軽鎖及び重鎖配列の各 K a b a t 位置の相対的な溶媒露出度を、平均しそして x 軸上に表す。

【図 1 3 - A】[49] 図 1 3 A は、M C ソフトウェアを用いて計算した、1 0 の最も相同的な軽鎖構造の残基の溶媒露出度を示し、そして、エクセルを用いて作表した各 K a b a t 位置の平均を示す。この表は、2 5 % よりも大きな平均溶媒露出度である、C D R でない位置のデータを示す。表面残基を、3 0 % よりも大きな平均溶媒露出度である残基として定義する。2 5 % ~ 3 5 % の平均露出度である位置を、その位置及び両側に隣接する 2 つの位置にて同一の残基を有する構造のみの平均露出度を計算することによって、さらに解析した。N A は、同一の隣接する位置が利用可能でないことを指す。位置 1 5 及び 7 0 は、最終列に与えられた最終的な表面予測に到達するのに、さらに計算を要した。

【図 1 3 - B】[50] 図 1 3 B は、M C ソフトウェアを用いて計算した、1 0 の最も相同的な重鎖構造の残基の溶媒露出度を示し、そして、エクセルを用いて作表した各 K a b a t 位置の平均を示す。この表は、2 5 % よりも大きな平均溶媒露出度である、C D R でない位置のデータを示す。表面残基を、3 0 % よりも大きな平均溶媒露出度である残基として定義する。2 5 % ~ 3 5 % の平均露出度である位置を、その位置及び両側に隣接する 2 つの位置にて同一の残基を有する構造のみの平均露出度を計算することによって、さらに解析した。N A は、同一の隣接する位置が利用可能でないことを指す。

【図 1 4】[51] 図 1 4 は、C D R 残基から 5 Å 以内に入る M y 9 - 6 フレームワークの表面残基を示す。

【図 1 5】[52] 図 1 5 は、K a b a t データベースから抽出した上位 5 つのヒト配列を示す。整列化を、S R (P e d e r s e n , 1 9 9 3 年) によって行った。C D R から 5 Å 以内に入る m u M y 9 - 6 の残基を、下線で示す。

【図 1 6 - A】[53] 図 1 6 A 及び B は、1 6 のヒト化 M y 9 - 6 軽鎖可変領域配列 (A) 及び 1 6 のヒト化重鎖可変領域配列 (B) を、マウス M y 9 - 6 と整列化させたものを

10

20

30

40

50

示す。点（・）は、ヒト化型 1.0 と配列が同一であることを表す。ネズミとヒトの My 9-6 で異なる表面残基を、下線で示す。

【図 16-B】[53] 図 16 A 及び B は、16 のヒト化 My 9-6 軽鎖可変領域配列（A）及び 16 のヒト化重鎖可変領域配列（B）を、マウス My 9-6 と整列化させたものを示す。点（・）は、ヒト化型 1.0 と配列が同一であることを表す。ネズミとヒトの My 9-6 で異なる表面残基を、下線で示す。

【図 17】[54] 図 17 は、HL-60 膜及び HL-60 全細胞における直接的結合アッセイならびに HL-60 膜における競合的結合アッセイによって計算された、My 9-6 の K_D 値を示す。N = 2 である * を除き、N = 3。

【図 18】[55] 図 18 は、hu My 9-6 V1.0 に対する結合曲線を示す。（A）10
：HL-60 膜における直接的結合。（B）：HL-60 全細胞における直接的結合。（C）：HL-60 膜における競合的結合。

【図 19】[56] 図 19 は、HL-60 細胞における My 9-6-DM1 及び My 9-6 抗体の結合性を比較したものを示す。

【図 20】[57] 図 20 は、CD33 発現ヒト腫瘍細胞に対する My 9-6-DM1 の *in vitro* 細胞毒性を示す。

【図 21】[58] 図 21 は、HL-60 異種移植片を有する SCID マウスにおける、My 9-6-DM1 の有効性実験の結果を示す。HL-60 腫瘍の増殖における、My 9-6-DM1（A）及び修飾されていない My 9-6 抗体（C）の効果を、評価した。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした（B、D）。20

【図 22】[59] 図 22 は、HL-60 異種移植片を有する SCID マウスにおいて、My 9-6-DM1 の有効性を非結合型の薬物であるメイタンシンと比較したものを示す（A）。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした（B）。2 例の治療マウスにおいて再発した腫瘍を、My 9-6-DM1 の第二クールで治療した。

【図 23】[60] 図 23 A 及び B は、大きな HL-60 異種移植片を有する SCID マウスにおいて、My 9-6-DM1 の抗腫瘍有効性を標準的な化学療法と比較したものを示す（A）。マウス体重を、毒性の指標としてモニターした（B）。2 例の治療マウスにおいて再発した腫瘍を、My 9-6-DM1 の第二クールで再治療した。

【図 24】[61] 図 24 A 及び B は、HL-60 生存モデルにおいて、My 9-6-DM1 の抗腫瘍有効性をゲムツズマブ・オゾガマイシン及び標準的な化学療法と比較したものを示す。HL-60 細胞を、SCID マウスに静脈内注射した。示した治療を、細胞注射後第 11 日に開始した。治療は、ゲムツズマブ・オゾガマイシン（1 日 4 回 x 3）を除き、1 日 1 回 x 5 の静脈内投与であった。30

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> ImmunoGen, Inc.

<120> ANTI-CD33 ANTIBODIES AND METHODS FOR TREATMENT OF ACUTE MYELOID
LEUKEMIA USING THE SAME

<130> F174222

<150> US 60/424,332

<151> 2002-11-07

<160> 94

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

Ser Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus musculus

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (16)..(16)

<223> "X" may be K or Q

<400> 2

Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val
1 5

<210> 4

10

20

30

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

His Gln Tyr Leu Ser Ser Arg Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

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

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

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr

10

20

30

40

[illegible]

```
<210> 8
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus
```

<400> 8

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
20 25 30

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

```
<210> 9
<211> 118
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
```

 $\langle 220 \rangle$

<223> Humanized My9-6 antibody heavy chain variable region

<400> 9

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

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

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 10

<211> 113

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Humanized My9-6 antibody light chain variable region

<400> 10

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

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
20 25 30

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

Ser Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

10

20

30

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Pro Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

10

<210> 11
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> PCR primer HindKL

<400> 11
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc

46

<210> 12
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> PCR primer Bgl2IgG1

<400> 12
ggaagatcta tagacagatg ggggtgtcgt ttgggc

36

<210> 13
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30

<220>
<223> PCR primer EcoPolydC

<400> 13
tatatctaga attccccccc ccccccccc

30

<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> PCR primer Sac1MK
 <400> 14
 gggagctcga yattgtgmts acmcarwctm ca 32
 <210> 15
 <211> 32
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer EcoR1MH1
 <220> 10
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> "n" may be any nucleotide
 <400> 15
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32
 <210> 16
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> PCR primer EcoR1MH2 20
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (18)..(18)
 <223> "n" may be any nucleotide
 <400> 16
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35
 <210> 17
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> Degenerate primer Leaddeg1 30
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (26)..(26)
 <223> "n" may be any nucleotide
 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (29)..(29)
 <223> "n" may be any nucleotide

<400> 17
ttttgattct gctgtgggtg tccggnacnt gygg 34

<210> 18
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Degenerate primer Leaddeg2

<220>
<221> misc_feature 10
<222> (28)..(28)
<223> "n" may be any nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> "n" may be any nucleotide

<400> 18
ttttgattcg ctgctgctgc tgtgggtnws ngg 33

<210> 19
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence 20

<220>
<223> Degenerate primer Leaddeg3

<220>
<221> misc_feature
<222> (31)..(31)
<223> "n" may be any nucleotide

<220>
<221> misc_feature
<222> (34)..(34)
<223> "n" may be any nucleotide

<400> 19 30
ttttgattcc caggtgttca tgctgctgyt nytntgggt 39

<210> 20
<211> 39
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanization primer My96LCBsrG1

<400> 20

tacaggtgta cactccgata ttgtgatcac ccagactcc	39	
<210> 21		
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Humanization primer My96LCOL1		
<400> 21		
actggaaatc aaacgaactg tggctgcacc atctg	35	
<210> 22		10
<211> 35		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Humanization primer My96LCOL2		
<400> 22		
gccacagttc gtttgatttc cagtttggty cctcc	35	
<210> 23		
<211> 39		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		20
<220>		
<223> Humanization primer My96HCBsrG1		
<400> 23		
tacaggtgta cactcccagg ttaagctgca gcagtctgg	39	
<210> 24		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Humanization primer My96HCOL1		30
<400> 24		
ccacggtcac cgtctcctca gcctccacc	29	
<210> 25		
<211> 29		
<212> DNA		
<213> Artificial Sequence		
<220>		
<223> Humanization primer My96HCOL2		
<400> 25		

gaggctgagg agacggtgac cgtggtccc 29

<210> 26
 <211> 43
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer My9-6LCNMLS

<400> 26
 caggtgtaca ctccaatatt atgctcaccc agagtccatc atc 43

<210> 27
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer My9-6HCQP

<400> 27
 caggtgtaca ctcccaggtt cagctgcagc agcctggggc tg 42

<210> 28
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence 20

<220>
 <223> Humanization primer MY96HCQ64-1

<400> 28
 agaagttcca aggcaaggcc ac 22

<210> 29
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer MY96HCQ64-2

<400> 29
 cttgccttgg aacttctgat tg 22

<210> 30
 <211> 60
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer MY96HCQ105

<400> 30

10

20

30

cgatggggccc ttgggtggagg ctgaggagac ggtgaccgtg gtccttggc cccagacatc 60

<210> 31
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer MY96LCEVGPR

<400> 31
 aggtgtacac tccgagattg tgetcaccga gaggccagga tctctggctg tgtctccagg 60
 agaaagggtc actatgagc 79 10

<210> 32
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer MY96LCR45

<400> 32
 gcctgggtacc aacagatacc agggcagttt cctagacttc tgatctac 48

<210> 33
 <211> 26 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer MY96LCP80-1

<400> 33
 agcagtggtc aacctgaaga cctggc 26

<210> 34
 <211> 26
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220> 30
 <223> Humanization primer MY96LCP80-2

<400> 34
 gtcttcaggt tgaacactgc tgatgg 26

<210> 35
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer MY96LCQ100

<400> 35
 ttttaagctt cgtttgattt ccagtttggt gccttgaccg aacgtccg 48

<210> 36
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer My96lcNM

<400> 36
 caggtgtaca ctccaatatt atgctcaccc agag 34 10

<210> 37
 <211> 48
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer MY96LCK45

<400> 37
 gcctggtagc aacagatacc agggcagttc cctaaacttc tgatctac 48

<210> 38
 <211> 38 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer My96HCApa1

<400> 38
 cgatgggccc ttggtggagg ctgaggagac ggtgaccg 38

<210> 39
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer huMy96LCOL1 30

<400> 39
 actggaaatc aaacgtacgg tggctgcacc atctg 35

<210> 40
 <211> 35
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Humanization primer huMy96LCOL2

<400> 40
gccaccgtac gtttgatttc cagtttggtg ccttg

35

<210> 41
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanization primer My96lcEM My96lcNV chMy96lcBsiW1

<400> 41
caggtgtaca ctccgagatt atgctcacc agag

34

10

<210> 42
<211> 34
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Humanization primer My96lcNV

<400> 42
caggtgtaca ctccaatatt gtgctcacc agag

34

<210> 43
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20

<220>
<223> Humanization primer chMy96lcBsiW1

<400> 43
ttttcgtacg tttgatttcc agtttggtgc c

31

<210> 44
<211> 23
<212> PRT
<213> Mus musculus

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (23)..(23)
<223> "X" may be any amino acid

30

<400> 44

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Xaa
20

<210> 45
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 45

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
 20

10

<210> 46
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Degenerate primer SacIMK

<400> 46

Gly Gly Gly Ala Gly Cys Thr Cys Gly Ala Tyr Ala Thr Thr Gly Thr
 1 5 10 15

Gly Met Thr Ser Ala Cys Met Cys Ala Arg Trp Cys Thr Met Cys Ala
 20 25 30

20

<210> 47
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 47

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys
 20

30

<210> 48
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 48

Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu
 1 5 10 15

Ala

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 49

Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser Ser Ser Gln Lys
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 50

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5 10

<210> 51
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 51

Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu
1 5 10

<210> 52
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 52

Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10 15

Ala Lys Thr

<210> 53
<211> 20
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 53

10

20

30

Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val
 1 5 10 15

Thr Val Ser Ser
 20

<210> 54
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 54

Met Gly Glu Asp Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 1 5 10 15

Val Ser Ser

<210> 55
 <211> 339
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 55
 aacattatgc tgacacagtc gccatcatct ctggctgtgt ctgcaggaga aaaggctact 60
 atgagctgta agtccagtca aagtgttttt ttcagttcaa gtcagaagaa ctacttggcc 120
 tggtagcaac agataccagg gcagtctcct aaacttctga tctactgggc atccactagg 180
 gaatctgggtg tccttgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt tactottacc 240
 atcagcagtg tacaatctga agacctggca atttattact gtcactaata cctctcctcg 300
 cggacgttcg gtggaggcac caaactggaa atcaaacga 339

<210> 56
 <211> 354
 <212> DNA
 <213> Mus musculus

<400> 56
 caggtgcaac tgcagcagcc tggggctgag gtggtgaagc ctggggcctc agtgaagatg 60
 tcctgcaagg cttctggcta cacatttacc agttactata tacactggat aaagcagaca 120
 cctggacagg gcctggaatg ggttggagtt atttatccag gaaatgatga tatttcctac 180
 aatcagaagt tcaaaggcaa ggccacattg actgcagaca aatcctccac cacagcctac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagagggt 300
 cgtctacggg acttcgatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 354

10

20

30

<210> 57
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 57

Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

10

<210> 58
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 58

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Tyr Ile His
 1 5 10

<210> 59
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

20

<400> 59

Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser
 1 5 10

<210> 60
 <211> 99
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 60

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

30

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln
85 90 95

Tyr Leu Ser

<210> 61
<211> 96
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 61

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

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

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

Arg Ile His Pro Ser Asp Ser Asp Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
50 55 60

Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

<210> 62
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 62

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Phe Phe Ser
20 25 30

Ser Ser Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln

10

20

30

35 40 45
 Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60
 Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80
 Ile Ser Ser Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln
 85 90 95
 Tyr Leu Ser Ser Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

10

Arg Ala

<210> 63
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 63

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

20

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
 20 25 30

Ser Asn Gln Met Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

30

Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr His Ser Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg Ala
 115

<210> 64
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 64

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Thr Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Gly Lys Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys Arg Ala
 115

<210> 65
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 65

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Ala Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

10

20

30

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser
 65 70 75 80

Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asn Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys Arg Ala
 115

<210> 66
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 66

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser
 65 70 75 80

Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asn Tyr Asn Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

Lys Arg Ala
 115

<210> 67

10

20

30

<211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 67

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Phe Asn Ser
 20 25 30

Gly Lys Arg Lys Asn Phe Leu Thr Trp Tyr His Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

10

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Asn
 85 90 95

Asp Tyr Ser His Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 100 105 110

20

Lys Arg Ala
 115

<210> 68
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 68

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

30

Glu Arg Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp His Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys Arg Ala
115

10

<210> 69
<211> 113
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 69

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

Gln Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ile
20 25 30

20

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Val Tyr Phe Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Gln Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln
85 90 95

30

His Tyr Arg Ala Pro Arg Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110

Lys

<210> 70
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 70

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

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

Ser Asn Ser Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Tyr Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 71

<211> 113

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 71

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

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

10

20

30

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95

Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Pro
100 105 110

Gly

<210> 72
<211> 109
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 72

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

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

Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala
100 105

<210> 73
<211> 117
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 73

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

10

20

30

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

Tyr Ile His Trp Ile Lys Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Gly Val Ile Tyr Pro Gly Asn Asp Asp Ile Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Val Arg Leu Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly Thr
100 105 110

Thr Val Thr Val Ser
115

<210> 74
<211> 116
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 74

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

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

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

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Gly Gly Lys Phe Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser

10

20

30

100 105 110

Val Thr Val Ser
115

<210> 75
<211> 119
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 75

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

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

Tyr Ile Asn Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Gly Ser Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 20
65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
115

<210> 76
<211> 118
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 76

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

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

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

Gly Gln Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Asn Lys Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Ser Gly Asn Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser
 115

<210> 77
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 77

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

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

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

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Val Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Arg Phe Lys
 50 55 60

Asp Lys Ala Thr Leu Thr Arg Asp Arg Ser Ser Asn Thr Ala Asn Ile
 65 70 75 80

His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Val
 85 90 95

Arg Glu Gly Glu Val Pro Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val
 100 105 110

10

20

30

Ser

<210> 78
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(1)
 <223> "X" may be any amino acid

<400> 78

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

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

Ala Ile His Trp Ala Lys Gln Lys Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Tyr Ile Ser Pro Gly Asn Asp Asp Ile Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Lys Arg Ser Tyr Tyr Gly His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val
 100 105 110

Ser

<210> 79
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 79

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

10

20

30

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

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

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

Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Pro Ser Ser Thr Ala Tyr Met
65 70 75 80

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

Arg Tyr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Thr Val Thr Val Ser
115

<210> 80
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 80

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

Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Arg Tyr Trp Met
20 25 30

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

Ile Tyr Pro Gly Asn Ser Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Glu Gly
50 55 60

Lys Ala Lys Leu Thr Ala Val Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr Met Glu
65 70 75 80

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

Asp Tyr Gly Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr

10

20

30

100 105 110
 Val Ser

 <210> 81
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 81
 Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Val Lys Pro Gly Ala 10
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
 20 25 30
 Tyr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Val Asp Pro Asp Asn Gly Gly Thr Ser Phe Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 20
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Arg Asp Asp Tyr Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Ser
 100 105 110
 Leu Thr Val Ser
 115

 <210> 82
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

 <400> 82
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Phe
 20 25 30

10

20

30

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

Gly Glu Ile Leu Pro Gly Ser Gly Gly Thr His Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser
 115

<210> 83
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 83

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Ala Gly Ser
 1 5 10 15

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

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

Gly Tyr Ile Asn Pro Gly Lys Gly Tyr Leu Ser Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

10

20

30

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

<210> 84
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 84

Asn Met Thr Ser Ala Lys Pro Gly Gln Lys Gly Asp Ser Asp Ser Glu
1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg Ala
20

10

<210> 85
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 85

Asp Gln Thr Ser Val Arg Pro Gly Glu Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu
1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg Thr
20

20

<210> 86
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 86

Asp Val Thr Ser Val Arg Pro Gly Lys Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu
1 5 10 15

Gly Lys Lys Arg
20

30

<210> 87
<211> 21
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 87

Asp Gln Thr Ser Val Arg Pro Gly Lys Lys Gly Ser Ser Asp Pro Glu
1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg Thr
20

<210> 88
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 88

Glu Val Thr Gly Pro Arg Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ser Asp Pro Glu
1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg
20

<210> 89
<211> 20
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 89

Asp Val Thr Leu Leu Pro Pro Gly Gln Arg Gly Asp Ala Asp Ala Glu
1 5 10 15

Gln Lys Lys Arg
20

<210> 90
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 90

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Lys
1 5 10 15

Gly Lys Ser Ser Ser Glu Ala Ser
20

<210> 91
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 91

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln
1 5 10 15

10

20

30

Gly Thr Pro Ser Ser Glu Lys Ser
20

<210> 92
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 92

Gln Gln Ala Ala Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln
1 5 10 15

Gly Gly Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 93
<211> 24
<212> PRT
<213> Homo sapien

<400> 93

Gln Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln
1 5 10 15

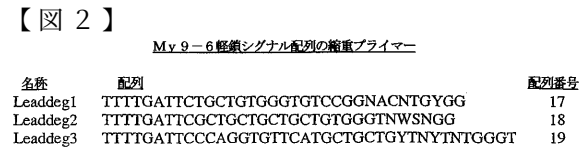
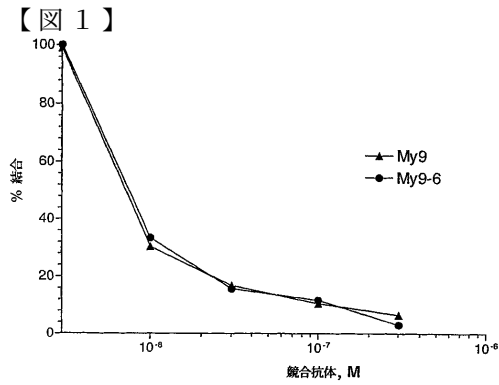
Gly Thr Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20

<210> 94
<211> 23
<212> PRT
<213> Homo sapien

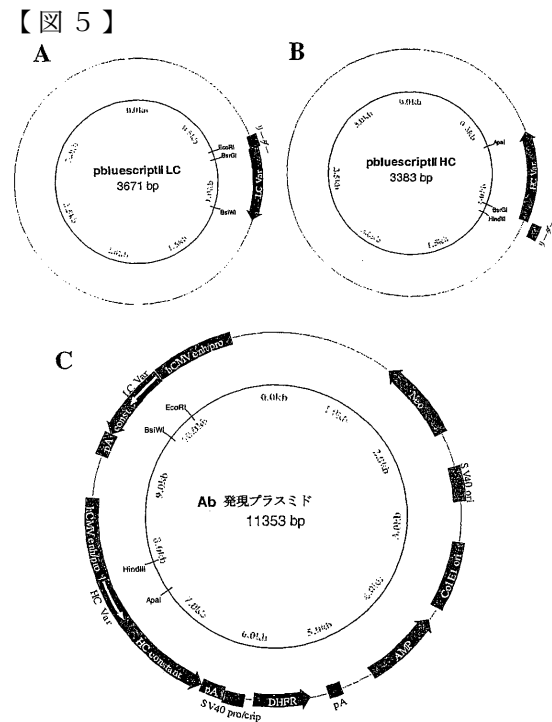
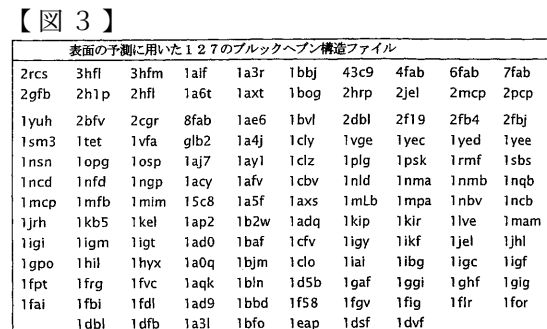
<400> 94

Gln Ala Val Lys Pro Gly Lys Gly Thr Pro Gly Gln Gln Lys Gln Gly
1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Glu Gln Ser
20



Mixed bases: S = G+C, Y = C+T, W = A+T, N = A+T+G+C.



【図 4】

配列番号	配列	プライマー
20	TACAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCBstG1
21	ACTGGAATCAAGCACTGTGGCTGCACCATCTG	My96LCOL1
22	GCCAGAGTGTGTTCAGTTTCAGTTTGGTCTCC	My96LCOL2
23	TACAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCBstG1
24	CCAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
25	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
26	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
27	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
28	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
29	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
30	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
31	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
32	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
33	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
34	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
35	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
36	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
37	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
38	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
39	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
40	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
41	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2
42	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL1
43	GAGGTGTACATCCGATATGTGATCACCAGACTCC	My96LCOL2

【図 6】

A

エドマン配列	Kabat#	muMy9-6 軽鎖アミノ末端ペプチド配列	配列番号
1	N	I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C	23
2	D	I V I T Q T P S S L A V S A G E K V T M S C	44
3	E	L I V X T Q X X	45
4	G G G C T C G A Y A T T G T G M S A C H G A R W C T M C A		46
5	N	I M L T Q S P S S L A V S A G E K V T M S C	47

B

エドマン配列	Kabat#	muMy9-6 軽鎖CDR3ペプチド配列	配列番号
1	K	S S Q S V F F S S S Q K N Y L A	48
2	S	S S Q S V F F S S S Q K	49
3	K	L L I Y W A S T R E S	50
4	K	L L I Y W A S T R E S	51

【図 7】

配列 番号	52	53	54
1788 Da 配列	(R) Y F D V W G A G T T V T V T V S S A K (T)		
cDNA _{アムニオン} (一致)	E V R L R Y F D D V W G A G T T V T V S S		
cDNA _{アムニオン} (一致)	M G E D A - M D Y W G Q G T S V T V S S		

【図 8 - A】

軽鎖 (連続番号を付けた) (配列番号55):

```

1 aacattatgctgacacagtcgccatcatctctggctgtgtctgca
1 N I M L T Q S P S S L A V S A

46 ggagaaaaggctcactatgagctgtaagtcagtcagggtgtttt
16 G E K V T M S C K S S Q S V F
      CDR1

91 ttcagttcaagtcagaagaactacttgccctgggtaccacagata
31 F S S S Q K N Y L A W Y Q Q I
      CDR1

136 ccagggcagtcctcctaaactctgatctactgggcatccactagg
46 P G Q S P K L L I Y W A S T R
      CDR2

181 gaatctgggtgtccctgatcgcttcacaggcagtgatctgggaca
61 E S G V P D R F T G S G S G T

226 gattttactcttaccatcagcagtgatcaatctgaagacctggca
76 D F T L T I S S V Q S E D L A

271 atttattactgtcatcaatacctctcctcgaggagttcggtgga
91 I Y Y C H Q Y L S S R T F G G
      CDR3

316 ggcaccaaactggaaatcaaacga
106 G T K L E I K R

```

【図 8 - B】

重鎖 (連続番号を付けた) (配列番号56):

```

1 caggtgcaactgcagcagcctggggctgaggtggtgaagcctggg
1 Q V Q L Q Q P G A E V V K P G

46 gcctcagtgagaatgtcctgcaaggcttctggtcacacatttacc
16 A S V K M S C K A S G Y T F T

91 agttactatataactggataaagcagacacctggacagggcctg
31 S Y Y I H W I K Q T P G Q G L
      CDR1

136 gaatgggttgaggttatattatccaggaaatgatgatatttctac
46 E W V G V I Y P G N D D I S Y
      CDR2

181 aatcagaagttcaaggcagccacattgactgcagacaaatcc
61 N Q K F K G K A T L T A D K S
      CDR2

226 tccaccacagcctacatgcaactcagcagcctgacatctgaggac
76 S T T A Y M Q L S S L T S E D

271 tctgcggtctattactgtgcaagagaggttctgtactacgttctc
91 S A V Y Y C A R E V R L R Y F
      CDR3

316 gatgtotggggcgaggaccaggtcaccgtctcctca
106 D V W G A G T T V T V S S

```

【図 9】

ネズミMy9-6 CDR

軽鎖	配列番号
CDR1: K S S Q S V F F S S S Q K N Y L A	4
CDR2: W A S T R E S	5
CDR3: H Q Y L S S R T	6
重鎖	
CDR1: S Y Y I H	1
CDR2: V I Y P G N D D I S Y N Q K F K G	57
CDR3: E V R L R Y F D V	3
AbM重鎖	
CDR1: G Y T F T S Y Y I H	58
CDR2: V I Y P G N D D I S	59
CDR3: E V R L R Y F D V	3

【図 10】

生殖系列配列の比較

軽鎖	50
8-27*	NIMMTQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSP
muMy9-6	...L.....FF..S.....I.....
8-27	99
muMy9-6	KLLIYWASTRESGVDRFTGSGSGTDFTLTISVQAEDLAVYYCHQVLS
	S.....I.....
重鎖	50
V102*	-VQLQQPGAELVKPGASVKVSCASGYTFTSYWMHWKQRPQGLEWIGR
muMy9-6	Q.....V.....M.....YI..I..T.....V.V
V102	98
muMy9-6	IHPDSDDTNYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCA-
	.Y.GND.IS.....A...T.....R
* 配列番号 60	連続した残基の番号付け
# 配列番号 61	

【図 11-A】

10の最も相同的な軽鎖の配列及び構造

1	50
My96	NIMLTQSPSS LAVSAGEKVT MSCKSSQSVF FSSSQKNYLA WYQQIPGQSP
1sbs	DIVMSQSPSS LAVSVGEKVT MTCKSSQSL YSSNQKNYLA WYQQKPGQSP
1h1l	DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MSCTSSQSLF NSGAKNYLT WYQQKPGQSP
1a5f	DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MTCKSSQSL NSGAKNYLT WYQQKPGQSP
1a3r	DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MTCKSSQSL NSRTQKNYLT WYQQKPGQSP
1frg	DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MSCKSSQSLF NSGKRKNFLT WYHQKPGQSP
1mcp	DIVMTQSPSS LSVSAGEKVT MSCKSSQSL NSGNQKNFLA WYQQKPGQSP
43c9	DVVMQTSPSS LAMSVGKVT MSCKSSQSL NISNQKNYLA WYQQKPGQSP
1lve	DIVMTQSPSS LAVSLGERAT INCKSSQSVL YSSNQKNYLA WYQQKPGQSP
1ap2	DIVMTQSPSS LTVTAGEKVT MSCKSSQSL NSGNQKNYLT WYQQKPGQSP
1ncb	DIVMTQSPKF MSTSVGDRVT ITCKASQDVS T.....AVV WYQQKPGQSP
My96	100
1sbs	KLLIYWASTR ESGVDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQSEDLA IYYCHQYLSS
1h1l	KLLIYWASTR ESGVDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA VYYCQYHYS
1a5f	KLLIYWASTR ESGVDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA VYYCQNDYSN
1a3r	KLLIYWASTR ESGVDRFTG SGSGTDFTLT ISGVQAECLA VYYCQNNYNY
1frg	KLLIYWASTR ESGVDRFSG SGSGTDFTLT ITSVQAECLA IYYCQNDYSH
1mcp	KLLIYGASTR ESGVDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA VYYCQNDYSY
43c9	KLLVYFSTR ESGVDRFIFG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA DYFQCYHYRA
1lve	KLLIYWASTR ESGVDRFSG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA VYYCQYHYS
1ap2	KLLIYWASTR ESGVDRFTG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA VYYCQNDYSY
1ncb	KLLIYWASTR HIGVDRFAG SGSGTDFTLT ISSVQAECLA LYCYQYHYS
My96	115
1sbs	.RTFGGGTKL EIKRA (配列番号 62)
1h1l	PFTFGSGTKL EIKRA (配列番号 63)
1a5f	PLTFGGGTKL ELKRA (配列番号 64)
1a3r	PLTFGAGTKL ELKRA (配列番号 65)
1frg	PLTFGAGTKL ELKRA (配列番号 66)
1mcp	PLTFGAGTKL ELKRA (配列番号 67)
43c9	PRTFGGGTKL EIK (配列番号 68)
1lve	PYSFGGQTKL EIKR (配列番号 69)
1ap2	PLTFGAGTKL EPG (配列番号 70)
1ncb	PWTFGGGTKL EIKRA (配列番号 71)

残基の番号付けは連続的である

【図 11-B】

10の最も相同的な重鎖の配列及び構造

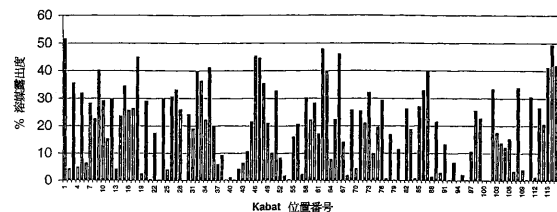
1	50
My96	QVQLQQPGAE VVKPGASVKI SCKASGYTFT SYIHWIKQT PGQGLEWVGV
1plg	QIQLQQSGPE LVRPGASVKI SCKASGYTFT DYYIHWVKQR PGEGLEWIGW
1ae6	QIQLQQSGPE LVRPGASVKI SCKASGYTFT DYYINWMKQK PGQGLEWIGW
1for	QIQLQQSGAE LVRPGSSVKI SCKASGYAFS SFVWNWVKQR PGQGLEWIGQ
1lgy	.VKLQESGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT TYTIHWIKQR PGQGLEWIGY
1bbj	XVQLQQSDAE LVKPGASVKI SCKASGYTFT DHAIHWAKQR PEQGLEWIGY
1nqb	.VQLQQSGAE LVKPGASVKL SCKASGYTFT SYWMHWIKQR PGQGLEWIGR
1mim	.QLQQSGTV LARPGASVKM SCKASGYSTF RYWMHWIKQR PGQGLEWIGA
1a6t	EVQLQQSGPD LVRPGASVKI SCKASGYSTF TYWMHWIKQR HGKSLWIGR
1d5b	QVQLQQSGAE LMKPGASVKI SCKATGYTFS SFVLEWVKQR PGHGLEWIGE
1fa1	QVQLQQSGAE LVRAGSSVKM SCKASGYTFT SYGVNWKQR PGQGLEWIGY
My96	100
1plg	IYPGNDDISY NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCAREV
1ae6	IDPGSGNTKY NEKFKGKATL TVDTSSSTAY MQLSSLTSED SAVYFCARGG
1for	IYPCGDNKY NQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYFCAREK
1lgy	INPSSVYTNV NQKFKDKATL TRDRSSNTAN IHLSSLTSED SAVYFCVREG
1bbj	ISPGNDDIKY NEKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYFCRASY
1nqb	IDPNSGGTKY NEKFKGKATL TVDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYFCARYD
1mim	IYPGNDDISY NQKFKGKATL TAVTSSSTAY MELSSLTSED SAVYFCRDY
1a6t	VDPNNGGTSF NQKFKGKATL TVDKSSSTAY MELSSLTSED SAVYFCARRD
1d5b	ILPGSGGTHY NEKFKGKATF TADKSSNTAY MQLSSLTSED SAVYFCARGH
1fa1	INPGKGYLSY NEKFKGKATL TVDRSSSTAY MQLSSLTSED AAVYFCARSF
My96	124
1plg	RLRY.....FDVWAGGTV TVSS (配列番号 73)
1ae6	K.....FA MDVWQGTSV TVSS (配列番号 74)
1for	TTY.....YA MDVWQGTSV TVSS (配列番号 75)
1lgy	NYPY.....A MDVWQGTSV TVSS (配列番号 76)
1bbj	E VPYWQGTV TVSS (配列番号 77)
1nqb	YGHW.....GQGTTL TVSS (配列番号 78)
1mim	YYS.....SY FDVWQGTV TVSS (配列番号 79)
1a6t	GYFY.....DFWQGTV TVSS (配列番号 80)
1d5b	DY.....Y FDVWQGTV TVSS (配列番号 81)
1fa1	SYFY.....D GDVWQGTV TVSS (配列番号 82)
	YGSGLAVY FDSWQGTV TVSS (配列番号 83)

残基の番号付けは連続的である

【図 12】

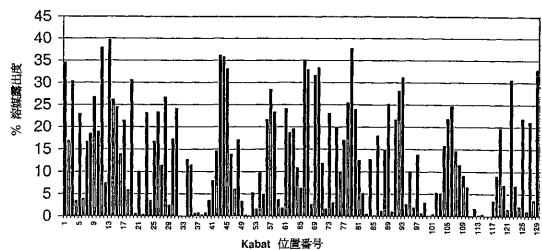
A

muMy9-6 軽鎖の相対的露出度



B

muMy9-6 重鎖の相対的露出度



【図 13-A】

muMy 9-6 軽鎖の表面残基					
Kabat 位置 #	平均 露出度	> 30% 平均露出度	25%-35% 平均露出度	同一な 隣接	muMy9-6 表面
1	51.46	1			N1
3	35.42	3			M3
5	31.82	5	5	NA	T5
7	28.04		7	26.17	
9	40.08	9			S9
10	29.04		10	27.76	
12	29.63		12	22.32	他のAの
15	34.39	15	15	18.20	33.36 A15
16	25.61		16	NA	
17	26.21		17	25.11	
18	44.83	18			K18
20	28.91		20	29.11	
40	45.25	40			P40
41	44.52	41			G41
42	35.34	42			Q42
45	32.68	45	45	32.58	K45
57	39.81	57			G57
60	46.07	60			D60
63	25.60		63	26.87	
65	25.28		65	24.07	
67	32.05	67	67		11ve 除外 S67
70	29.16		70	29.28	30.13 D70
76	26.02		76	24.29	
79	26.83		79	NA	
80	32.78	80	80	NA	S80
81	39.95	81			E81
100	33.79	100	100	34.05	G100
103	30.30	103	103	30.30	K103
105	26.42		105	26.96	
107	41.06	107			K107
108	49.29	108			R108
109	41.85	109			A109

【図 13-B】

muMy 9-6 重鎖の表面残基					
Kabat 位置 #	平均 露出度	> 30% Ave 平均露出度	25%-35% 平均露出度	同一な 隣接	muMy9-6 表面
1	40.08	1			Q1
3	38.62	3			Q3
5	28.06		5	NA	
9	35.98	9			A9
11	48.07	11			V11
13	49.75	13			K13
14	32.39	14	14	32.20	P14
15	30.69	15	15	31.84	G15
17	26.01		17	26.67	
19	37.64	19			K19
23	29.92		23	30.11	K23
26	29.48		26	31.43	G26
28	33.67	28	28	35.59	T28
41	44.46	41			P41
42	46.28	42			G42
43	42.00	43			Q43
52B	25.21		52B	25.21	
53	28.84		53	28.84	
56	29.08		56	29.08	
61	43.12	61			Q61
62	44.46	62			K62
64	38.56	64			K64
65	41.85	65			G65
68	28.38		68	28.30	
70	25.14		70	28.21	
73	32.97	73	73	35.71	K73
74	47.68	74			S74
75	26.67		75	27.22	
82B	32.62	82B	82B	30.58	S82B
83	26.03		83	26.52	
84	35.34	84			S84
85	37.78	85			E85
105	36.29	105			A105
108	25.74		108	28.73	
110	26.94		110	23.38	
112	41.61	112			S112

【図 14】

CDR残基から5 Å以内にある
muMy 9-6の表面残基

軽鎖	重鎖
N1	Q1
M3	T28
T5	K64
K45	K73
G57	
D60	
S67	
D70	

【図 15】

抗体	上位5つの最も相補的なトク体表面		配列番号	重鎖	配列番号	軽鎖
	muMy9-6	21H9				
muMy9-6	N M T S A K P Q K G D S D S E G K K R A	84	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K K I G K I S S S E A S	90		
21H9	D Q T S V R P G E K G S S D P E G K K R T	85	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K K Q Q G T P S S E K S	91		
EL-14	D V T S V R P G K K G S S D P E G K K R -	86	Q Q A A K P G K G T P G Q Q K K Q Q G S S S E Q S	92		
CLL-412	D Q T S V R P G K K G S S D P E G K K R T	87	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K K Q Q G T S S S E Q S	93		
LC3bPB	E V T G P R P G Q R G S S D P E Q K K R -	88	- Q Q A V K P G K G T P G Q Q K K Q Q G K S S S E Q S	94		
CLL169	D V T L L P P G Q R G D A D A Q R K K R -	89	Q Q A V K P G K G T P G Q Q K K Q Q G K S S S E Q S	95		

【図 16-A】

ヒトMy9-6軽鎖の型

Kabat #	10	20	27b	34	44
muMy9-6	NIMLTQSPSS	LAVSAGEKVT	MSCKSSQSVF	FSSSQKNYLA	WYQQIPGQSP
huMy9-6 V1.0	EIVLTQSPGS	LAVSAGEKVT	MSCKSSQSVF	FSSSQKNYLA	WYQQIPGQSP
huMy9-6 V1.1	N.M.				
huMy9-6 V1.2	N.M.				
huMy9-6 V1.3	E.V.				
huMy9-6 V1.4	N.M.				
huMy9-6 V1.5	N.M.				
huMy9-6 V1.6	E.V.				
huMy9-6 V1.7	E.V.				
huMy9-6 V1.8	E.M.				
huMy9-6 V1.9	E.M.				
huMy9-6 V1.10	E.M.				
huMy9-6 V1.11	E.M.				
huMy9-6 V1.12	N.V.				
huMy9-6 V1.13	N.V.				
huMy9-6 V1.14	N.V.				
huMy9-6 V1.15	N.V.				

Kabat #	54	64	74	84	94
muMy9-6	KLIIYWASTR	ESGVDPDRFTG	SGSOTDFTLT	ISSVQSEDLA	IYYCHQYLSS
huMy9-6 V1.0	KLIIYWASTR	ESGVDPDRFTG	SGSOTDFTLT	ISSVQSEDLA	IYYCHQYLSS
huMy9-6 V1.1	K.				
huMy9-6 V1.2	K.				
huMy9-6 V1.3	R.				
huMy9-6 V1.4	R.				
huMy9-6 V1.5	R.				
huMy9-6 V1.6	K.				
huMy9-6 V1.7	K.				
huMy9-6 V1.8	K.				
huMy9-6 V1.9	R.				
huMy9-6 V1.10	K.				
huMy9-6 V1.11	K.				
huMy9-6 V1.12	R.				
huMy9-6 V1.13	R.				
huMy9-6 V1.14	K.				
huMy9-6 V1.15	K.				

Kabat #	108
muMy9-6	RTFGQGTLE IKR
huMy9-6 V1.0	RTFGQGTLE IKR
huMy9-6 V1.1	
huMy9-6 V1.2	
huMy9-6 V1.3	
huMy9-6 V1.4	
huMy9-6 V1.5	
huMy9-6 V1.6	
huMy9-6 V1.7	
huMy9-6 V1.8	
huMy9-6 V1.9	
huMy9-6 V1.10	
huMy9-6 V1.11	
huMy9-6 V1.12	
huMy9-6 V1.13	
huMy9-6 V1.14	
huMy9-6 V1.15	

(配列番号8)

(配列番号10)

【図 16-B】

ヒトMy9-6重鎖の型

Kabat #	10	20	30	40	50
muMy9-6	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKM	SKKASGYTFT	SYIHNIKQT	PQGLEWVGV
huMy9-6 V1.0	QVQLQQPGAE	VVKPGASVKM	SKKASGYTFT	SYIHNIKQT	PQGLEWVGV
huMy9-6 V1.1					
huMy9-6 V1.2					
huMy9-6 V1.3					
huMy9-6 V1.4					
huMy9-6 V1.5					
huMy9-6 V1.6					
huMy9-6 V1.7					
huMy9-6 V1.8					
huMy9-6 V1.9					
huMy9-6 V1.10					
huMy9-6 V1.11					
huMy9-6 V1.12					
huMy9-6 V1.13					
huMy9-6 V1.14					
huMy9-6 V1.15					

Kabat #	59	69	79	86	96
muMy9-6	IYPGNDDISY	NQKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLSLTSIED	SAVYYCAREV
huMy9-6 V1.0	IYPGNDDISY	NQKFKGKATL	TADKSSTTAY	MQLSLTSIED	SAVYYCAREV
huMy9-6 V1.1					
huMy9-6 V1.2					
huMy9-6 V1.3					
huMy9-6 V1.4					
huMy9-6 V1.5					
huMy9-6 V1.6					
huMy9-6 V1.7					
huMy9-6 V1.8					
huMy9-6 V1.9					
huMy9-6 V1.10					
huMy9-6 V1.11					
huMy9-6 V1.12					
huMy9-6 V1.13					
huMy9-6 V1.14					
huMy9-6 V1.15					

Kabat #	105	112
muMy9-6	RLRYPDVWGA	GTPTTVSS
huMy9-6 V1.0	RLRYPDVWGA	GTPTTVSS
huMy9-6 V1.1		
huMy9-6 V1.2		
huMy9-6 V1.3		
huMy9-6 V1.4		
huMy9-6 V1.5		
huMy9-6 V1.6		
huMy9-6 V1.7		
huMy9-6 V1.8		
huMy9-6 V1.9		
huMy9-6 V1.10		
huMy9-6 V1.11		
huMy9-6 V1.12		
huMy9-6 V1.13		
huMy9-6 V1.14		
huMy9-6 V1.15		

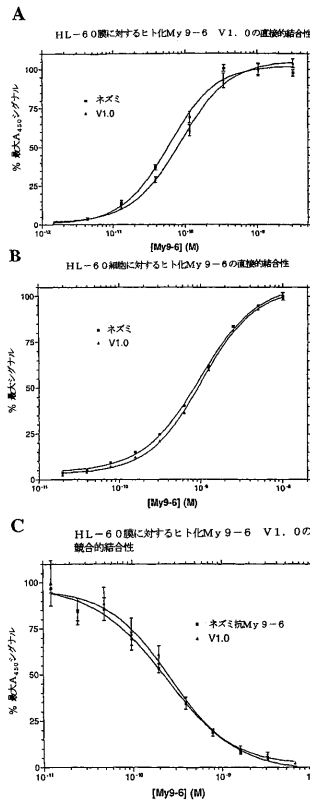
(配列番号7)

(配列番号9)

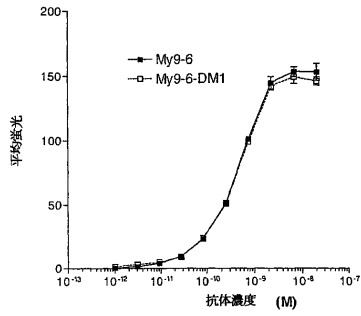
【図 17】

My9-6 K _D 値			
	膜における直接的	膜における競合的	細胞における直接的
	pM	pM	nM
ネズミ	51.34+/-8.74	173.64+/-39.29	1.10+/-0.13
V1.0	66.53+/-17.83	209.00+/-52.37	1.02+/-0.04
V1.1	83.57+/-13.82	279.50+/-152.03*	1.07+/-0.11*
V1.3	63.95+/-0.64*	203.05+/-153.83*	1.16+/-0.39*
V1.6	56.10+/-15.13*	216.50+/-70.00*	0.97+/-0.08*

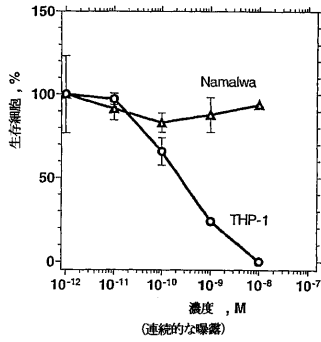
【図 18】



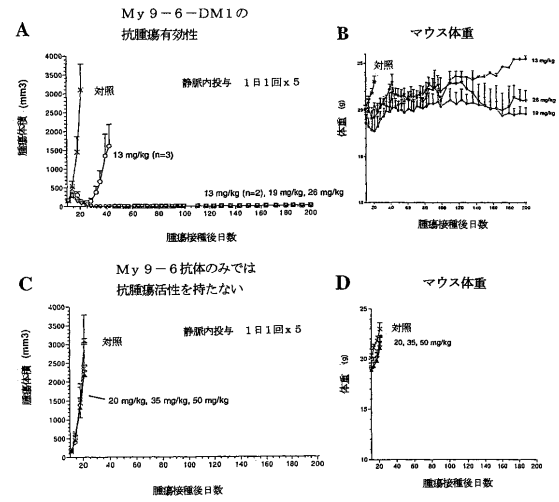
【図 19】



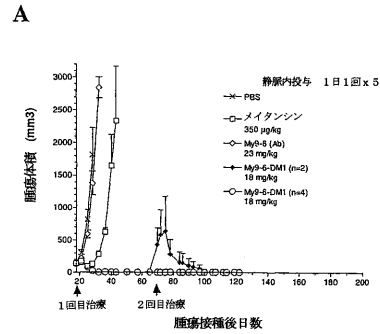
【図 20】



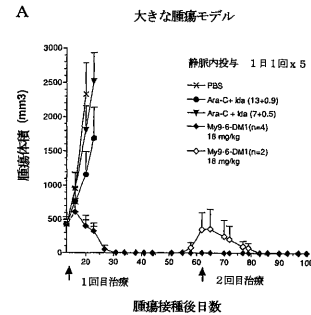
【図 21】



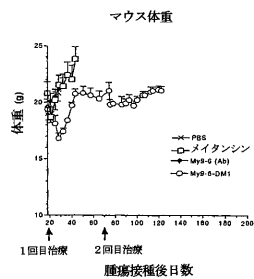
【図 22】



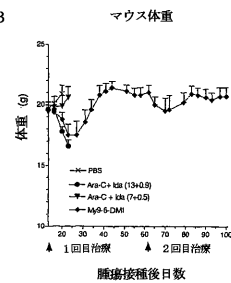
【図 23】



B

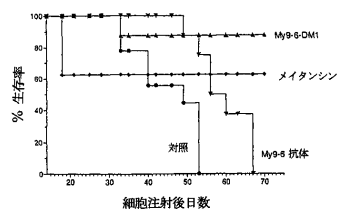


B

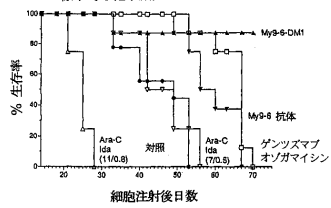


【図 2 4】

A 生存モデルにおける
My 9-6-DM1の有効性



B My 9-6-DM1 と
ゲンツズマブ・オゾガマイシン及び
標準的な化学療法との比較



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/32737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(7) : A61K 39/395, 39/40, 39/42, 39/44; C12N 15/00, 5/06, 5/16; C07H 21/04
 US CL : 424/133.1, 143.1, 155.1, 181.1; 435/69.1, 328, 330; 530/387.3, 388.22, 388.8, 391.7; 536/23.53

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)

U.S. : 424/133.1, 143.1, 155.1, 181.1; 435/69.1, 328, 330; 530/387.3, 388.22, 388.8, 391.7; 536/23.53

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 94/10332 A1 (TEMPEST et al) 11 May 1994 (11.05.1994), see page 23, sequence 28, which sahes 93% amino acid identity with instantly clmed sequence 8.	6

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

"T"

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

"X"

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

"Y"

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

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 September 2004 (23.09.2004)

Date of mailing of the international search report

12 OCT 2004

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
 Commissioner for Patents
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 Facsimile No. (703) 305-3230

Authorized officer

David J. Blanchard

Telephone No. (571) 272-0827

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US03/32737

Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:

WEST, Medline, EMBASE, CAPLUS, Cancerlit, Biotechno Biosis, Lifesci, Geneseq, Swissprot, PIR 78, SPTREMBL, issued and published patents.

Search terms: SEQ ID NOS:1-10, CD33, antibody, immunoconjugate, acute myeloid leukemia, chronic myeloid leukemia, inventor search.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US03/32737

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claim 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. ☒ Claim Nos.: 36 and 46
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 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.

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	4 C 0 8 5
C 0 7 K 1/22 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 0 5	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 1/22	
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
G 0 1 N 33/53 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 D	
C 1 2 N 15/02 (2006.01)	G 0 1 N 33/53 U	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	G 0 1 N 33/574 D	
A 6 1 K 38/00 (2006.01)	C 1 2 N 15/00 C	
A 6 1 K 51/00 (2006.01)	C 1 2 N 5/00 A	
	C 1 2 N 5/00 B	
	A 6 1 K 37/02	
	A 6 1 K 49/02	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100128750

弁理士 福所 しのぶ

(72)発明者 ホフィー, メアリー・ジー

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 2 4 6 7, ブルックライン, リランド・ロード 5 9

(72)発明者 タヴァレス, ダニエル

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 1 7 6 0, ナティック, シルヴェスター・ロード 2 7

(72)発明者 ルッツ, ロバート・ジェイ

アメリカ合衆国マサチューセッツ州0 1 7 7 8, ウェイランド, オールド・コネチカット・パス
2 1 8

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA36 BA45 CA04 CA20 DA02 EA04 GA11 HA14
4B064 AG26 AG27 CA10 CA19 CA20 CC24 CD13 CD21 CE12 DA13
4B065 AA91Y AA93X AB01 AB05 AC14 BA02 BB12 BB25 BB37 BC03
BC07 BD14 CA25 CA44 CA46
4C076 CC27 EE59 FF67 FF70
4C084 AA02 AA07 BA02 BA08 NA14 ZB27
4C085 AA13 AA14 AA21 AA26 CC23 EE01 HH01 HH03 HH11 HH20
KA03 KA04 KA26 KA27 KA29 KB07 KB09 KB15 KB18 LL18
4H045 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2006505277A5	公开(公告)日	2007-07-26
申请号	JP2004551530	申请日	2003-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	伊缪诺金公司		
申请(专利权)人(译)	Imyunojen公司		
[标]发明人	ホフィーメアリー・ジー タヴァレスダニエル ルッツロパートジェイ		
发明人	ホフィー,メアリー・ジー タヴァレス,ダニエル ルッツ,ロパート・ジェイ		
IPC分类号	C12N15/09 A61K39/395 A61K47/48 A61K49/00 A61P35/02 A61P43/00 C07K1/22 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53 G01N33/574 C12N15/02 C12N5/10 A61K38/00 A61K51/00		
CPC分类号	C07K16/2803 A61K39/3955 A61K47/6803 A61K47/6849 A61K2039/505 C07K16/2896 C07K2317/24 C07K2317/56 C07K2317/565 C07K2317/70 C07K2317/92		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A A61K39/395.D A61K39/395.T A61K47/48 A61K49/00.A A61P35/02 A61P43/00.105 C07K1/22 C07K16/28 C12N1/15 C12N1/19 C12N1/21 C12P21/08 G01N33/53.D G01N33/53.U G01N33/574.D C12N15/00.C C12N5/00.A C12N5/00.B A61K37/02 A61K49/02		
F-TERM分类号	4B024/AA01 4B024/BA36 4B024/BA45 4B024/CA04 4B024/CA20 4B024/DA02 4B024/EA04 4B024/GA11 4B024/HA14 4B064/AG26 4B064/AG27 4B064/CA10 4B064/CA19 4B064/CA20 4B064/CC24 4B064/CD13 4B064/CD21 4B064/CE12 4B064/DA13 4B065/AA91Y 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/AB05 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/BB12 4B065/BB25 4B065/BB37 4B065/BC03 4B065/BC07 4B065/BD14 4B065/CA25 4B065/CA44 4B065/CA46 4C076/CC27 4C076/EE59 4C076/FF67 4C076/FF70 4C084/AA02 4C084/AA07 4C084/BA02 4C084/BA08 4C084/NA14 4C084/ZB27 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/AA21 4C085/AA26 4C085/CC23 4C085/EE01 4C085/HH01 4C085/HH03 4C085/HH11 4C085/HH20 4C085/KA03 4C085/KA04 4C085/KA26 4C085/KA27 4C085/KA29 4C085/KB07 4C085/KB09 4C085/KB15 4C085/KB18 4C085/LL18 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74 4H045/GA26		
代理人(译)	小林 泰 千叶昭夫		
优先权	60/424332 2002-11-07 US		
其他公开文献	JP2006505277A JP5354835B2		

摘要(译)

本发明涉及结合CD33的抗体。更具体地，本发明涉及抗CD33抗体，这些抗体的片段和同源物，这些抗体的人源化和表面重构形式，这些抗体的功能等同物和改进形式，免疫缀合物和包含这些抗体的组合物，及其在诊断中的用途，研究和治疗应用。本发明还涉及编码这些抗体的多核苷酸，包含所述多核苷酸的载体，用多核苷酸转化的宿主细胞和产生这些抗体的方法。

