

(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2014-534221

(P2014-534221A)

(43) 公表日 平成26年12月18日(2014.12.18)

| (51) Int.Cl.                 | F I            | テーマコード (参考) |
|------------------------------|----------------|-------------|
| <b>C07K 16/28 (2006.01)</b>  | C07K 16/28     | 4B024       |
| <b>C12N 15/09 (2006.01)</b>  | C12N 15/00 A   | 4B064       |
| <b>C12N 15/00 (2006.01)</b>  | C12N 15/00 ZNA | 4C085       |
| <b>C12P 21/08 (2006.01)</b>  | C12P 21/08     | 4H045       |
| <b>A61K 39/395 (2006.01)</b> | A61K 39/395 D  |             |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2014-539084 (P2014-539084)  
 (86) (22) 出願日 平成24年10月26日 (2012.10.26)  
 (85) 翻訳文提出日 平成26年6月24日 (2014.6.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2012/062266  
 (87) 国際公開番号 W02013/063498  
 (87) 国際公開日 平成25年5月2日 (2013.5.2)  
 (31) 優先権主張番号 61/551, 852  
 (32) 優先日 平成23年10月26日 (2011.10.26)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 511144491  
 ザ リージェンツ オブ ザ ユニバーシ  
 ティ オブ カリフォルニア  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 607-5200, オークランド, フ  
 ランクリン ストリート 1111, ト  
 ウウェルファス フロア, オフィス オブ  
 テクノロジー トランスファー  
 (74) 代理人 100109726  
 弁理士 園田 吉隆  
 (74) 代理人 100101199  
 弁理士 小林 義教

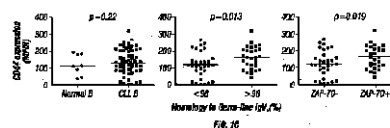
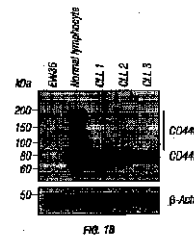
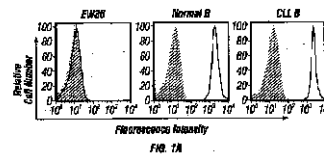
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 B細胞性慢性リンパ性白血病および他の血液悪性腫瘍の治療のためのCD44モノクローナル抗体

(57) 【要約】

CD44に特異的な抗体を含む組成物を提供する。これらの抗体は、血液悪性腫瘍細胞に特異的に結合する。また、治療および診断目的で、CD44を発現する細胞を標的とするためにCD44抗体を使用する方法も提供する。

【選択図】 図1A、図1B、図1C



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

C D 4 4 に特異的に結合する、単離された抗体または抗体断片。

## 【請求項 2】

その抗体断片は、F a b 断片、F ( a b ) 2 断片、F V 断片、単鎖 F V ( s c F V ) 断片、d s F V 断片、C H 断片、および二量体 s c F V からなる群から選択される、請求項 1 に記載の抗体または抗体断片。

## 【請求項 3】

前記抗体または抗体断片は、ヒト化されている、請求項 1 に記載の抗体または抗体断片。

10

## 【請求項 4】

前記抗体または抗体断片は、C L L 細胞上に発現される C D 4 4 に特異的に結合する、請求項 1 に記載の抗体または抗体断片。

## 【請求項 5】

請求項 1 に記載の抗体または抗体断片と、薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載の抗体をコードする、単離された核酸分子。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の核酸分子を含む、発現ベクター。

20

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の抗体または抗体断片を生成する方法であって、

i ) 請求項 1 に記載の抗体または抗体断片をコードする核酸分子を含む発現構築物で宿主細胞を形質転換することと、

i i ) コンジュゲートを生成するのに好適な条件下で前記宿主細胞を培養し、それによってタンパク質コンジュゲートを生成することと、を含む、方法。

## 【請求項 9】

試料中の C D 4 4 タンパク質を検出するための方法であって、

( a ) 前記試料を請求項 1 に記載の検出可能に標識された抗体または抗体断片と接触させることと、

( b ) 前記検出可能に標識されたペプチドと試料中の C D 4 4 との間の免疫反応性を検出することと、を含む、方法。

30

## 【請求項 10】

( c ) C D 4 4 の対照レベルと比較して、前記対象において C D 4 4 タンパク質の量における増加または減少が生じたかどうかを判定することをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。

## 【請求項 11】

抗体または抗体断片に、C D 4 4 受容体を有する細胞を標的とさせる方法であって、前記細胞を本発明の抗体と接触させることを含む、方法。

## 【請求項 12】

血液悪性腫瘍細胞を含むことが分かっているかまたは疑われる対象からの試料において、C D 4 4 タンパク質の存在を検出するためのキットであって、請求項 1 に記載の抗体または抗体断片と、アッセイ環境においてそれを使用するための指示と、を含む、キット。

40

## 【請求項 13】

血液悪性腫瘍を治療または予防するための方法であって、治療有効量の C D 4 4 に対する抗体を、それを必要とする対象に投与することを含む、方法。

## 【請求項 14】

血液悪性腫瘍を有するかまたは有するリスクのある対象を治療するための治療計画を監視する方法であって、C D 4 4 に特異的な抗体を投与することの結果としての C D 4 4 タンパク質の活性または発現における変化を判定し、それによって前記対象における前記治

50

療計画を監視することを含む、方法。

【請求項 15】

CLL細胞上のCD44に結合する抗CD44抗体がそれに生存優位性を付与する、CLLを治療または予防するための方法であって、請求項1に記載の抗体または抗体断片を投与することを含む、方法。

【請求項 16】

対象における血液悪性腫瘍を治療または予防するための方法であって、CD44に特異的に結合する治療有効量の抗体を、それを必要とする対象に投与することを含み、前記血液悪性腫瘍は、化学療法および/または生物学的療法に不応である、方法。

【請求項 17】

前記化学療法は、プリンヌクレオシド類似体を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項 18】

前記化学療法は、アルキル化剤を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項 19】

前記化学療法は、プリンヌクレオシド類似体およびアルキル化剤を含む、請求項16に記載の方法。

【請求項 20】

前記血液悪性腫瘍は、化学療法および生物学的療法に不応である、請求項16に記載の方法。

【請求項 21】

前記生物学的療法は、モノクローナル抗体を含む、請求項16または20に記載の方法

。

【請求項 22】

前記モノクローナル抗体は、抗CD20抗体である、請求項21に記載の方法。

【請求項 23】

前記血液悪性腫瘍は、白血病である、請求項16に記載の方法。

【請求項 24】

前記白血病は、リンパ性白血病である、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

前記リンパ性白血病は、B細胞性慢性リンパ性白血病(CLL)である、請求項24に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

本出願は、2011年10月26日に提出された米国特許仮出願第61/551,852号の利益を主張するものであり、その内容全体は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

助成金情報

本発明は、米国立衛生研究所(National Institutes of Health)の助成金番号P01CA081534およびR37CA049780の下、政府の支援によりなされたものである。政府は、本発明において特定の権利を有する。

【背景技術】

【0003】

本発明は、概して、血液悪性腫瘍を標的とする抗体に関する。本発明はさらに、CD44に特異的に結合し、慢性リンパ性白血病細胞を標的とする抗体に関する。

【0004】

背景情報

血液悪性腫瘍は、血液、骨髄、およびリンパ節に影響を及ぼす。これらの悪性腫瘍は、

10

20

30

40

50

典型的には、2つの主要な血液細胞系列である骨髄細胞株およびリンパ球系細胞株のいずれかに由来する。骨髄系細胞株は、通常、顆粒球、赤血球、血小板、マクロファージ、およびマスト細胞を産生し、リンパ球系細胞株は、B、T、NK、およびプラズマ細胞を産生する。リンパ腫、リンパ性白血病、および骨髄腫は、リンパ球系に由来し、急性および慢性の骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、ならびに骨髄増殖性疾患は、骨髄起源である。

#### 【0005】

B細胞性慢性リンパ性白血病（CLL）は、高度に可変性の臨床経過を有し、血液、二次リンパ組織、および骨髄におけるCD5 + B細胞のクローン発現によって特徴付けられる。CLLは、可変性の予後を伴う異種疾患である：無痛期間および実質的に通常の平均余命を有する患者もあれば、侵襲性疾患および短い生存期間を有する患者もある。CLLに罹患する患者は、一般的に、疾患初期には治療を受けず、疾患の進行を監視する。治療は、通常、患者の生活の質が影響を受けた時に開始される。CLLの治癒は存在しないが、この疾患は典型的には治療可能であり、現在の標準的な化学療法計画により生存期間が延長されることが示されている。しかしながら、標準的な化学療法計画に不応であるか、または不応になるCLL患者の集団が存在する。

10

#### 【0006】

CLL細胞の生存は、組織環境内の細胞によって、ならびに細胞外マトリックス、およびCLL細胞上に高レベルで発現されるCD44との相互作用のシグナルによって支持される。CD44は、細胞間接着および細胞-マトリックス間接着、細胞遊走の支持、対応する細胞表面受容体または関連基質への成長因子、ケモカイン、または酵素の提示、ならびに膜から細胞骨格または核へのシグナルの伝達を含む、多くの生理的および病的機能に關与する多重構造の糖タンパク質である [Naor, D., et al. Adv. Cancer Res. 71, 241 - 319, (1997); Lesley, J., et al. Adv. Immunol. 54, 271 - 335, (1993)]。このタンパク質は、リンパ球の活性化、再循環、およびホーミング、造血発生、ならびに腫瘍転移を含む様々な細胞機能に關与する。この糖タンパク質は、複数のリガンド（例えば、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、アラニン、コラーゲン）に結合することが分かっており、その主たるものはヒアルロン酸（HA）である。

20

#### 【0007】

多くのCLL患者がCLLの標準的な化学療法計画に反応する一方で、上で述べたように、これらの標準的な治療に不応であるか、または不応になるCLL患者の集団が存在する。これらの患者集団には、既存の化学療法計画のいずれも奏功しないため、CLLを治療するための新しい治療法の必要性が明らかである。本発明は、そのような治療法である、CLL細胞に特異的な新規CD44抗体を提供する。

30

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

本発明は、非常に影響力の大きい抗CD44抗体の生成に基づいている。また、本発明は、抗CD44抗体を使用して血液悪性腫瘍を治療または予防する方法に基づいている。さらに、本発明は、CD44抗体を作製する方法を提供する。

#### 【0009】

一態様において、本発明は、CD44に特異的に結合する抗体または抗体断片を提供する。

40

#### 【0010】

別の態様において、抗体断片は、Fab断片、F(ab)<sub>2</sub>断片、Fv断片、単鎖Fv (scFv)断片、dsFv断片、CH断片、または二量体scFvを含む。

#### 【0011】

種々の実施形態において、抗体または抗体断片は、ヒト化されている。

#### 【0012】

さらなる態様において、本発明は、CLL細胞上のCD4に特異的に結合する抗体または抗体断片を提供する。

50

## 【 0 0 1 3 】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体または抗体断片をコードする単離された核酸を提供する。さらなる実施形態において、本発明は、抗体をコードする核酸を含む発現ベクターを提供する。

## 【 0 0 1 4 】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体または抗体断片と、任意選択的に、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物を提供する。

## 【 0 0 1 5 】

別の態様において、本発明は、抗体を生成する方法を提供する。この方法は、抗体をコードする核酸分子を含む発現構築物で宿主細胞を形質転換することと、抗体を生成するのに好適な条件下で宿主細胞を培養し、それによって抗体を生成することを含む。

10

## 【 0 0 1 6 】

別の態様において、本発明は、試料中のCD44タンパク質を検出するための方法を提供する。

## 【 0 0 1 7 】

別の態様において、本発明は、抗体に、CD44受容体を有する細胞を標的とさせる方法を提供する。この方法は、細胞を本発明の抗体と接触させることを含む。

## 【 0 0 1 8 】

別の態様において、本発明は、血液悪性腫瘍細胞を含むことが分かっているかまたは疑われる対象からの試料においてCD44タンパク質の存在を検出するためのキットを提供する。このキットは、抗体と、アッセイ環境においてそれを使用するための指示とを含む。

20

## 【 0 0 1 9 】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体を使用してヒト対象における血液悪性腫瘍を治療するための方法を提供する。

## 【 0 0 2 0 】

別の態様において、本発明は、本発明のCD44抗体を投与することにより、CLL細胞上のCD44に結合する抗体がそれに生存優位性を付与する、CLLを治療または予防するための方法を提供する。

## 【 0 0 2 1 】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体を使用して、血液悪性腫瘍を有するかまたは有するリスクのある対象を治療するための治療計画を監視する方法を提供する。

30

## 【 0 0 2 2 】

もう一つの態様において、本発明は、対象における血液悪性腫瘍を治療または予防するための方法を提供し、該方法は、治療有効量のCD44に対する抗体を必要とする対象に投与することを含み、血液悪性腫瘍は、化学療法および/または生物学的療法に不応である。一実施形態において、化学療法は、プリンヌクレオシド類似体および/またはアルキル化剤を含む。別の実施形態において、血液悪性腫瘍は、化学療法および生物学的療法に不応である。さらなる実施形態において、生物学的療法は、モノクローナル抗体を含む。一実施形態において、モノクローナル抗体は、抗CD20抗体である。いくつかの実施形態において、血液悪性腫瘍は、白血病である。別の実施形態において、白血病は、リンパ性白血病である。もう一つの実施形態において、リンパ性白血病は、B細胞性慢性リンパ性白血病(CLL)である。

40

## 【 図面の簡単な説明 】

## 【 0 0 2 3 】

【 図 1 A 】 慢性リンパ性白血病B細胞上のCD44の発現レベルが疾患侵襲性の特性と関連することを示す。

## 【 図 1 B 】 同上。

## 【 図 1 C 】 同上。

【 図 2 A 】 ZapAP-70 + CLL細胞に対する効力を増加させると、抗CD44

50

mAbが、CLL細胞のアポトーシスを *in vitro* で直接誘導することを示す。

【図2B】同上。

【図2C】同上。

【図2D】同上。

【図2E】同上。

【図2F】同上。

【図3A】CLL細胞中で抗CD44 mAbによって媒介されたアポトーシスがカスパーゼ依存性であることを示す。

【図3B】同上。

【図3C】同上。

【図4】たとえばMSCの存在下であっても、抗CD44 mAbがZAP-70+ CLL細胞のアポトーシスを選択的に誘導することを示す。

【図5A】抗CD44モノクローナル抗体が、CLL細胞中でHAによって誘導されるAKTのリン酸化および生存をブロックすることを示す。

【図5B】同上。

【図5C】同上。

【図5D】同上。

【図6A】抗CD44 mAbが、CLL細胞におけるCD44およびZAP-70タンパク質の発現を下方制御し、CD44-ZAP-70複合体を妨害し、BCRが誘導する生存シグナル伝達を抑制することを示す。

【図6B】同上。

【図6C】同上。

【図6D】同上。

【図6E】同上。

【図6F】同上。

【図6G】同上。

【図6H】同上。

【図7A】抗CD44 mAbが *in vivo* でのCLL細胞の生存を妨げることを示す。

【図7B】同上。

【図8】抗CD44 mAbは、CLL細胞の食作用を媒介することができるが、補体誘導性の細胞死は媒介できないことを示す。

【図9】CLL細胞において同様のCD44の発現レベル(MFIR)を有するZAP-70の発現を伴うかまたは伴わない患者に、抗CD44 mAbが与える影響を示す。

【図10A】抗CD44 mAbまたはリツキシマブで処理したCLL細胞の生存率を表す。

【図10B】同上。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本発明は、非常に影響力の大きい抗CD44抗体の生成に基づいている。また、本発明は、抗CD44抗体を使用して血液悪性腫瘍を治療または予防する方法に基づいている。さらに、本発明は、CD44抗体を作製する方法を提供する。

【0025】

本発明の方法について説明する前に、記載される特定の組成物、方法、および実験条件は変化し得るため、本発明は、そのような組成物、方法、および条件に限定されないということを理解されたい。また、本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲においてのみ限定されるため、本明細書において使用される専門用語は、特定の実施例を説明する目的で使用されているに過ぎず、限定的であることを意図するものではないことも理解されたい。

【0026】

本明細書および添付の特許請求の範囲において使用される場合、文脈上、明らかにそうで

10

20

30

40

50

はないという指示のない限り、単数形の「a」、「an」、および「the」は、複数形の指示対象を含むものとする。よって、例えば、「方法(the method)」への言及は、本開示等を読むことにより当業者に明らかとなるであろう本明細書に記載される種類の1つ以上の方法および/またはステップを含む。

【0027】

別途定義されない限り、本明細書において使用される全ての技術用語および化学用語は、本発明が属する技術分野の当業者に一般的に理解されるのと同じ意味を有するものとする。

【0028】

前述のように、血液悪性腫瘍は、血液、骨髄、およびリンパ節に影響を及ぼす。これらの悪性腫瘍は、2つの主要な血液細胞系列である骨髄細胞株およびリンパ球系細胞株のいずれかに由来する。骨髄系細胞株は、通常、顆粒球、赤血球、血小板、マクロファージ、およびマスト細胞を産生し、リンパ球系細胞株は、B、T、NK、およびプラズマ細胞を産生する。リンパ腫、リンパ性白血病、および骨髄腫は、リンパ球系に由来し、急性および慢性の骨髄性白血病、骨髄異形成症候群、ならびに骨髄増殖性疾患は、骨髄起源である。

10

【0029】

歴史的に、血液悪性腫瘍は、悪性腫瘍が主に血液中に位置するか(白血病)、またはリンパ節に位置するか(リンパ腫)によって、最も一般的に分割されてきた。白血病は、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、慢性骨髄性白血病、および急性単球性白血病を含む。リンパ腫は、ホジキンリンパ腫および非ホジキンリンパ腫を含む。

20

【0030】

急性リンパ芽球性白血病(ALL)は、白血病の一形態であり、つまりは過剰なリンパ芽球によって特徴付けられる白血球の癌である。急性骨髄性白血病(acute myelogenous leukemia)としても知られる急性骨髄性白血病(Acute myeloid leukemia: AML)は、血液細胞の骨髄系列の癌であり、骨髄中に蓄積して正常な血液細胞の産生を妨げる異常な白血球の急速な増殖によって特徴付けられる。慢性顆粒球性白血病(CGL)としても知られる慢性骨髄性(または骨髄性)白血病(CML)は、白血球の癌である。これは、骨髄における主として骨髄系細胞の増加する未制御の増殖、および血液中のこれらの細胞の蓄積によって特徴付けられる白血病の一形態である。慢性リンパ性白血病(CLL)としても知られるB細胞性慢性リンパ性白血病(B-CLL)は、最も一般的な種類の白血病である。CLLは、B細胞に影響を及ぼす。急性単球性白血病(AMoLまたはAML-M5)は、急性骨髄性白血病の一種であると考えられる。以前はホジキン病として知られていたホジキンリンパ腫は、リンパ腫の一種であり、リンパ球と呼ばれる白血球から生じる癌である。非ホジキンリンパ腫(NHL)は、ホジキンリンパ腫を除くあらゆる種類のリンパ腫を含む多様な血液癌の多様な群である。

30

【0031】

前述のように、CLLは一般的には治癒可能ではないが、通常、生存期間を延長する標準的な化学療法計画を用いて治療可能である。しかしながら、標準的な化学療法計画に不応であるか、または不応になるCLL患者の集団が存在する。CLLの標準治療は、化学療法、生物学的療法、放射線療法、幹細胞移植、およびこれらの組み合わせを含む。

40

【0032】

用語「抗CD44抗体」、「抗CD44」、「CD44抗体」、または「CD44に結合する抗体」は、抗体がCD44を標的とする際に診断薬および/または治療薬として有用であるように、十分な親和性でCD44に結合することができる抗体を指す。一実施形態において、抗CD44抗体は、CD44に特異的に結合する。

【0033】

一実施形態において、抗CD44抗体は、ヒト化モノクローナル抗体である。別の実施

50

形態において、ヒト化抗体は、CD44の定常領域に特異的に結合する。好ましい実施形態において、ヒト化抗体は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWeigand et al. Cancer Res. 2012 Sep 1; 72(17): 4329-39に記載されるRG7356抗体である。別の実施形態において、ヒト化抗体は、細胞の表面上に発現されたCD44に結合する際の細胞内への内在化によって特徴付けられる。

#### 【0034】

本明細書における用語「抗体」は、最も広義に使用され、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、および抗体断片を含む種々の抗体構造を包含する。

10

#### 【0035】

「抗体断片」は、無傷の抗体が結合する抗原に結合する無傷の抗体の一部を含む無傷の抗体以外の分子を指す。抗体断片の例として、限定されないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>；ダイアボディ；線形抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および抗体断片から形成される多重特異性抗体が挙げられる。抗体のパパイン消化は、各々が単一の抗原結合部位を有する「Fab」断片と呼ばれる2つの同一な抗原結合断片と、残りの「Fc」断片（その名称は、容易に結晶化する能力を反映している）とを生成する。ペプシン処理は、2つの抗原結合部位を有し、なおも抗原を架橋させることのできるF(ab')<sub>2</sub>断片を生じる。

#### 【0036】

参照抗体として「同じエピトープに結合する抗体」は、競合アッセイにおいて、参照抗体のその抗原に対する結合を50%以上阻害する抗体を指し、反対に、参照抗体は、競合アッセイにおいて、抗体のその抗原に対する結合を50%以上阻害する。例示的な競合アッセイを本明細書に提供する。

20

#### 【0037】

本明細書で使用される場合、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体を指す：すなわち、例えば、自然に生じる突然変異を含むか、またはモノクローナル抗体調製物の生成中に生じる、考えられる変異体抗体（そのような変異体は、一般に微量で存在する）を除いて、集団を構成する個々の抗体が同一であり、かつ/または同じエピトープに結合する。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基に対する抗体である。よって、「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に均一な抗体の集団から得られたという抗体の特徴を示しており、いずれか特定の方法による抗体の生成を必要とすると見なされるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、限定されないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全てまたは一部を含むトランスジェニック動物を用いた方法を含む様々な技術によって作製することができ、そのような方法およびモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法は、当業者に既知である。

30

#### 【0038】

「裸の抗体」は、異種部分（例えば、細胞毒性部分）または放射性標識とコンジュゲートされていない抗体を指す。裸の抗体は、薬学的処方物中に存在してもよい。

40

#### 【0039】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体のVHおよびVLドメインを含み、これらのドメインは、単一のポリペプチド鎖中に存在する。一般に、scFvポリペプチドは、VHドメインとVLドメインとの間にポリペプチドリンカーをさらに含み、それによって、scFvは、抗原結合に望ましい構造を形成することができる。scFvの概説については、例えば、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York, 1994), pp

50

． 269 - 315 の Pluckthun を参照のこと。

【0040】

抗体の「クラス」は、その重鎖が有する定常ドメインまたは定常領域の種類を指す。IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMの5つの主要な抗体のクラスが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、IgG<sub>4</sub>、IgA<sub>1</sub>、およびIgA<sub>2</sub>にさらに分割されてもよい。異なる免疫グロブリンのクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、および $\mu$ と称される。

【0041】

用語「ダイアボディ」は、2つの抗原結合部位を有する抗体断片を指し、これらの断片は、同じペプチド鎖（V<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>）内で軽鎖可変ドメイン（V<sub>L</sub>）に結合した重鎖可変ドメイン（V<sub>H</sub>）を含む。同じ鎖上の2つのドメイン間で対を形成するには短すぎるリンカーを用いることにより、ドメインは、別の鎖の相補的なドメインと対を形成することを余儀なくされ、2つの抗原結合部位を形成する。ダイアボディは、二価または二重特異性であり得る。ダイアボディは、例えば、欧州特許第404,097号、国際公開第WO1993/01161号、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)、およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993)に、より詳細に記載されている。また、トリアボディおよびテトラボディも、Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003)に記載されている。

10

20

【0042】

本明細書における目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、後に定義されるように、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン（V<sub>L</sub>）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（V<sub>H</sub>）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに「由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含むか、またはアミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施形態において、アミノ酸変化の数は、10個以下、9個以下、8個以下、7個以下、6個以下、5個以下、4個以下、3個以下、または2個以下である。いくつかの実施形態において、V<sub>L</sub>アクセプターヒトフレームワークは、V<sub>L</sub>ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

30

【0043】

「親和性成熟」抗体は、そのような変化を有しない親抗体と比較して、1つ以上の超可変領域（HVR）内に1つ以上の変化を有する抗体を指し、そのような変化は、抗原に対する抗体の親和性の向上をもたらす。

【0044】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体を抗原に結合させることに関与する抗体の重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖（それぞれ、V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>）の可変ドメインは、一般に同様の構造を有し、各ドメインが4つの保存フレームワーク領域（FR）と、3つの超可変領域（HVR）とを含む。（例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6. sup. th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007)を参照のこと）。単一のV<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>h、抗原結合特異性を付与するのに十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体は、相補性V<sub>L</sub>またはV<sub>H</sub>ドメインそれぞれのライブラリーをスクリーニングするために、抗原に結合する抗体からのV<sub>H</sub>またはV<sub>L</sub>ドメインを用いて単離されてもよい。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991)を参照のこと。

40

【0045】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンV<sub>L</sub>またはV<sub>H</sub>フレーム

50

ワーク配列の選択において、最も一般的に生じるアミノ酸残基を表すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンV LまたはV H配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。通常、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3に記載されるようなサブグループである。一実施形態において、V Lの場合、サブグループは、上記Kabat et al.に記載されるようなサブグループ I である。一実施形態において、V Hの場合、サブグループは、上記Kabat et al.に記載されるようなサブグループ III である。

10

## 【0046】

「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRのアミノ酸残基と、ヒトFRのアミノ酸残基とを含むキメラ抗体を指す。特定の実施形態において、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、全てのまたは実質的に全てのHVR（例えば、CDR）が非ヒト抗体のものに対応し、全てのまたは実質的に全てのFRがヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意選択的に、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含み得る。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を行った抗体を指す。

## 【0047】

用語「キメラ」抗体は、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の源または種に由来し、残りの重鎖および/または軽鎖が異なる源または種に由来する抗体を指す。

20

## 【0048】

「Fab」断片は、重鎖および軽鎖可変ドメインを含み、さらに軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常領域（CH1）を含む。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端に数個の残基が付加されていることにより、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を担持するFab'に対する本明細書における記号表示である。元々、F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として生成された。また、抗体断片の他の化学的結合も知られている。

## 【0049】

本明細書における用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。この用語は、天然配列Fc領域および変異体Fc領域を含む。

30

## 【0050】

「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域（HVR）の残基以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、通常、FR1、FR2、FR3、およびFR4の4つのFRドメインからなる。したがって、HVRおよびFR配列は、通常、VH（またはVL）内の次の配列に見られる：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

## 【0051】

用語「完全長抗体」、「無傷の抗体」、および「全抗体」は、天然抗体構造と実質的に同様の構造を有するか、または本明細書に定義されるようなFc領域を含む重鎖を有する抗体を指して、本明細書において交換可能に使用される。

40

## 【0052】

「Fv」は、完全な抗原結合部位を含む最小抗体断片である。一実施形態において、二本鎖Fv種は、緊密に非共有結合的に会合した1つの重鎖および1つの軽鎖の可変ドメインの二量体からなる。「二量体」構造類似体において、軽鎖および重鎖が二本鎖Fv種の類似体に会合できるように、一本鎖Fv(scFv)種において、1つの重鎖および1つの軽鎖の可変ドメインを可塑性ペプチドリンカーによって共有結合させることができる。この構成において、各可変ドメインの3つのHVRが相互作用し、VH-VL二量体の表

50

面上に抗原結合部位を画定する。集合的に、6つのHV Rが、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、たとえ単一の可変ドメイン（または抗原に特異的な3つのHV Rのみを含むFvの半分）であっても、全結合部位よりも低い親和性ではあるものの、抗原を認識して結合する能力を有する。

【0053】

「個体」または「対象」は、哺乳動物である。哺乳動物は、限定されないが、家畜（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、およびウマ）、霊長類（例えば、ヒト、およびサル等の非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびにげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）を含む。特定の実施形態において、個体または対象はヒトである。

【0054】

「単離された」抗体は、その天然の環境の構成成分から分離された抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点電気泳動（IEF）、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフィー（例えば、イオン交換もしくは逆相HPLC）により、95%または99%を超える純度まで精製される。抗体純度の評価に関する方法の概説については、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848: 79-87 (2007)を参照のこと。

【0055】

本明細書で使用される場合、「治療」（およびその文法上の変形、「治療する」または「治療すること」等）は、治療を受けている個体の自然経過を変化させようという試みにおける臨床的介入を指し、予防のために、または臨床病理の経過途中で行うことができる。望ましい治療の効果として、限定されないが、疾患の発症または再発の予防、症状の軽減、疾患の任意の直接的または間接的な病理的結果の消失、疾患進行の速度の低減、病態の改善または緩和、および寛解または予後の向上を含む。いくつかの実施形態において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるため、または疾病の進行を遅らせるために使用される。

【0056】

用語「難治性腫瘍」または「難治性癌」または「難治性血液悪性腫瘍」は、特定の治療（「標準治療」による治療、例えば、化学療法剤を単独で用いたもしくは併用した治療、生物学的療法のみ、放射線療法、幹細胞移植、またはこれらの組み合わせ等）が奏功しないかまたはそれらに耐性を示す腫瘍、癌、または血液悪性腫瘍を指して本明細書において使用される。

【0057】

用語「標準治療」は、通常の技術を有する良識ある医師が、癌等の特定の疾患を治療するために用いる治療プロセスを指すために使用される。標準治療は、癌の種類および病期、患者の状態および治療歴等に応じて異なり、当業者には明白であろう。

【0058】

一態様において、血液悪性腫瘍（例えば、慢性リンパ性白血病（CLL））の「標準治療」は、化学療法および/または生物学的療法を用いた治療を含む。一実施形態において、化学療法は、単一の化学療法剤または1つより多くの化学療法剤を含む。別の実施形態において、化学療法は、プリンヌクレオシド類似体および/またはアルキル化剤を含む。もう1つの実施形態において、生物学的療法は、モノクローナル抗体を含む。さらなる実施形態において、モノクローナル抗体は抗CD20抗体である。一実施形態において、抗CD20抗体はリツキシマブである。

【0059】

薬剤、例えば、薬学的処方物の「有効量」は、所望の治療または予防結果を達成するために必要な投与量および時間で効果的な量を指す。

【0060】

本明細書において使用される場合、血液悪性腫瘍（例えば、CLL）の標準治療は、化学療法、生物学的療法、放射線療法、幹細胞移植、およびこれらの組み合わせを含む。CLLのための現在の治療は、単独でまたは併用して与えられるいくつかの異なる種類の化

10

20

30

40

50

学療法を含む。典型的な化学療法剤は、ヌクレオシド類似体（例えば、プリンヌクレオシド類似体）、アルキル化剤、およびモノクローナル抗体を含む。フルダラビンは、プリン類似体の一例であり、CLL療法のために併用して用いられることが多い。シクロホスファミドおよびベンダムスチンは、アルキル化剤の例である。生物学的療法は、抗体を含む、ポリペプチド系薬剤の投与を含む。一実施形態において、抗体は、モノクローナルまたはポリクローナル抗体である。別の実施形態において、抗体は、キメラ、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体である。リツキシマブおよびオファツムマブ等の抗CD20抗体、ならびにアレムツズマブ等の抗CD52抗体が、CLLの化学免疫療法に使用される。他の化学療法剤は、ベンダムスチン、フラボピリドール、レナリドマイド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、およびプレドニゾンを含む。典型的な組み合わせは、FCR（フルダラビン、シクロホスファミド、およびリツキサン）ならびにCHOP（シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、およびプレドニゾン）を含む。CLLの代替治療は、放射線照射および幹細胞移植を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0061】

一態様において、対象の血液悪性腫瘍は、プリンヌクレオシド類似体および/またはアルキル化剤を含む化学療法に不応である。一実施形態において、化学療法は、フルダラビン、ペントスタチン、アザチオプリン、アザチオプリン、メルカプトプリン、チオグアニン、デオキシコホルマイシン、チアミプリン、ヒドロキシウレア、およびクラドリピンからなる群から選択される1つ以上のプリンヌクレオシド類似体を含む。別の実施形態において、化学療法は、ナイトロジェンマスタード類似体（例えば、シクロホスファミド、メクロレタミン、クロラムブシル、メルファラン、イホスファミド、トロホスファミド、ベンダムスチン、およびエストラムスチン）；スルホン酸アルキル（例えば、ブスルファン、トレオスルファン、およびマンノスルファン）；エチレンイミン（チオテパ、アルトレタミン、トリアジコン、およびカルボコン）；ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、ホテムスチン、ニムスチン、およびラニムスチン）；ならびにトリアゼン（例えば、ダカルバジンおよびテモゾロミド）からなる群から選択される1つ以上のアルキル化剤を含む。好ましい実施形態において、血液悪性腫瘍は、プリンヌクレオシド類似体（例えば、フルダラビン）および/またはシクロホスファミドを含む化学療法に不応である。

#### 【0062】

もう1つの態様において、対象の血液悪性腫瘍は、ステロイドを含む化学療法に不応である。別の実施形態において、化学療法は、ステロイドおよびアルキル化剤を含む。一実施形態において、ステロイドはプレドニゾンである。もう1つの実施形態において、アルキル化剤はクロラムブシルである。さらなる実施形態において、化学療法は、プレドニゾンおよびクロラムブシルを含む。

#### 【0063】

もう1つの態様において、対象の血液悪性腫瘍は、有糸分裂阻害剤を含む化学療法に不応である。別の実施形態において、化学療法は、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、およびステロイドを含む。一実施形態において、有糸分裂阻害剤はピンクリスチン硫酸塩である。別の実施形態において、アルキル化剤はシクロホスファミドである。さらなる実施形態において、ステロイドはプレドニゾンである。もう1つの実施形態において、化学療法は、シクロホスファミド、ピンクリスチン硫酸塩、およびプレドニゾン（CVP）である。

#### 【0064】

別の態様において、対象の血液悪性腫瘍は、(i)プリンヌクレオシド類似体および/またはアルキル化剤を含む化学療法、ならびに(ii)生物学的療法に不応である。一実施形態において、生物学的療法は、モノクローナル抗体療法を含む。別の実施形態において、モノクローナル抗体療法は、抗CD20抗体療法または抗CD52抗体療法を含む。好ましい実施形態において、抗CD20抗体は、リツキシマブまたはオファツムマブである。好ましい実施形態において、抗CD52抗体はアレムツズマブである。別の好ましい実施形態において、血液悪性腫瘍は、(i)フルダラビンを含む化学療法、ならびに(i

i) リツキシマブまたはオファツムマブを含むモノクローナル抗体療法に不応である。もう1つの好ましい実施形態において、血液悪性腫瘍は、(i) シクロホスファミドを含む化学療法、および ii) リツキシマブを含むモノクローナル抗体療法に不応である。さらに別の好ましい実施形態において、血液悪性腫瘍は、(i) ベンダムスチンを含む化学療法、および (ii) リツキシマブを含むモノクローナル抗体療法に不応である。

【0065】

一実施形態において、対象の血液悪性腫瘍は、FCR (フルダラビン、シクロホスファミド、およびリツキシマブ) ならびにベンダムスチンを含む治療法に不応である。別の実施形態において、対象の血液悪性腫瘍は、アレムツズマブを含む治療法に不応である。さらなる実施形態において、対象の血液悪性腫瘍は、アレムツズマブ、クロラムブシル、オファツムマブ、ベンダムスチン塩酸塩、シクロホスファミド、またはリン酸フルダラビンを含む治療法に不応である。別の実施形態において、対象の血液悪性腫瘍は、クロラムブシルおよびプレドニゾンを含む治療法に不応である。別の実施形態において、対象の血液悪性腫瘍は、シクロホスファミド、ピンクリスチン硫酸塩、およびプレドニゾン (CVP) を含む治療法に不応である。好ましい実施形態において、血液悪性腫瘍は CLL である。

10

【0066】

以前に記述したように、CLL細胞は、細胞表面上にタンパク質CD44を高度に発現する。CD44は、細胞間接着および細胞-マトリックス間接着、細胞遊走の支持、対応する細胞表面受容体または関連基質への成長因子、ケモカイン、または酵素の提示、ならびに膜から細胞骨格または核へのシグナルの伝達を含む、多くの生理的および病的機能に關与する多重構造の糖タンパク質である [Naor, D., et al. Adv. Cancer Res. 71, 241-319, (1997); Lesley, J., et al. Adv. Immunol. 54, 271-335, (1993)]。このタンパク質は、リンパ球の活性化、再循環、およびホーミング、造血発生、ならびに腫瘍転移を含む様々な細胞機能に關与する。この糖タンパク質は、複数のリガンド (例えば、フィブリノーゲン、フィブロネクチン、アラニン、コラーゲン) に結合することが分かっており、その主たるものはヒアルロン酸 (HA) である。CD44遺伝子の転写は、カテニン、および腫瘍発症と關連するWntシグナル伝達によって、少なくとも一部活性化される。

20

【0067】

CD44は、細胞外ドメインのセグメントをコードする少なくとも10個の可変エクソンの差次的なスプライシングによって、および細胞型特異的なグリコシル化によって決定される、いくつかの変異体を有する。

30

【0068】

CD44は、多くの種類の悪性腫瘍に発現されるため、CD44に対する抗体は、悪性腫瘍を治療する上で非常に有用であり得る。そのような抗体は、CD44のマトリックス相互作用を妨害し、CD44を占有することによって、アポトーシスを引き起こすことができるCD44シグナル伝達を誘導する。しかしながら、正常細胞上でのCD44の内因性発現レベルが低いため、そのような抗体は、望ましくない副作用を回避するために悪性細胞上に発現されるCD44に特異的でなければならない。

40

【0069】

したがって、一態様において、本発明は、CD44に特異的に結合する抗体または抗体断片を提供する。一実施形態において、抗体または抗体断片は、CLL細胞上に発現されるCD44に特異的に結合する。

【0070】

種々の実施形態において、本発明の抗体または抗体断片は、Fab断片、F(ab)2断片、FV断片、単鎖FV (scFV)断片、dsFV断片、CH断片、または二量体scFVであり得る。

【0071】

本明細書において使用される場合、「特異的結合」は、所定の抗原に対する抗体の結合

50

を指す。典型的には、抗体は、約  $10^{-8}$  M 以下の  $K_D$  に対応する親和性で結合し、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）に結合するための親和性よりも、少なくとも10倍低い、また好ましくは少なくとも100倍低い親和性（ $K_D$ によって表される）で所定の抗原に結合する。代替として、抗体は、約  $10^6$  M<sup>-1</sup>、または約  $10^7$  M<sup>-1</sup>、または約  $10^8$  M<sup>-1</sup>、または  $10^9$  M<sup>-1</sup> 以上の  $K_A$  に対応する親和性で結合することができ、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）に結合するための親和性よりも、少なくとも10倍高い、また好ましくは少なくとも100倍高い親和性で（ $K_A$ によって表される）で所定の抗原に結合する。

#### 【0072】

用語「 $k_a$ 」（M<sup>-1</sup>sec<sup>-1</sup>）は、本明細書において使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の会合速度定数を指すことが意図される。用語「 $K_A$ 」（M）は、本明細書において使用される場合、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指すことが意図される。

#### 【0073】

自然に生じる抗体は、一般に、2つの軽鎖および2つの重鎖を含む四量体である。実験的に、重鎖の各々を分解するタンパク質分解酵素パピインで抗体を切断し、3つの別個のサブユニットを生成することができる。軽鎖と、該軽鎖と質量がほぼ等しい重鎖の断片とからなる2つのユニットは、Fab断片（すなわち、「抗原結合」断片）と称される。2つの等しい重鎖のセグメントからなる第3のユニットは、Fc断片と称される。Fc断片は、典型的には抗原-抗体結合には関与しないが、抗原の本体を除去することに関与する後のプロセスにおいて重要である。

#### 【0074】

FabおよびF(ab')<sub>2</sub>断片は、無傷の抗体分子よりも小さいため、全抗体分子が用いられる場合よりも多くの抗原結合ドメインが利用可能である。パピインを用いた典型的なIgG分子のタンパク質切断は、ジスフィルド結合によって近接する重鎖のアミノ末端部分に結合された無傷の軽鎖を含む、Fab断片と称される2つの別個の抗原結合断片を生成することが分かっている。パピインで消化された免疫グロブリン分子の残りの部分は、Fc断片として知られ、無傷な状態で残った抗体のカルボキシ末端部分からなり、ジスフィルド結合によって結合される。抗体をペプシンで消化した場合は、F(ab')<sub>2</sub>断片として知られる断片が生成される：該断片は、Fc領域は有しないが、近接する軽鎖と重鎖との間のジスフィルド結合と、さらに、近接する重鎖の残りの部分の間のジスフィルド結合とによって一緒に保持される、両方の抗原結合ドメイン（Fab断片）を含む（*Handbook of Experimental Immunology, Vol 1: Immunochemistry, Weir, D. M., Editor, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1986)*）。

#### 【0075】

当業者には容易に認識されるように、改変された抗体（例えば、キメラ、ヒト化、CDRグラフト化、二官能性、抗体ポリペプチド二量体（すなわち、抗体の二つのポリペプチド鎖成分の会合、例えば、重鎖および軽鎖；またはVL、VH、CL、およびCH抗体ドメインを含むFab断片；またはVLドメインおよびVHドメインを含むFv断片を含む、抗体の1つのアーム）、単鎖抗体（例えば、リンカーによってVHドメインに結合されたVLドメインを含むscFv（すなわち、単鎖Fv）断片等）は、当技術分野において周知の方法によって生成することもできる。

#### 【0076】

scFvを生成するために、標準的な逆転写酵素プロトコルを用いて、最初に、CD4抗原に対するmAbを生成するハイブリドーマから単離されたmRNAから、cDNAを生成する。次いで、マウス免疫グロブリン重鎖および軽鎖可変領域に対するプライマーセットを使用する標準的なポリメラーゼ連鎖反応（PCR）法により、mAbの重鎖およ

10

20

30

40

50

び軽鎖の可変領域をコードするcDNA分子を増幅することができる(Clackson (1991) Nature, 352, 624-628)。次いで、組換えscFv DNA分子を作製するために、mAbの重鎖および軽鎖可変領域をコードする増幅cDNAをリンカーオリゴヌクレオチドと一緒に結合させる。g3pと称される微小コートタンパク質をコードするファージ遺伝子の5'領域内に増幅cDNA配列を融合するように設計された繊維状ファージプラスミド中に、scFv DNAをライゲートする。次いで、大腸菌細菌細胞を組換えファージプラスミドで形質転換し、繊維状ファージを増殖させて採取する。所望の組換えファージディスプレイ抗原結合ドメインを、微小コートタンパク質のアミノ末端領域に融合する。次いで、例えば、「パニング」として知られる方法を使用して、固定化抗原にそのような「ディスプレイファージ」を通過させ(Parmley and Smith (1989) Adv. Exp. Med. Biol. 251, 215-218; Cwirlla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-6382を参照のこと)、抗原に結合することができるscFv抗体タンパク質を含むこれらのファージ粒子を吸着させる。次いで、標準的なファージ感染法により抗原結合性ファージ粒子を増幅させることができ、増幅した組換えファージ集団を抗原結合能について再び選択する。そのような抗原結合能のための連続的な選択ラウンドの後、増幅し、組換えファージ上に表示されたscFv中で、増強された抗原結合能について選択する。増大した抗原結合能についての選択は、結合が起こる条件を、より厳密な結合活性を必要とするように調節することによって行われてもよい。増強された抗原結合活性を選択するための別の方法は、scFvの結合ドメインをコードするcDNA内のヌクレオチド配列を変化させ、組換えファージ集団を抗原結合活性のための連続的な選択ラウンドおよび増幅に供することである(Lowman et al. (1991) Biochemistry 30, 10832-10838; およびCwirlla et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 6378-6382を参照のこと)。

10

20

30

40

50

**【0077】**

一旦、scFvを選択したら、大腸菌株HB2151とともに適切なベクターを用いて、遊離形態で生成することができる。これらの細菌は、実際には、ファージ成分を含まない可溶型でscFvを分泌する(Hoogenboom et al. (1991) Nucl. Acids Res. 19, 4133-4137)。HB2151細菌培養培地からの可溶型scFvの精製は、AFFIGEL(商標)(BioRad, Hercules, Calif.)等の支持体上に固定化された抗原分子を用いた親和性クロマトグラフィーにより達成することができる。

**【0078】**

組換え抗体技術における他の発展は、scFvsを二量体および四量体に重合することによる結合力の増加等のさらなる改良への可能性を示している(例えば、Holliger et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 6444-6448を参照のこと)。

**【0079】**

さらに、組換え抗体技術は、ハイブリドーマと比較して、抗体のより安定な遺伝子源を提供する。組換え抗体はまた、標準的な細菌ファージ生成法を使用して、より迅速かつ経済的に生成することもできる。

**【0080】**

本明細書に記載される抗体または抗体断片を組換えによって生成するために、抗体または抗体断片をコードする核酸が発現ベクターに挿入される。軽鎖および重鎖は、同じかまたは異なる発現ベクターにクローニングすることができる。Kipps et al.に対する米国特許第6,287,569号の教示(参照により、その全体が本明細書に組み込まれる)および本明細書に記載される方法は、本発明のscFvsを作製するために当業者によって容易に適応され得る。

**【0081】**

発現ベクターは、典型的には、エピソームとして、または宿主染色体の不可欠な部分として、宿主生物において複製可能である。大腸菌は、本発明の抗体を発現させるために特に有用な1つの原核生物宿主である。使用に好適な他の微生物宿主は、枯草菌等の桿菌、ならびに他の腸内細菌科、例えば、サルモネラ、セラチア、および種々のシュードモナス種等を含む。これらの原核生物宿主において、宿主細胞に適合性の発現制御配列（例えば、複製起点）および調節配列、例えば、ラクトースプロモーター系、トリプトファン（*trp*）プロモーター系、ラクタマーゼプロモーター系、またはファージからのプロモーター系等を典型的に含む発現ベクターを作製することもできる。酵母等の他の微生物もまた、発現に使用することができる。サッカロミセスは、発現制御配列、例えば、3-ホスホグリセリン酸キナーゼまたは他の糖分解酵素を含むプロモーター等を含む好適なベクターと、必要に応じて、複製起点、終止配列等とを有する好ましい宿主である。哺乳動物の組織細胞培養物も、本発明の抗体を発現させるおよび生成するために使用することができる（例えば、Winnacker, From Genes to Clones VCH Publishers, N.Y., 1987を参照のこと）。無傷の抗体を分泌することができる多数の好適な宿主細胞株が開発されているため、真核細胞が好ましい。本発明の免疫グロブリンをコードする核酸を発現させるために好ましい好適な宿主細胞は、SV40（COS-7、ATCC CRL 1651）により形質転換させたサル腎臓CV1株；ヒト胚性腎臓株；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK、ATCC CCL 10）；チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）；マウスセルトリ細胞；サル腎臓細胞（CV1 ATCC CCL 70）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76、ATCC CRL 1587）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA、ATCC CCL 2）；イヌ腎臓細胞（MDCK、ATCC CCL 34）；バッファローラット肝臓細胞（BRL 3A、ATCC CRL 1442）；ヒト肺細胞（W138、ATCC CCL 75）；ヒト肝臓細胞（Hep G2、HB 8065）；マウス乳癌（MMT 060562、ATCC CCL 51）；およびTRI細胞を含む。

10

20

30

40

50

#### 【0082】

対象となるポリヌクレオチド配列を含むベクターを、宿主細胞に移入することができる。塩化カルシウムによる遺伝子導入が、一般に原核細胞に用いられるのに対し、他の細胞宿主には、リン酸カルシウム処理または電気穿孔法を使用することができる（例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, 2nd ed., 1989を参照のこと）。組換えDNAの導入後に免疫グロブリン生成物を発現する細胞株が、選択される細胞である。安定した発現が可能な細胞株が好ましい（すなわち、細胞株の50継代後に発現レベルが低下していない）。

#### 【0083】

一旦、発現させてから、本発明の抗体または抗体断片は、硫酸アンモニウム沈降、アフィニティカラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等を含む、当該技術分野の標準的な手順に従って精製することができる（例えば、Scopes, Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y., 1982を参照のこと）。少なくとも約90~95%均一性である実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98~99%またはそれ以上の均一性が最も好ましい。

#### 【0084】

標識された抗体または検出可能に標識された抗体は、一般に、検出可能な標識が付着した抗体（または結合特異性を保持する抗体断片）である。検出可能な標識は、通常、化学的コンジュゲーションによって付着しているが、標識がポリペプチドである場合、代替として遺伝子操作技術によって付着させることもできる。検出可能に標識されたタンパク質の生成のための方法は、当該技術分野において周知である。当該技術分野において既知の検出可能な標識は、放射性同位元素、フルオロフォア、常磁性標識、酵素（例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ）、または、検出可能なシグナル（例えば、放射活性、蛍光、色）を放出するか、もしくは標識がその基質に曝露された後に検出可能なシグナルを放出す

るかのいずれかである、他の部分もしくは化合物を含む。種々の検出可能な標識/基質の対(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ/ジアミノベンジジン、アビジン/ストレプトアビジン、ルシフェラーゼ/ルシフェリン)、抗体を標識するための方法、および標識抗体を使用するための方法が、当該技術分野において周知である(例えば、Harlow and Lane, eds., 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.を参照のこと)。同様により高い感受性をもたらし得る別の技術は、抗体を低分子量ハプテンにカップリングすることからなる。これらのハプテンは、次いで、第2の反応により特異的に検出することができる。例えば、そのようなハプテンを、アビジンと反応するビオチンとして、または特異的な抗ハプテン抗体と反応することができるジニトロフェニル、ピリドキサル、およびフルオレセインとして用いることが一般的である。

10

20

30

40

50

**【0085】**

抗体は、抗原結合に直接関与していないFv可変領域の配列を、ヒトFv可変領域から同等な配列で置き換えることによってヒト化されてもよい。ヒト化キメラ抗体の概説については、Morrisson et al., (*Science* 229:1202-1207(1985))およびOiet al. (*BioTechniques* 4:214(1986))によって提供されている。これらの方法は、重鎖または軽鎖の少なくとも1つからの免疫グロブリンFv可変領域の全部または一部をコードする核酸配列を単離すること、操作すること、および発現させることを含む。そのような核酸の源は、当業者に周知であり、例えば、抗体産生ハイブリドーマから得ることができる。次いで、ヒト化もしくはキメラ抗体またはそれらの断片をコードする組換えDNAを、適切な発現ベクターにクローニングすることができる。

**【0086】**

ヒト化抗体は、代替として、CDR置換によって生成することができる(米国特許第5,225,539号; Jones, *Nature* 321:552-525(1986); Verhoeyan et al., *Science* 239:1534(1988); およびBeidler, *J. Immunol.* 141:4053-4060(1988))。よって、特定の実施形態において、コンジュゲートに使用される抗体は、ATCC受入番号PTA2439を有するハイブリドーマによって生成される抗体のヒト化またはCDRグラフト化形態である。他の実施形態において、抗体は、抗体mAb 3E10のヒト化またはCDRグラフト化形態である。例えば、CDR領域は、図に示すもの等から、1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10個のアミノ酸の相違等のアミノ酸置換を含むことができる。場合によっては、1~5個のアミノ酸の相違がいずれかに存在する。

**【0087】**

そのような変異体は、1つ以上の置換が抗体または抗体断片の重鎖ヌクレオチド配列および/もしくは軽鎖ヌクレオチド配列に導入されるものを含む。

**【0088】**

本発明の抗体は、別の分子とコンジュゲートされてもよい。本明細書に記載されるコンジュゲートの部分を結合するために様々なリンカーが使用され得る。本明細書において使用される用語「分解可能なリンカー」は、種々の条件下で切断することができるリンカー部分を指す。切断に好適な条件は、限定されないが、pH、UV照射、酵素活性、温度、加水分解、脱離、および置換反応、ならびに結合の熱力学的特性を含む。本明細書において使用される用語「感光性リンカー」は、特定のUV波長で選択的に切断される、当該技術分野において既知のリンカー部分を指す。感光性リンカーを含む本発明の化合物は、対象とする標的細胞または組織に化合物を送達するために使用することができ、後にUV源の存在下で放出することができる。

**【0089】**

本明細書において使用される用語「リンカー」は、例えば、コンジュゲートの個々の部

分を物理的に結合することによって、基質および活性分子が、同じ領域、組織、または細胞を標的とすることを可能にする任意の結合、低分子、または他のビヒクルを指す。

【0090】

特定の実施形態において、切断可能または分解可能なリンカーが使用されてもよい。一実施形態において、リンカーは、1つ以上の基質と1つ以上の治療部分との間の化学結合である。したがって、結合は、共有結合性またはイオン性であってもよい。リンカーが化学結合である治療複合体の一例は、融合タンパク質であろう。一実施形態において、化学結合は酸感受性であり、pH感受性結合は、血流(pH7.5)から細胞輸送小胞または細胞内部(pH約6.0)へ移行する際に切断される。代替として、結合は、酸感受性でなくてもよいが、後に添加されるかもしくは標的部位の微小環境内に自然に見られる特異的な酵素または化学物質によって切断されてもよい。代替として、結合は、還元条件下で切断される結合、例えば、ジスルフィド結合であってもよい。

10

【0091】

代替として、結合は切断可能でなくてもよい。あらゆる種類の酸切断可能または酸感受性のリンカーが使用され得る。酸切断可能な結合の例として、限定されないが、cis-ポリカルボキシルアルケンとして知られる有機酸のクラスが挙げられる。このクラスの分子は、少なくとも1つの二重結合を含む炭素鎖に付着した少なくとも3つのカルボン酸基(COOH)を含む。これらの分子、およびそれらがどのように作製され、使用されるかは、Shen, et al. 米国特許第4,631,190号に開示されている。

20

【0092】

別の実施形態において、リンカーは、ペプチドリinker等の低分子である。一実施形態において、ペプチドリinkerは切断可能ではない。さらなる実施形態において、ペプチドリinkerは、塩基によって、還元条件下で、または特異的酵素によって切断可能である。一実施形態において、酵素は常在性である。代替として、小ペプチドは、治療複合体の後にまたはそれに加えて投与される非常在性酵素によって切断されてもよい。代替として、小ペプチドは、例えば、ペプチドがジスルフィド結合を含む場合、還元条件下で切断されてもよい。代替として、小ペプチドは、pH感受性であってもよい。

【0093】

ペプチドリinkerはまた、ペプチドタグ(例えば、mycもしくはHis<sub>6</sub>(配列番号1))として有用であり得るか、または既知のリンカー配列GGGS(配列番号2)の1つ以上の繰り返しであってもよい。当業者は、コンジュゲートを形成するために結合されるポリペプチド部分に応じてリンカー配列が変化し得ることを認識するであろう。エピトープタグ、親和性タグ、可溶性増強タグ等のさらなるペプチドリinkerおよびタグが、当該技術分野において既知である。本発明とともに使用され得る種々のさらなるタグおよびリンカーの例として、赤血球凝集素(HA)エピトープ、mycエピトープ、キチン結合タンパク質(CBP)、マルトース結合タンパク質(MBP)、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ(GST)、カルモジュリン結合ペプチド、ピオチンカルボキシルキャリアータンパク質(BCCP)、FLAGオクタペプチド、nus、緑色蛍光タンパク質(GFP)、チオレドキシン(TRX)、ポリ(NANP)、V5、Sタンパク質、ストレプトアビジン、SBP、ポリ(Arg)、DsbA、c-myc-タグ、HAT、セルロース結合ドメイン、Softag 1、Softag 3、低分子ユビキチン様修飾因子(SUMO)、およびユビキチン(Ub)等が挙げられる。さらなる例として、ポリ(L-Gly)、(ポリL-グリシンリンカー);ポリ(L-Glu)、(ポリL-グルタミンリンカー);ポリ(L-Lys)、(ポリL-リジンリンカー)が挙げられる。一実施形態において、ペプチドリinkerは、式(アミノ酸)<sub>n</sub>(式中、nは2~100の整数である)を有し、好ましくは、ペプチドは、1つ以上のアミノ酸のポリマーを含む。

30

40

【0094】

化学リンカーおよびペプチドリinkerは、コンジュゲート合成に関する当技術分野において既知の技術によって、すなわち、遺伝子操作を用いてまたは化学的に、抗体とコンジュゲートとの間に結合させることができる。コンジュゲート合成は、適切な官能基におけ

50

る他の部分へのタンパク質の古典的カップリング反応によって、適切な抗体を介して化学的に達成することができる。

【0095】

本明細書において使用される場合、用語「核酸」は、デオキシリボ核酸(DNA)、および必要に応じてリボ核酸(RNA)等の、ポリヌクレオチドを指す。この用語はまた、文脈に適合する場合または記載される実施形態に適用できる場合、一本鎖ポリヌクレオチド(アンチセンス等)および二本鎖ポリヌクレオチド(sRNA等)の両方を含むと理解されるべきである。

【0096】

「タンパク質コード配列」または特定のポリペプチドもしくはペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に置かれたときに、*in vitro*または*in vivo*でポリペプチドに転写(DNAの場合)および翻訳(mRNAの場合)される核酸配列である。コード配列の境界は、5' (アミノ)末端の開始コドンおよび3' (カルボキシル)末端の翻訳終止コドンによって決定される。コード配列は、限定されないが、原核生物または真核生物mRNAからのcDNA、原核生物または真核生物DNAからのゲノムDNA配列、および合成DNA配列さえも含むことができる。転写終結配列は、通常、コード配列の3'側に位置する。

10

【0097】

本明細書において使用される場合、用語「ベクター」は、それが結合された別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。1つの種類のベクターは、宿主細胞の染色体DNAに統合され得る、ゲノム統合ベクターまたは「統合ベクター」である。別の種類のベクターは、エピソームベクター、例えば、染色体外複製が可能な核酸である。作動可能に結合した遺伝子の発現を誘導することができるベクターは、本明細書において「発現ベクター」と称される。本明細書において、「プラスミド」および「ベクター」は、文脈からそうではないことが明らかでない限り、交換可能に使用される。発現ベクターにおいて、転写を制御する調節要素は、一般的に、哺乳動物、微生物、ウイルス、または昆虫の遺伝子に由来し得る。通常は複製起点によって付与される宿主中で複製する能力、および形質転換体の認識を促進するための選択遺伝子が、さらに組み入れられてもよい。レトロウイルス、アデノウイルス等のウイルスに由来するベクターが用いられてもよい。

20

【0098】

一実施形態において、本発明は、タンパク質を生成する方法を提供する。この方法は、発現構築物で宿主細胞を形質転換することと、コンジュゲートを生成するのに好適な条件下で宿主細胞を培養することを含む。

30

【0099】

タンパク質および/またはタンパク質コンジュゲートの調製に使用するのに好適なベクターは、バキュロウイルス、ファージ、プラスミド、ファージミド、コスミド、フォスミド、細菌の人工染色体、ウイルスDNA、P1系の人工染色体、酵母プラスミド、および酵母の人工染色体から選択されるものを含む。例えば、ウイルスDNAベクターは、ワクチニア、アデノウイルス、鶏痘ウイルス、仮性狂犬病ウイルス、およびSV40の誘導體から選択することができる。本発明の方法の実施において使用するのに好適な細菌ベクターは、pQE70(商標)、pQE60(商標)、pQE-9(商標)、pBLUESCRIPT(商標)SK、pBLUESCRIPT(商標)KS、pTRC99a(商標)、pKK223-3(商標)、pDR540(商標)、PAC(商標)、およびpRIT2T(商標)を含む。本発明の方法の実施において使用するのに好適な真核生物ベクターは、pWLNEO(商標)、pXTI(商標)、pSG5(商標)、pSVK3(商標)、pBPV(商標)、pMSG(商標)、およびpSVLSV40(商標)を含む。本発明の方法の実施において使用するのに好適な真核生物ベクターは、pWLNEO(商標)、pXTI(商標)、pSG5(商標)、pSVK3(商標)、pBPV(商標)、pMSG(商標)、およびpSVLSV40(商標)を含む。

40

【0100】

50

当業者は、そのようなベクターに含まれるべき好適な調節領域を、例えば、*lac I*、*lac Z*、*T3*、*T7*、*apt*、*PR*、*PL*、*trp*、*CMV*前初期、*HSV*チミジンキナーゼ、初期および後期*SV40*、レトロウイルス*LTR*、ならびにマウスメタロチオネイン-*I*調節領域から選択することができる。

【0101】

タンパク質コンジュゲートをコードするポリヌクレオチドを含むベクターを発現することができる宿主細胞は、例えば、細菌細胞、真核細胞、酵母細胞、昆虫細胞、または植物細胞を含む。例えば、大腸菌、桿菌、ストレプトマイセス、ピキアパストリス、サルモネラチフィリウム、ショウジョウバエ*S2*、スポドプテラ*SJ9*、*CHO*、*COS*（例えば、*COS-7*）、または*Bowes*メラノーマ細胞は、全て、本発明の方法の実施において使用するのに好適な宿主細胞である。

10

【0102】

送達される発現構築物は、典型的には、プロモーター等の調節要素が対象とする核酸に作動可能に結合されたベクターの一部である。プロモーターは、構成的または誘導的であり得る。構成的プロモーターの非限定的な例として、サイトメガロウイルス(*CMV*)プロモーターおよびラウス肉腫ウイルスプロモーターが挙げられる。本明細書において使用される場合「誘導的」は、上方制御および下方制御の両方を指す。誘導的プロモーターは、誘導因子に応答して1つ以上のDNA配列または遺伝子の転写を直接的または間接的に活性化することができるプロモーターである。誘導因子が存在しない場合、DNA配列または遺伝子は転写されない。誘導因子は、タンパク質、代謝産物、増殖調節因子、フェノール化合物等の化学物質、あるいは、例えば、熱によって直接的に、またはウイルス等の病原体もしくは病因物質の作用を通して間接的に課せられる生理的ストレスであり得る。誘導因子は、波長、強度、蛍光、方向、および持続時間を含む、光および光の種々の態様等の照射因子であり得る。

20

【0103】

誘導的プロモーターの一例は、核酸の転写を調節するために使用することができるテトラサイクリン(*Tet*)-*On*プロモーター系である。この系において、変異*Tet*抑制因子(*TetR*)を単純ヘルペス*VP16*(転写活性化タンパク質)の活性化ドメインに融合し、*tet*またはドキシサイクリン(*dox*)によって調節されるテトラサイクリン制御転写活性化因子(*tTA*)を作製する。抗生物質が存在しない場合、転写は最小限であり、*tet*または*dox*が存在する場合、転写が誘導される。代替の誘導系は、エクダイソンまたはラパマイシン系を含む。エクダイソンは、エクダイソン受容体のヘテロ二量体およびウルトラスピラクル遺伝子(*USP*)の産物によってその発現が制御される昆虫脱皮ホルモンである。発現は、エクダイソンまたはムリストロンA等のエクダイソンの類似体を用いた処理によって誘導される。

30

【0104】

ベクターにおいて有用であり得るさらなる調節要素、限定されないが、ポリアデニル化配列、翻訳制御配列(例えば、内部リボソーム進入部位、*IRES*)、エンハンサー、またはイントロンを含む。そのような要素は、必要ではないかもしれないが、それらは、転写、*mRNA*の安定性、翻訳効率等に影響を及ぼすことによって発現を増加させる可能性がある。細胞(複数可)において核酸の最適な発現を得るために、そのような要素を、必要に応じて核酸構築物に含めることができる。しかしながら、時として、そのようなさらなる要素なしでも十分な発現を得ることができる。

40

【0105】

ベクターはまた、他の要素を含むこともできる。例えば、ベクターは、コードされるリペプチドが特定の細胞の位置(例えば、細胞にタンパク質を分泌させるためのシグナル分泌配列)に誘導されるようにシグナルペプチドをコードする核酸、または選択可能なマーカーをコードする核酸を含むことができる。選択可能なマーカーの非限定的な例として、ピューロマイシン、アデノシンデアミナーゼ(*ADA*)、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ(*neo*、*G418*、*APH*)、ジヒドロ葉酸レダクターゼ(*DHFR*)

50

、ハイグロマイシン - B - ホスホトランスフェラーゼ、チミジンキナーゼ (TK)、およびキサンチン - グアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (XGPR T) が挙げられる。そのようなマーカーは、培養物中で安定な形質転換体を選択するために有用である。

【0106】

ウイルスベクターは、コンジュゲートを形成するために使用することができ、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス (AAV)、レトロウイルス、レンチウイルス、ワクシニアウイルス、麻疹ウイルス、ヘルペスウイルス、およびウシ乳頭腫ウイルスのベクターを含む (ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターの概説については、Kay et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 12744 - 12746 (1997) を参照のこと)。ウイルスベクターは、ウイルスの天然の指向性および病原性が変化または除去されているように修飾される。ウイルスのゲノムはまた、その感染性を高めるため、および対象となるポリペプチドをコードする核酸のパッケージングに対応するために修飾することもできる。

10

【0107】

非ウイルスベクターもまた、主題のコンジュゲートにおいて使用することができる。さらに例示するために、一実施形態において、ベクターによってコードされる哺乳動物血清タンパク質は、組織型プラスミノーゲン活性化因子、組織型プラスミノーゲン活性化因子の受容体、ストレプトキナーゼ、スタフィロキナーゼ、ウロキナーゼ、および凝固因子からなる群から選択される。本発明はまた、組換え発現、および、例えば、形質導入筋細胞から血液への分泌を引き起こす、治療有効量の哺乳動物血清タンパク質のコンジュゲートをそのような哺乳動物に投与するステップを含む、その循環系における血餅の形成に関連するものを処理するための方法を提供する。

20

【0108】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体または抗体断片と、任意選択的に薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物を提供する。

【0109】

別の態様において、本発明は、試料中のCD44タンパク質を検出するための方法を提供する。この方法は、試料を、標識したCD44抗体または抗体断片と接触させることと、試料中で検出可能に標識された抗体とCD44との間の免疫反応性を検出することを含む。

30

【0110】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体を使用してヒト対象における血液悪性腫瘍を治療するための方法を提供する。この方法は、有効量の本発明の抗体または抗体断片を、それを必要とする対象に投与することを含む。

【0111】

別の態様において、本発明は、本発明のCD44抗体を、それを必要とする対象に投与することにより、CLL細胞上のCD44に結合する抗体がそれに生存優位性を付与する、CLLを治療または予防するための方法を提供する。

【0112】

別の態様において、本発明は、それを必要とする対象における血液悪性腫瘍を治療する方法を提供し、該方法は、有効量のCD44に対する抗体を対象に投与することを含み、対象の血液悪性腫瘍は、化学療法および/または生物学的療法に不応である。一実施形態において、対象の血液悪性腫瘍は、治療法に不応であり、該治療法は、(i) プリンヌクレオシド類似体および/もしくはアルキル化剤を含む化学療法、ならびに/または(ii) モノクローナル抗体療法を含む生物学的療法を含む。別の実施形態において、血液悪性腫瘍は、白血病、好ましくはリンパ性白血病である。もう一つの実施形態において、リンパ性白血病は、B細胞性慢性リンパ性白血病 (CLL) である。

40

【0113】

別の態様において、本発明は、それを必要とする対象におけるB細胞性慢性リンパ性白血病 (CLL) を治療する方法を提供し、該方法は、有効量のCD44に対する抗体を対

50

象に投与することを含み、対象のCLLは、化学療法および/または生物学的療法に不応である。一実施形態において、対象のCLLは、治療法に不応であり、該治療法は、(i)プリンヌクレオシド類似体および/もしくはアルキル化剤を含む化学療法、ならびに/または(ii)モノクローナル抗体療法を含む生物学的療法を含む。

【0114】

さらなる態様において、本発明は、薬物の製造または調製における抗CD44抗体の使用を提供する。一実施形態において、薬物は、対象における血液悪性腫瘍のためのものであり、血液悪性腫瘍は、化学療法および/または生物学的療法に不応である。別の実施形態において、薬物は、血液悪性腫瘍を有する対象に有効量の薬物を投与することを含む、血液悪性腫瘍を治療する方法において使用するためのものであり、血液悪性腫瘍は、化学療法および/または生物学的療法に不応である。特定の実施形態において、血液悪性腫瘍は白血病である。他の実施形態において、白血病はリンパ性白血病である。さらなる実施形態において、リンパ性白血病はB細胞性慢性リンパ性白血病(CLL)である。

10

【0115】

もう1つの実施形態において、本発明は、血液悪性腫瘍を治療する方法において使用するためにCD44に結合する抗体を提供し、抗体は、血液悪性腫瘍に関連するCD44を発現する細胞によって内在化され、その成長を阻害する。別の実施形態において、本発明は血液悪性腫瘍を治療するための薬物の製造のためにCD44に結合する抗体の使用を提供し、抗体は、血液悪性腫瘍に関連するCD44を発現する細胞によって内在化され、その成長を阻害する。さらなる実施形態において、抗体は、別の分子、例えば、治療分子とコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、抗体は、リンカーを介して別の分子とコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、血液悪性腫瘍はCLLである。別の実施形態において、CD44を発現する細胞はB細胞である。好ましい実施形態において、B細胞はCLL細胞である。別の実施形態において、抗CD44抗体は、CD44に特異的に結合する。

20

【0116】

種々の実施形態において、血液悪性腫瘍を予防または治療する方法は、さらなる治療剤をさらに含んでもよい。そのような治療剤は、プリン類似体、アルキル化剤、モノクローナル抗体、および他の化学療法剤を含み得る。プリン類似体の例として、フルダラビン、ペントスタチン、アザチオプリン、アザチオプリン、メルカプトプリン、チオグアニン、およびクラドリピンが挙げられる。アルキル化剤の例として、シクロホスファミド、メクロレタミンまたはムスチン、ウラムスチンもしくはウラシル、メルファラン、クロラムブシル、イホスファミド、ニトロソウレア、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、およびブスルファンが挙げられる。

30

【0117】

モノクローナル抗体の例として、限定されないが、抗EGFR抗体(例えば、パニツムマブ、Erbibitux(セツキシマブ)、マツズマブ、IMC-1F8、TheraCIMhR3)、デノスマブ、Avastin(ベバシズマブ)、抗HGF抗体、Humira(アダリムマブ)、抗Ang-2抗体、ハーセプチン(トラスツズマブ)、Remicade(インフリキシマブ)、抗CD20抗体、リツキシマブ、Synagis(パリビズマブ)、Mylotarg(ゲムツズマブオゾガマイシン)、Raptiva(エファリズマブ)、Tysabri(ナタリズマブ)、Zenapax(ダクリキシマブ)、Neutrospec(テクネチウム(.sup.99mTc)ファノレソマブ)、トシリズマブ、ProstaScint(インジウム-111標識カプロマブペンデチド)、Bexxar(トシツモマブ)、Zevalin(イットリウム90とコンジュゲートしたイブリツモマブチウキセタン)、Xolair(オマリズマブ)、MabThera(リツキシマブ)、ReoPro(アブキシマブ)、MabCampath(アレムツズマブ)、Simulect(パシリキシマブ)、LeukoScan(スレソマブ)、CEA-Scan(アルシツモマブ)、Verluma(ノフェツモマブ)、Panorex(エドレコロマブ)、アレムツズマブ、CDP870、ナタリズマブ、オフアツ

40

50

ムマブ、および G A 1 0 1 が挙げられる。

【 0 1 1 8 】

他の化学療法剤の例として、限定されないが、ブスルファン、インプロスルファン、ピ  
 ンスルファン；ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、ウレドーパ；エチレンイミン  
 、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレン  
 チオホスホルアミド、トリメチロロメラミン；プラタシン、プラタシノン - 9 - テトラ  
 ヒドロカンナビノール、 - ラパコン；ラパコール；コルヒチン；ベツリン酸；トポテカ  
 ン、C P T；プリオスタチン；カリスタチン；C C - 1 0 6 5（そのアドゼレシン、カル  
 ゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む）；ポドフィロトキシン；ポドフィリン酸  
 ；テニポシド；クリプトフィシン；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成類似体、K  
 W - 2 1 8 9、および C B 1 - T M 1 を含む）；エリユテロピン；パンクラチスタチン；  
 サルコジクチン；スポンギスタチン；ナイトロジェンマスタード、例えばクロラムブシ  
 ル、クロルナファジン、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メク  
 ロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピチン、フェネステ  
 リン、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロウレア、例  
 えばカルムスチン、クロロゾトシン、ホテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、およ  
 びラニムスチン；抗生物質、例えば、エンジン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特  
 にカリケアマイシン 1 I およびカリケアマイシン I 1）；ダイネマイシン A を含むダイ  
 ネマイシン；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連する色素  
 タンパク質エンジン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アン  
 トラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン、カルミノ  
 マイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デ  
 トルピシン、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、アドリアマイシン / ドキソル  
 ピシン（モルホリノ - ドキソルピシン、シアノモルホリノ - ドキソルピシン、2 - ピロリ  
 ノ - ドキソルピシン、およびデオキシドキソルピシンを含む）、エピルピシン、エソルピ  
 シン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシン、例えばマイトマイシン C、ミ  
 コフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシ  
 ン、ピューロマイシン、ケラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプト  
 ゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン；代謝拮抗薬、例  
 えば、メトトレキセートおよび 5 - フルオロウラシル（5 - F U）；葉酸類似体、例  
 えば、デノプテリン、メトトレキセート、プテロプテリン、トリメトトレキセート；  
 プリン類似体、例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン、チ  
 オグアニン；ピリミジン類似体、例えば、アンシタビン、アザシチジン、6 - アザウ  
 リジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシ  
 タビン、フロクスウリジン；男性ホルモン、例えば、カルステロン、プロピオン酸  
 ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；  
 抗副腎剤、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補充剤、  
 例えば、フォリン酸；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド；アミノレプ  
 リン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル；ピサントレン；エダトラ  
 キセート；デフォファミン；デメコルシン；ジアジコン；エルホルニチン；酢酸エ  
 リプチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシウレア；  
 レンチナン；ロニダイニン；メイタンシノイド、例えばマイタンシンおよびアンサ  
 ミトシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダンモール；ニトラエリン；ペ  
 ントスタチン；フェナメット；ピラルピシン；ロソキサントロン；2 - エチルヒドラ  
 ジド；プロカルバジン；P S K . R T M . ；ラゾキサシン；リゾキシン；シゾフィラン；  
 スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジコン；2 , 2 ' , 2 ' ' - トリクロロ  
 トリエチルアミン；トリコテシン（特に、T - 2 毒素、ベラクリン A、ロリジン A  
 およびアングイジン）；ウレタン；ピンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；  
 ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポプロマン；ガシトシン；アラビノシド  
 （「A r a - C」）；チオテパ；タキソイド、ドセタキセル；クロラムブシル；  
 ゲムシタピン；6 - チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；  
 白金類似体、例えば、シスプラチンおよびカルボプラチン；ピ

10

20

30

40

50

ンブラスチン；白金；エトポシド（VP-16）；イホスファミド；ミトキサントロン；  
 ピンクリスチン；オキサリプラチン；ロイコボリン；ピノレルビン；ノバントロン；エダ  
 トレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ  
 阻害剤 RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド、例え  
 ば、レチノイン酸；カベシタピン、オキサリプラチン、ベンダムスチン、フラボピリドール、  
 レナリドマイド、シスプラチン、シタラピン、ミトキサントロン、デキサメタゾンが  
 挙げられる。

【0119】

本発明の別の態様において、上記のうちの2つ以上の組み合わせ、例えば、シクロホス  
 ファミド、ドキソルピシン、ピンクリスチン、およびプレドニゾロンの併用療法の略称で  
 あるCHOP；フルダラビンおよびシクロホスファミドの略称FC；フルダラビン、シク  
 ロホスファミド、およびリツキサンの略称であるFRC、ならびに、5-FUおよびロイ  
 コボリンとオキサリプラチンとを組み合わせた治療計画の略称であるFOLFOXが、血  
 液悪性腫瘍を治療または予防するために使用されてもよい。

10

【0120】

別の態様において、本発明は、抗体に、CD44受容体を有する細胞を標的とさせる方  
 法を提供する。この方法は、細胞を本発明の抗体と接触させることを含む。

【0121】

別の態様において、本発明は、本発明の抗体を使用して、血液悪性腫瘍を有するかまた  
 は有するリスクのある対象を治療するために治療計画または疾患の進行を監視する方法  
 を提供する。さらなる実施形態は、CD44の対照レベルと比較してCD44タンパク質の  
 量に増加または減少が生じたかどうかを判定することに関し、該増加または減少は、本発  
 明の抗体を対象に投与したことまたは疾患の進行の結果である。

20

【0122】

別の態様において、本発明は、血液悪性腫瘍細胞を含むことが分かっているかまたは疑  
 われる対象からの試料においてCD44タンパク質の存在を検出するためのキットを提供  
 する。キットは、本発明の抗体と、アッセイ環境においてそれを使用するための指示とを  
 含む。

【0123】

本明細書で論じられるように、本発明の抗体または抗体断片は、ヒト化抗体を含んでも  
 よく、例えば、従来の薬学的に許容される担体または希釈剤中で、例えば、免疫原性アジ  
 ユバント等のさらなる活性または不活性成分と、また任意選択的に、抗炎症性および抗線  
 維素溶解性の薬剤等の補助的または組み合わせ的に活性な分子と、治療用途のために組み  
 合わせることができる。

30

【0124】

他の実施形態において、本明細書に記載される抗体または抗体断片は、組み合わせ治療剤  
 、例えば、放射性核種、分化誘導因子、薬物、または毒素と、協調的に投与されるか、同  
 時処方されるか、または連結される（例えば、共有結合的な結合）。当該技術分野におい  
 て周知である種々の既知の放射性核種を用いることができる。そのような組み合わせ治療の  
 製剤および方法における使用に有用な薬物は、メトトレキサート、ならびにピリミジンお  
 よびプリン類似体を含む。好適な分化は、分化誘導因子は、ホルポールエステルおよび酪  
 酸を含む。好適な毒素は、リシン、アプリン、ジフテリア毒素、コレラ毒素、ゲロニン、  
 シュードモナス外毒素、赤痢毒素、およびヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質を含む。

40

【0125】

本発明の種々のアッセイ、診断方法、および治療方法を実行する際には、本明細書に記  
 載されるような抗体または抗体断片と他の材料との組み合わせを含むキットを予め調製し  
 ておくことが望ましい。例えば、サンドイッチ酵素イムノアッセイの場合、本発明のキッ  
 トは、任意選択的に適切な担体に結合させたCD44に特異的に結合する抗体；モノクロ  
 ーナル抗体と一緒に同じ抗原に結合することができる酵素標識モノクローナル抗体、もし  
 くは同じ様式において酵素で標識したポリクローナル抗体の凍結乾燥剤または溶液；精製

50

したCD44の標準溶液；緩衝液；洗浄液；ピペット；反応容器等を含んでもよい。さらに、キットは、任意選択的に、標識材料、および/または、アッセイ環境において本明細書に記載される方法を実施するための指示（すなわち、プロトコル）を提供する説明資料を含む。説明資料は、典型的には書面または印刷資料を含むが、これらはその限りではない。そのような指示を格納し、エンドユーザにそれらを伝えることができる任意の媒体が企図される。そのような媒体は、限定されないが、電子記憶媒体（例えば、磁気ディスク、テープ、カートリッジ、チップ）、光学媒体（例えば、CD ROM）等を含む。そのような媒体は、そのような説明資料を提供するインターネットサイトへのアドレスを含み得る。

#### 【0126】

##### 組換え法

本明細書に記載される抗CD44抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されるような組換え法および組成物を用いて生成することができる。一実施形態において、本明細書に記載される抗CD44抗体をコードする単離された核酸が提供される。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および/またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および/または重鎖）をコードすることができる。さらなる実施形態において、そのような核酸を含む1つ以上のベクター（例えば、発現ベクター）が提供される。さらなる実施形態において、そのような核酸を含む宿主細胞が提供される。そのような一実施形態において、宿主細胞は、（1）抗体のVLを含むアミノ酸配列および抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含むベクター、または（2）抗体のVLを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第1のベクターと、抗体のVHを含むアミノ酸配列をコードする核酸を含む第2のベクターとを含む（例えば、これらで形質転換されている）。一実施形態において、宿主細胞は、真核細胞であり、例えば、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）またはリンパ球系細胞（例えば、YO、NSO、Sp20細胞）である。一実施形態において、抗CD44抗体を作製する方法が提供され、該方法は、抗体の発現に好適な条件下で、上記に提供されるような抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養することと、任意選択的に、宿主細胞（または宿主細胞培養培地）から抗体を回収することとを含む。

#### 【0127】

抗CD44抗体の組換え生成のために、例えば、本明細書に記載されるような、抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞におけるさらなるクローニングおよび/または発現のために1つ以上のベクターに挿入される。そのような核酸は、従来の手順を用いて（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用して）容易に単離および配列決定することができる。

#### 【0128】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞は、本明細書に記載される原核細胞または真核細胞を含む。例えば、抗体は、特に、グリコシル化およびFcエフェクター機能が必要ではない場合、細菌中で生成されてもよい。細菌中での抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、同第5,789,199号、および同第5,840,523号を参照のこと（また、大腸菌における抗体断片の発現について記載するCharlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003), pp. 245-254も参照されたい）。発現後、抗体は、可溶性画分として細菌細胞ペーストから単離されてもよく、さらに精製することができる。

#### 【0129】

原核生物に加えて、グリコシル化経路が「ヒト化」されている真菌および酵母株を含む糸状菌または酵母等の真核微生物が、抗体をコードするベクターのための好適なクローニングまたは発現宿主であり、部分的または完全なヒトグリコシル化パターンを有する抗体が生成される。例えば、Gerngross, Nat. Biotech. 22: 1409

10

20

30

40

50

- 1414 (2004), and Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)を参照のこと。

【0130】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞はまた、多細胞生物（無脊椎動物および脊椎動物）に由来する。無脊椎動物細胞の例は、植物細胞および昆虫細胞を含む。特に、スボドプテラ・フルギペルダ細胞の遺伝子導入のために、昆虫細胞とともに使用され得る多数のバキュロウイルス株が同定されている

【0131】

植物細胞も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、および同第6,417,429（トランスジェニック植物において抗体を生成するためのPLANTIBODIES（商標）技術について記載している）を参照のこと。

【0132】

脊椎動物細胞も、宿主として用いることができる。例えば、懸濁液中で増殖するように適合された哺乳動物細胞株が有用である場合がある。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例は、SV40（COS-7）により形質転換させたサル腎臓CV1株；ヒト胚腎臓株（293細胞、または例えば、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)に記載されるような293細胞）；ベビーハムスター腎臓細胞（BHK）；マウスセルトリ細胞（例えば、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)に記載されるようなTM4細胞）；サル腎臓細胞（CV1）；アフリカミドリザル腎臓細胞（VERO-76）；ヒト子宮頸癌細胞（HELA）；イヌ腎臓細胞（MDCK）；パッファローラット肝臓細胞（BRL 3A）；ヒト肺細胞（W138）；ヒト肝臓細胞（Hep G2）；マウス乳癌（MMT 060562）；例えば、Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)に記載されるようなTR1細胞；MRC 5細胞；およびFS4細胞である。他の有用な哺乳動物宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣細胞（CHO）（DHFR<sup>sup</sup>-CHO細胞を含む）（Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)）；ならびにYO、NSO、およびSp2/0等の骨髓腫細胞株である。抗体生成に好適な特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J.), pp. 255-268 (2003)を参照のこと。

【0133】

アッセイ

本明細書で提供される抗CD44抗体は、当該技術分野で既知の種々のアッセイによって、それらの物理的/化学的特性および/または生物学的活性について、同定、スクリーニング、または特徴付けすることができる。同定、スクリーニング、および特徴付けには、結合アッセイおよび他のアッセイが用いられてもよい。

【0134】

一態様において、本発明の抗CD44抗体は、例えば、ELISA、ウェスタンブロット等の既知の方法によって、CD44結合活性について調べられる。抗CD44抗体が他の抗体と競合するかどうかを判定するために、例えば、固相直接または間接放射免疫測定法（RIA）、固相直接または間接酵素免疫測定法（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253を参照のこと）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（例えば、Kirkland et al., 1986, J. Immunol. 137:3614-3619を参照のこと）；固相直接標識アッセイ、；固相直接標識サンドイッチアッセイ（例えば、Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor

10

20

30

40

50

Pressを参照のこと) ; 1 - 125 標識を用いた固相直接標識RIA (例えば、Morel et al., 1988, Molec. Immunol. 25: 7 - 15を参照のこと) ; 固相直接ビオチン - アビジンEIA (例えば、Cheung, et al., 1990, Virology 176: 546 - 552を参照のこと) ; および直接標識RIA (Moldenhauer et al., 1990, Scand. J. Immunol. 32: 77 - 82) 等の多くの種類の競合結合アッセイを用いることができる。典型的には、そのようなアッセイは、これらの非標識試験抗原結合タンパク質および標識参照抗原結合タンパク質のうちのいずれかを担持する固体表面または細胞に結合した精製抗原の使用を伴う。競合阻害は、試験抗原結合タンパク質の存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することによって測定される。通常、試験抗原結合タンパク質は、過剰に存在する。競合アッセイによって同定される抗原結合タンパク質 (競合する抗原結合タンパク質) は、参照抗原結合タンパク質と同じエピトープに結合する抗原結合タンパク質、および、参照抗原結合タンパク質によって結合されたエピトープに立体障害が生じるのに十分なほど近接した隣接エピトープに結合する抗原結合タンパク質を含む。競合的結合を決定するための方法に関するさらなる詳細は、本明細書に記載される実施例に提供される。通常、競合する抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合、それは共通の抗原に対する参照抗原結合タンパク質の特異的な結合を、少なくとも40 ~ 45%、45 ~ 50%、50 ~ 55%、55 ~ 60%、60 ~ 65%、65 ~ 70%、70 ~ 75%、もしくは75%、またはそれ以上阻害する (例えば、減少させる)。特定の実施形態において、結合は、少なくとも80 ~ 85%、85 ~ 90%、90 ~ 95%、95 ~ 97%、もしくは97%、またはそれ以上阻害される。

#### 【0135】

本発明の一態様において、競合アッセイは、CD44への結合について、本明細書に (例えば、実施例4に) 記載されるRG7356抗CD44抗体と競合する抗体を同定するために使用されてもよい。特定の実施形態において、そのような競合する抗体は、RG7356抗CD44によって結合されるのと同じエピトープ (例えば、線形または立体構造エピトープ) に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的方法は、Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, N.J.) のMorris (1996) 「Epitope Mapping Protocols」に提供される。

#### 【0136】

例示的な競合アッセイにおいて、固定化されたCD44は、CD44に結合する第1の標識抗体 (例えば、RG7356抗CD44抗体) と、CD44への結合について第1の抗体と競合する能力について調べられる第2の非標識抗体とを含む溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在してもよい。対照として、固定化CD44が、第1の標識抗体を含むが第2の非標識抗体は含まない溶液中でインキュベートされる。第1の抗体のCD44への結合を可能にする条件下でインキュベーションした後、過剰な未結合抗体が除去され、固定化CD44と会合した標識の量が測定される。対照試料と比較して、試験試料中の固定化CD44と会合した標識の量が実質的に減少した場合、それは、第2の抗体がCD44への結合について第1の抗体と競合していることを意味する。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.) を参照のこと。

#### 【0137】

別の態様において、好適な抗CD44抗体が、血液悪性腫瘍と関連する細胞の生存を阻害する能力について、同定、スクリーニング、および特徴付けされる。一実施形態において、血液悪性腫瘍は、白血病であり、好ましくはリンパ性白血病である。好ましい実施形態において、リンパ性白血病はCLLである。抗CD44抗体が血液悪性腫瘍と関連する細胞 (例えば、CLL細胞) の生存を阻害する能力は、本明細書に、例えば、実施例4に

記載されるプロトコルおよびアッセイを用いて検証することができる。

【0138】

#### 製造物品

本発明の別の態様において、上述の血液悪性腫瘍の治療、予防、および/または診断に有用な材料を含む製造物品が提供される。製造物品は、容器と、容器上のもしくは容器に関連付けられた表示または添付文書を含む。好適な容器は、例えば、ボトル、バイアル、注射器、点滴液袋等を含む。容器は、ガラスまたはプラスチック等の様々な材料から形成されてもよい。容器は、単独であるか、または血液悪性腫瘍を治療、予防、および/もしくは診断するのに効果的な別の組成物と組み合わせられた組成物を保持し、滅菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、皮下用注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈内用溶液バッグまたはバイアルであってもよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の抗CD44抗体である。表示または添付文書は、選択された状態を治療するために組成物が使用されることを示唆する。さらに、製造物品は、(a)本発明の抗CD44抗体を含む組成物の中に収容する第1の容器と、(b)さらなる治療剤を含む組成物の中に収容する第2の容器とを含み得る。特定の実施形態において、第2の容器は、本明細書に記載されるさらなる治療剤のうちの1つ等の第2の治療剤を含む。

10

【0139】

本発明のこの実施形態における製造物品は、特定の状態を治療するために組成物を使用できることを示唆する添付文書をさらに含んでもよい。代替的にまたは付加的に、製造物品は、注射用静菌水(BWFI)、リン酸緩衝生理食塩水、リンガー溶液、およびブドウ糖溶液等の薬学的に許容される緩衝液を収容する第2の(または第3の)容器をさらに含んでもよい。製造物品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルタ、針、および注射器を含む、商業的およびユーザの観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

20

【0140】

特許出願および公開を含む、本明細書に引用した全ての参考文献は、参照により、それらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0141】

本発明を詳細に説明してきたが、添付の特許請求の範囲に定義される本発明の範囲から逸脱することなく、修正、変更、および均等な実施形態が可能であることは明白であろう。さらに、本開示における全ての例は、非限定的な例として提供されることを認識されたい。

30

【実施例】

【0142】

#### 実施例1

この実施例は、抗CD44抗体の毒作用がCLL細胞に特異的であることを示している。

【0143】

32人のCLL患者と4人の健常ボランティアからリンパ球を採取した。これらの細胞を標準条件下で培養した。1マイクログラム未満の量のCD44抗体を細胞に投与した。抗体は、CLL患者からのリンパ球に対して直接細胞傷害性を示したが、健常ボランティアからのリンパ球には何の影響も及ぼさなかった。

40

【0144】

#### 実施例2

この実施例は、CLL細胞に対する抗CD44抗体の毒作用が間葉系細胞との共培養による影響を受けないことを示している。

【0145】

32人のCLL患者と4人の健常ボランティアからリンパ球を採取した。これらの細胞を間葉系細胞とともに標準条件下で培養した。1マイクログラム未満の量のCD44抗体を細胞に投与した。抗体は、CLL患者からのリンパ球に対して直接細胞傷害性を示したが、健常ボランティアからのリンパ球には何の影響も及ぼさなかった。通常、間葉系細胞

50

は、CLL細胞の*in vitro*での生存を支持することができるが、CD44抗体の存在下ではそれは起こらなかった。

【0146】

#### 実施例3

この実施例は、免疫不全マウスに移植したCLL細胞のクリアランスを示している。

【0147】

CLL細胞を免疫不全RAG-2-/-/yc-/-マウスに移植した。次いで、マウスにCD44抗体を投与した。結果は、わずか1mg/kgほどのこのmAbが、移植されたCLL細胞の完全クリアランスをもたらし、対照処理動物には影響が認められなかったことを示した。

【0148】

#### 実施例4

この試験では、表面CD44の発現レベルを評価し、*in vitro*および*in vivo*でCLL細胞の生存を阻害する能力について、新しく開発されたヒト化抗CD44モノクローナル抗体(RG7356、Roche)の有効性を調べた。抗CD44抗体の作用機序についても調査した。

【0149】

#### 材料および方法

ヒト試料 インフォームドコンセントの後にCLL Research Consortium (CRC)によって試料が採取され、CLLの診断基準を満たす患者から得られた。これらの試料は、フローサイトメトリーにより95%を超えるCD19+/CD5+細胞を有していた。ZAP-70の発現およびIgVH遺伝子の突然変異の状態を以前に記載されているように評価した(Rassenti et al., N Engl J Med 2004, 351: 893-901)。健常ドナーからの Buffy Coat 試料をSan Diego Blood Bankから得た。Ficoll-Hypaque (Pharmacia, Uppsala, Sweden)を用いた密度遠心分離により末梢血単核細胞(PBMC)を単離し、液体窒素中での生存保存のために90%ウシ胎仔血清(FCS)および10%ジメチルスルホキシド(DMSO)に再懸濁した。

【0150】

試薬 ヒト化抗CD44 Mab (RG7356)は、Roche (Canada)から贈られたものであった。対照ヒトIgGは、Cell Scienceから購入した。高分子量(>950kDa)のヒアルロン酸(HA)をR&D Systemから購入した。Z-VAD-FMKは、BDから購入した。製造者の指示に従ってAlex Fluor (登録商標) 647 Protein Labeling Kit (Invitrogen)を使用して、RG7356をAlex 647とコンジュゲートし、BDから抗IgM-FITCを購入し、フローサイトメトリー分析のために、Caltag LaboratoriesからAlex 488とコンジュゲートしたZap70を購入した。

【0151】

ウェスタンブロット分析および免疫沈降 原発性CLL細胞と、健常ドナーからのPBMCを、次に示すように処理した。細胞をPBSで2回洗浄し、プロテアーゼ阻害剤(Roche)を含む溶解緩衝液(1% NP40、50mM Tris-HCl、pH7.5、100mM NaCl、5mM EDTA)に溶解した。ピシニコニン酸タンパク質アッセイ(Pierce, Rockford, IL)を使用してタンパク質濃度を決定した。各試料からの等しい量のタンパク質をSDS-PAGEにより分解し、続いて、CD44に特異的な抗体(Roche)、ZAP-70 (BD Transduction Lab)、ホスホ-AKT (Ser473)、AKT (Cell Signaling Technology)、PARP (BD Bioscience)、および -アクチン(Santa Cruz Biotechnology)を用いて免疫ブロットを行った。西洋ワサビペルオキシダーゼとコンジュゲートした抗IgG (Cell Signaling Technology)を二次抗体として用いた。化学発光システム(T

10

20

30

40

50

hermo Fisher scientific)により膜を発色させ、オートラジオグラフィーにより確認した。

【0152】

免疫沈降のために、各試料からの細胞溶解物を、最初に、プロテインAセファロースビーズ(50%スラリー)とともに4で3時間インキュベートし、次いで、指定された抗体を加え、4で1時間さらにインキュベートした。結合したビーズを溶解緩衝液中で4回洗浄してからSDS試料緩衝液を加え、上述のようにSDS-PAGEおよび免疫プロットに供した。

【0153】

ホスホ-AKT/総AKTELIISA 製造者の指示に従ってp-AKT(Ser473)およびAKTサンドイッチELISAキット(R&D system)を使用して、p-AKTおよび総AKTのレベルを測定した。端的に述べると、96ウェルプレートのウェルに細胞を固定化して透過処理し、異なる種に由来する2つの一次抗体でインキュベートした。異なる種を認識する2つの二次抗体を西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)またはアルカリホスファターゼ(AP)のいずれかで標識し、HRPまたはAPのいずれかのための2つのスペクトル的に異なる蛍光発生基質を用いて検出した。未処理対照に対する総AKTの蛍光強度で除したp-AKTの蛍光強度に基づいて、p-AKTレベルの倍数変化を計算した。

10

【0154】

細胞生存率アッセイ 3,3-ジヘキシルオキサカルボシアニンヨージド(DiOC6、Invitrogen)を使用したミトコンドリア膜貫通電位(m)の分析、およびヨウ化プロピジウム(PI、Sigma)に対する細胞膜透過性により、細胞生存率を決定した。原発性CLL細胞を採取し、60nM DiOC6および10μg/mL PIとともに100μL FACS緩衝液を含むFACSチューブに移した。細胞を37で20分間インキュベートし、FACSCalibur(Becton Dickinson)を用いたフローサイトメトリーにより30分以内に分析した。525nm(FL-1)でDiOC6について、また600nm(FL-3)でPIについて蛍光を記録した。FlowJo 7.2.2ソフトウェア(Tree Star)を使用してデータを分析した。PI/DiOC6<sup>hi</sup>集団の割合を計算することにより生存細胞を決定した。

20

30

【0155】

CLL細胞と骨髄間質細胞(MSC)との共培養 必要があれば、記載されているように(Fecteau et al: Mol Med 2012, 18: 19-28) CLL患者の骨髄からin vitroで誘導したMSCの層上でCLL細胞を共培養した。1×10<sup>6</sup> CLL細胞/mL(2×10<sup>5</sup>細胞/ウェル)およびRG7356またはアイソタイプ対照抗体(Sigma)を指定された濃度で加える2~3日前に、継代2代目~6代目のMSCを96ウェル平底組織培養プレートに1000細胞/cm<sup>2</sup>で播種した。PIおよびDiOC6による染色を用いてCLL細胞の生存率を決定した。

【0156】

CD44内在化の検出 氷上で20分間、Alex647とコンジュゲートしたヒト化抗CD44抗体でCLL細胞をインキュベートした。2回洗浄した後、細胞を氷上に放置するか、または、内在化を促進するために、指定された時間37でインキュベートした。フローサイトメトリー分析により平均蛍光強度(MFI)を決定した。

40

【0157】

カルシウム流の測定 Ca<sup>++</sup>およびMg<sup>++</sup>を含まないハックス液(HBSS)に2×10<sup>6</sup> CLL細胞を2μM Fluo-4AM(分子プローブ)とともに負荷し、37で30分間インキュベートした。HBSSで細胞を2回洗浄し、次いで、1mLの不完全RPMIに懸濁した。フローサイトメーター(Becton Dickinson)により細胞懸濁液の蛍光を記録した。IgM刺激のために、細胞を37で維持した。FlowJoソフトウェアを使用してデータを分析した。

50

## 【0158】

ヒトCLL異種移植片動物試験 6～8週齢のRAG2<sup>-/-</sup>c<sup>-/-</sup>マウス(University of California San DiegoのDr. Catriona Jamiesonより調達)を、無菌条件下の層流キャビネット内で飼育し、自由に摂食させた。マウスに関する全ての実験は、米国立衛生研究所(National Institutes of Health(NIH, Bethesda, MD, USA))の動物実験に関する指針に従って行われた。試験プロトコルは、UCSDおよびMedical Experimental Animal Care Committee(USA)によって承認された。原発性CLL患者からのPBMCをAIM-V無血清培地中で調製し、 $2 \times 10^7$ 生存細胞を各マウスの腹腔に注射した。翌日、種々の用量の抗体を腹腔内に注射した。7日後、合計体積12mLのDPBSを腹腔に注射することにより腹腔洗浄液(PL)を抽出した。Guavaカウティングを使用してPL細胞の総回収率を決定した。続いて、マウスおよびヒト両方のFcブロッカーで細胞を30分間4でブロックし、例えば、CD19、CD5、CD45等の種々のヒト細胞表面マーカーで染色し、FACS分析のために処理した。PL中の最終的な残留CLL細胞の数を計算するために、FACS分析によって検出されたCLL細胞の割合を得られた生存イベントまで逆算し、次いで総PL細胞カウントで乗じた。ヒトIgGで処理したマウスからの残留CLL細胞を100%とし、ベースラインとして設定した。各処理群は、少なくとも3匹のマウスを含み、データは平均値 $\pm$ SEMとして表した。

10

## 【0159】

抗体依存性細胞食作用(ADCP)アッセイ チオグリコレート注射の4日後、Rag2<sup>-/-</sup>c<sup>-/-</sup>マウスの腹腔からマクロファージを採取し、*in vitro* ADCPアッセイに使用した。端的に述べると、生存可能な状態で凍結したCLL PBMCを、2%(v/v)FBS Low IgG、100U/mLペニシリン、および100 $\mu$ g/mLストレプトマイシンを含むRPMI 1640に再懸濁し、指定された濃度の抗CD44抗体、リツキシマブ、またはアイソタイプ対照とともに、 $3 \times 10^4$ 細胞/ウェルの密度で96ウェル平底プレート(Corning)に分配した。エフェクター対標的の比率が5:1になるように、マクロファージ( $1.5 \times 10^5$ 細胞/ウェル)を付加する前にプレートを氷上で30分間インキュベートした。5%CO<sub>2</sub>、37 $^{\circ}$ Cで3時間インキュベーションした後、細胞を採取し、FACS Calibur Instrument(BD)を用いたフローサイトメトリーにより分析した。FlowJo分析ソフトウェアを用いて残留する生CLL細胞のどの分画が決定されるかに基づいて、CLL細胞のみおよびマクロファージのみを含む試料を、生CLL細胞の適切なゲーティングを設定するために用いた。

20

30

## 【0160】

補体媒介細胞毒性アッセイ(CDC) ZAP-70-CLL細胞を単離し、洗浄し、10%(v/v)FBS、100U/mLペニシリン、および100 $\mu$ g/mLストレプトマイシンを含むRPMI 1640に再懸濁し、 $1 \times 10^5$ 細胞/ウェルの密度で96ウェルU底プレート(Corning)に分配した。氷上で10 $\mu$ g/mLの抗体とともに1時間インキュベーションした後、細胞を採取し、PBSで1回洗浄して未結合抗体を除去し、3～4週齢ウサギからの20%補体とともに5%CO<sub>2</sub>中37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。CLL細胞の生存率は、上述のように、DiOC6およびPI染色の後、フローサイトメトリーにより決定した。

40

## 【0161】

統計分析 非対応もしくは対応スチューデントt検定または一方向ANOVAの後にダネットの多重比較検定を用いて、統計的有意性を決定した。ピアソン相関係数を用いて、ZAP-70の発現と抗CD44抗体で処理した細胞の生存率との相関関係を分析した。別途指示のない限り、データは、平均値 $\pm$ SEMまたは中央値 $\pm$ SEMのいずれかとして表される。

## 【0162】

50

## 結果

CD44は、CLL細胞、特にZAP-70+細胞において高度に発現される

フローサイトメトリーのためにAlexa647とコンジュゲートされているか、または免疫プロット分析のためにコンジュゲートされていないヒト化抗CD44mAb (RG7356)を用いて、CLLに罹患する59人の患者からの白血病B細胞と、8人の健常ドナーからの正常B細胞をCD44タンパク質の発現について分析した。図1Aは、ヒト化CD44 mAb (白抜きのヒストグラム)または対照mAb (斜線のヒストグラム)で染色した、ヒトリンパ腫B細胞株(EW36)、正常B細胞、およびCLL細胞の蛍光ヒストグラムを示す。フローにより、CD19+CD5+CLL B細胞およびCD19+正常B細胞の両方に高レベルのCD44の発現が検出されたが、リンパ腫B細胞株EW36では検出できなかった(図1A)。図1Bは、ヒトCD44に特異的なヒト化CD44 mAbまたはアクチンに対するAbを用いた、EW36からの可溶化物、健常成人またはCLL患者からの末梢血単核球(PBMC)の免疫プロット分析を示す。ウェスタンプロット分析において、種々のCD44アイソフォームおよび標準CD44タンパク質は全て、RG7356によって正常な末梢血単核(PBMC)またはCLL B細胞のいずれかにおいて検出された(図1B)。CLL細胞および正常リンパ球の両方において、標準CD44が優勢であるように見える(図1B)。図1Cは、パネルAに示すように、ヒト化抗CD44 mAbまたは対照mAbで染色した健常成人(n=8)またはCLLに罹患する患者(n=59)からのPBMCを示す。CD44 mAbの平均蛍光強度(MFI)を対照mAbのMFIで除すことによりMFI R(平均蛍光強度比)を得る。各点は、CD19+CD5+B細胞にゲートをかけた個々のCLL患者試料、またはCD19+B細胞にゲートをかけた健常成人試料(左)からのCD44の発現を表している。CD44の発現レベルは、記載されている(Chiorazzi et al., N Engl J Med 2005, 352:804-815)ように、IgV<sub>H</sub>遺伝子における体細胞突然変異の程度(中央)またはZAP-70の発現レベル(右)に従ってCLLの臨床特性と相関していた。線は、各群ごとに、CD44の発現レベルの中央値を示す。P<0.05は、スチューデントt検定を用いて計算した2群間の集合的なCD44の発現における差の統計的有意性を意味する。正常B細胞(平均蛍光強度比(MFI R)の中央値=111.7)およびCLL B細胞(MFI R=131.9)(図1C、右パネル)において同様のレベルのCD44が検出されたが、未変異IGVH遺伝子を有するCLL B細胞におけるCD44の発現レベルは、変異IGVH遺伝子の発現レベルよりも有意に高かった(図1C、中央パネル; MFI R中央値=それぞれ、161.2対118.5; p=0.013)。さらに、ZAP-70の発現を伴うCLL B細胞もまた、ZAP-70の発現が低いまたは発現されない細胞と比較して有意に高いCD44の発現レベルを示した(図1C、左パネル); MFI R中央値=それぞれ、161.2対118.7; p=0.019)。

## 【0163】

RG7356によって誘導された直接アポトーシスに対するCLL細胞の感受性

CD44の発現レベルは、CLL細胞におけるZAP-70の発現と相関しているため、高レベルのZAP-70発現を伴う患者は、RG7356による治療により反応を示すかもしれない。この仮説を検証するために、合計28人の患者からの原発性CLL細胞(ZAP-70+、n=16; ZAP-70-、n=12)と、6人の健常ドナーからのPBMCを、濃度を増加させたRG7356とともに24時間インキュベートした。DiOC<sub>6</sub>/PI染色に基づくフローサイトメトリーによりアポトーシスの誘導を分析した。

## 【0164】

図2に示すように、指定された濃度および期間、抗CD44またはhIgG対照mAbの存在下で、CLL細胞または正常PBMCを培養した。細胞を採取し、フローサイトメトリーにより生存率を測定するためにDiOC<sub>6</sub>/PIで染色した。正常PBMCもCD19の発現について染色し、B細胞集団における細胞死を評価した。図2Aは、50ug/ml mAbで24時間インキュベートした2つの代表的なCLL試料の等高線を表す

10

20

30

40

50

。相対的な DiOC6 および PI の蛍光強度を、それぞれ X 軸および Y 軸上に示す。DiOC6 強陽性および PI 弱陽性である右下象限の細胞は生存能力があり、図示されるプロットの作成にこれらの数を用いた。図 2 B は、濃度を増加させた mAb の存在下で培養し、上記のような生存率の分析のために 24 時間後に採取した、ZAP-70 の発現に従って分けた CLL 細胞または正常 PBMC を示す。示されるデータは、3 通りの代表的な試料の平均値 + / - SEM である。\* は  $P < 0.05$  を意味し、\*\* は  $P < 0.01$  を意味し、\*\*\* は  $P < 0.001$  を意味する (スチューデント t 検定)。図 2 C は、(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) mAb の存在下または非存在下で培養し、上記のような生存率の分析のために、指定された時間に採取した細胞を示す。示されるデータは、3 通りの代表的な試料の平均値 + / - SEM である。\* は  $P < 0.05$  を意味し、\*\* は  $P < 0.01$  を意味し、\*\*\* は  $P < 0.001$  を意味する (スチューデント t 検定)。図 2 D において、各点は、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  抗 CD44 mAb とともに 24 時間培養した、1 人の患者からの細胞の相対生存率を表す。生存細胞パーセントを、対照 mAb で処理した細胞の生存率に正規化した。線は、各群ごとに、抗 CD44 mAb で処理した細胞の中央生存率を示す (正常細胞  $N = 6$ 、CLL 細胞  $n = 28$ )。図 2 E は、標準的な 20% の発現をカットオフとして用いて ZAP-70 の状態の関数で表した、D に示される CD44 mAb の曝露の後に残った生存細胞パーセントを示す。抗 CD44 mAb で処理した ZAP-70 + CLL 細胞の生存率 ( $n = 12$ ) は、抗 CD44 mAb で処理した ZAP-70 - CLL 細胞の生存率 ( $n = 16$ ) よりも有意に低かった ( $P = 0.001$  (スチューデント t 検定))。図 2 F は、各試料ごとに ZAP-70 を発現する細胞のパーセントの関数で表した、D に示される抗 CD44 mAb の曝露の後に残った生存細胞パーセントを示す。ZAP-70 の発現レベルは、抗 CD44 mAb で処理した細胞の生存率と関連している。ピアソン  $R = -0.5345$ 、 $P = 0.0034$ 、 $n = 28$ 。

#### 【0165】

わずが 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の RG7356 が CLL 細胞においてアポトーシスを誘導したのに対し、50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  という高濃度の RG7356 またはヒト IgG 対照抗体で処理した正常 B 細胞にはほとんど影響が見られなかった (図 2 A - B)。また、ZAP-70 + CLL 細胞におけるアポトーシスの誘導は用量依存性であった。これらの結果は、RG7356 が、特に高レベルの ZAP-70 を発現する細胞において、CLL 細胞に選択的な細胞毒性を有することを示唆している。

#### 【0166】

RG7356 によって誘導される細胞毒性の速度論を調べるために、細胞を 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の RG7356 で処理し、種々の時点で分析した。処理を行わなかった細胞または対照 hIgG で処理した細胞と比較して、CLL 試料中における RG7356 処理から早ければ 3 時間後に細胞死の増加が生じ、経時的に持続した (図 2 C)。異なる CLL 試料の中でも、CD44 の発現レベルが同等であるにもかかわらず、ZAP-70 + 細胞は、RG7356 によって誘導されたアポトーシスに対する感受性が ZAP-70 - 細胞よりも有意に高かった (図 2 E および図 9)。さらに、24 時間の時点で RG7356 で処理した CLL 細胞の生存率と、個々の試料の各々によって発現された ZAP-70 のレベルとの間に、著しい逆の関連性が観察された (図 2 F、ピアソン  $R = -0.5345$ 、 $P = 0.0034$ )。対照的に、48 時間までは、処理にもかかわらず正常 B 細胞には相違が観察されなかった (図 2 C - D) ことから、この特異的 CD44 Mab は、CLL 細胞に対する選択性を示すこと、および正常 B 細胞に対して比較的安全であることが示唆される。

#### 【0167】

RG7356 媒介性アポトーシスはカスパーゼ依存性である。抗 CD44 mAb によって媒介される細胞死はミトコンドリア膜貫通電位を特徴とするという最近の報告 (Gupta et al. J Cell Mol Med 2009, 13: 1004 - 1033) に一致して、我々のデータも CLL 細胞における RG7356 によるアポトーシスの誘導を裏付けている。RG7356 が CLL 細胞死を誘導する機序をさらに調査する

10

20

30

40

50

ために、FACS分析のためにアネキシンVおよび7AADで処理および染色するか、またはSDS-PAGEのために溶解させて、ウェスタンブロットによりPARPの切断を評価した。

#### 【0168】

図3に示すように、50ug/mlの抗CD44 mAbまたはhIgG対照Abの存在下で、CLL B細胞を48時間培養した。図3Aは、アネキシンVおよび7AADで染色し、フローサイトメーターにより分析した細胞を示す。相対蛍光強度を、それぞれX軸およびY軸に示す。左下象限および左上象限の細胞は、アポトーシス細胞である。図3Bにおいて、細胞可溶化物を採取し、ウェスタンブロットによりPARPの切断断片について分析した。負荷対照としてアクチンを使用した。(C)種々の濃度の汎カスパーゼ阻害剤Z-VAD-FMKの非存在下または不在化で、細胞を抗CD44 mAbとともに48時間培養した。DiOC6およびPI染色の後、フローサイトメーターにより細胞を分析した。処理を行わなかった試料を100%の生存率としてデータを比較した。示される結果は、3つの異なるCLL試料からの平均±SEMである。ダネットの多重比較検定を用いて、統計的有意性を決定した。\*は $P < 0.05$ を意味し、\*\*は $P < 0.01$ を意味し、\*\*\*は $P < 0.001$ を意味する。

10

#### 【0169】

RG7356で処理したCLL細胞には、対照hIgGと比較して少なくとも2倍のアネキシンV陽性アポトーシス細胞の増加が見られた(図3A)。また、これらのRG7356で処理した試料には、PARP切断の誘導も検出された(図3B)。最後に、汎カスパーゼ阻害剤Z-VAD-FMKにより、用量依存性の様式で細胞歯がレスキューされた(図3C)ことから、RG7356によって誘導されたアポトーシスは、CLL細胞においてカスパーゼ依存性であることが示唆される。

20

#### 【0170】

CLL微小環境の影響 微小環境の細胞が、自発的および薬物誘導性のアポトーシスからCLL細胞を保護することが報告されている(Burger et al. Blood 2009, 114:3367-3375; Meads et al. Nat Rev Cancer 2009, 9:665-674)。CLL微小環境がRG7356によって誘導されるアポトーシスに与える影響を調べるために、患者の骨髄由来MSCと共培養したCLL細胞に対する細胞生存率アッセイを実行した。

30

#### 【0171】

図4は、指定された濃度で24または48時間、抗CD44 mAbまたはhIgG対照抗体でインキュベートした、単独でまたは間葉系間質細胞(MSC)の存在下で培養したCLL細胞を示す。生存率は、染色およびフローサイトメトリーにより測定した。0時を100%の生存率として、PI<sup>neg</sup>/DiOC<sub>6</sub><sup>hi</sup>の集団にデータを正規化した。示される結果は、各群の3人の異なる患者からの平均値+/-SEMである。\*は、抗CD44 mAb処理とhIgG処理との間の統計的に有意な差を示す(対応スチューデントt検定)。

以前の観察と一致して、RG7356で処理したZAP-70+ CLL細胞は、MSCの存在に関係なく、迅速かつ著しい生存率の減少を示し、48時間までには細胞の約50%が死滅した(図4)。対照的に、ZAP-70- CLL細胞は、MSCの存在にもかかわらず影響を受けなかった。

40

#### 【0172】

抗CD44 mAb(RG7356)は、ヒアルロン酸(HA)によって誘導されるシグナル伝達およびZAP-70+ CLL細胞のIn Vitroでの生存をブロックする 健全な個人に由来するMSCおよび多発性骨髄腫に罹患する患者に由来するMSCが、HAシターゼ、およびCD44の主なリガンドであるHAを発現することが示されているため(Calabro et al. Blood 2002, 100:2578-2585; Jung et al. Biochem Biophys Res Commun 2011, 404:463-469)、我々は、HAがCLL細胞の生存およびシ

50

グナル伝達に与える影響を調査した。50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  HAの非存在下または存在下においてCLL細胞を24時間培養し、フローサイトメトリー分析とともにDiOC<sub>6</sub>/PI染色を用いて生存率を評価した。

#### 【0173】

図5Aは、HA(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を用いてまたは用いずに24時間インキュベートした、ZAP-70<sup>neg</sup> CLL試料(n=5)またはZAP-70<sup>+</sup> CLL試料(n=7)からの精製CLL細胞を示す。CLL細胞を採取し、DiOC<sub>6</sub>/PIで染色し、フローサイトメトリーにより分析した。示されるデータは、調べた各患者についてのDiOC<sub>6</sub>+PI-生存細胞のパーセントを示す。図5Bは、HA(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )で刺激したCLL試料(n=3、ZAP-70<sup>neg</sup>またはZAP-70<sup>+</sup>)から異なる時点に採取し、リン酸化AKT(p-AKT)/総AKT(t-AKT)特異的ELISAアッセイにより分析した細胞可溶化物を示す。示される結果は、処理前(0分)のレベルと比較して異なる時点でt-AKTに正規化したp-AKTのレベルの平均値+/-SDである。P<0.05は、対応スチューデントt検定を用いて分析した差の統計的有意性を示す。図5Cにおいて、抗CD44 mAb(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )を用いてまたは用いずにZAP-70<sup>+</sup> CLL試料を20分間前処理し、次いでHA(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )で5分間刺激した。細胞を溶解し、p-AKTおよびt-AKTの発現についてウェスタンブロットにより分析した。図5Dにおいて、抗CD44 mAbを用いてまたは用いずに、およびHAを用いてまたは用いずに、24時間ZAP-70<sup>+</sup> CLL試料をインキュベートした。細胞を採取し、DiOC<sub>6</sub>/PI染色の後、フローサイトメトリーにより分析した。DiOC<sub>6</sub>+PI<sup>neg</sup>生存細胞のパーセントを示した。チューキーの多重比較検定の後、一方向ANOVAにより統計的有意性を決定した。

10

20

#### 【0174】

HAで処理したZAP-70<sup>+</sup>患者試料に軽度から中程度の細胞生存率の増加が観察された(図5A、右パネル)。対照的に、大部分のZAP-70<sup>-</sup>症例に対して、HA処理はほとんど影響を与えなかった。CLL細胞においてHAによって誘導され得る可能性のあるシグナル伝達経路を調べたとき、我々は、pAKT/総AKT特異的ELISAアッセイを用いたHA処理の5~10分後に、AKTのリン酸化が急速に増加したことを発見した(図5B)。調べた全ての試料が同様のCD44の発現レベルを有していたが(データは図示せず)、生存率の結果と一致して、ZAP-70<sup>+</sup>症例において、AKTシグナル伝達のリン酸化は、HAによって選択的に誘導される。RG7356がHAによって誘導されるシグナル伝達および細胞の生存に与える影響を評価するために、ZAP-70<sup>+</sup> CLL細胞をRG7356で前処理し、次いでHAで刺激した。HA処理後にp-AKTシグナル伝達または生存のいずれかの誘導が消失したことから(図5C-D)、RG7356は、微小環境に蓄積され得るCD44とHAとの相互作用をブロックするのに非常に効果的であることが示唆される。

30

#### 【0175】

RG7356は、ZAP-70下流BCRシグナル伝達カスケードを抑制する RG7356がCLL細胞の生存を阻害する機序をさらに調査するために、我々は内在化アッセイを行った。

40

#### 【0176】

図6Aは、CLL細胞による抗CD44 mAbの内在化を示す。CLL細胞をAlexa-647とコンジュゲートした抗CD44 mAbで染色し、4 または37 のいずれかでインキュベートし、フローサイトメトリーにより指定された時点で分析した。データは、0時で100%として細胞の平均蛍光強度に正規化したCD44の平均蛍光強度(MFI)として表した。図6Bは、CD44 mAb処理後のCD44タンパク質レベルの減少を示す。CLL試料をhIgG対照Abまたは抗CD44 mAb(50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )のいずれかで48時間処理し、細胞可溶化物を免疫ブロットにより分析した。図6Dは、CD44 mAb処理後のZAP-70タンパク質レベルの減少を示す。CLL細胞を抗CD44 mAbまたはhIgG対照Abで指定された期間インキュベートし、A

50

l e x a - 4 8 8 とコンジュゲートした抗 Z A P - 7 0 抗体で染色し、フローサイトメトリーにより分析した。Z A P - 7 0 <sup>+</sup> であった2つの代表的な C L L 試料を示す。図 6 D において、代表的なヒストグラムが、抗 C D 4 4 m A b (白抜き)または I g G 対照 (斜線)で 4 8 時間処理した2つの Z a p - 7 0 <sup>+</sup> C L L 試料 (C L L 1 および C L L 2) における Z A P - 7 0 の蛍光強度を示している。C D 1 9 <sup>+</sup> 正常 B 細胞における Z A P - 7 0 のレベルが、陰性対照としての役割を果たす (点線で示した白抜きのヒストグラム)。図 6 E は、C D 4 4 が、C L L 細胞中の Z a p - 7 0 と物理的に会合することを示している。異なる患者からの C L L 細胞のタンパク質可溶化物を、抗 C D 4 4 m A b または抗 Z A P - 7 0 A b のいずれかで免疫沈降 (I P) させた。結合生成物または全細胞可溶化物 (W C L) を、W B カラムに示される抗体を用いて免疫プロットにより精査した。図 6 F は、抗 C D 4 4 m A b 処理後の C D 4 4 および Z A P - 7 0 タンパク質複合体の発現低下を示している。Z A P - 7 0 <sup>+</sup> C L L 細胞を抗 C D 4 4 m A b (5 0 u g / m l) または h I g G 対照 A b で処理し、タンパク質可溶化物を抗 C D 4 4 m A b で免疫沈降 (I P) させ、指定された抗体を用いて免疫プロットに供した。図 6 G は、抗 C D 4 4 m A b の処理が、C L L 細胞において I g M によって誘導されるカルシウム流を減少させることを示している。Z a p - 7 0 <sup>+</sup> C L L 試料を、最初に蛍光カルシウム指示薬 F l u o - 4 A M で標識し、抗 C D 4 4 m A b (5 0 u g / m l) または h I g G 対照 A b のいずれかで 1 2 時間プレインキュベートし、次いで抗 - I g M で刺激し、F A C S により経時的に蛍光強度を記録した。線は、対照 C L L 細胞 (黒線) または抗 C D 4 4 m A b でプレインキュベートした細胞 (グレー線) の経時的な (x 軸) 蛍光強度における変化 (Y 軸上) を表している。矢印は、抗 I g M を加えた時間を示す。図 6 H は、抗 C D 4 4 m A b が、C L L 細胞において I g M によって誘導される生存を低減させることを示す。抗 I g M (1 0 u g / m l) の存在下または非存在下で、5 0 u g / m l 抗 C D 4 4 m A b または I g G 対照 A b を用いてまたは用いずに、Z A P - 7 0 <sup>+</sup> C L L 試料を 4 8 時間インキュベートした。細胞を採取し、D i O C <sub>6</sub> / P I で染色し、生存率測定のためにフローサイトメトリーにより分析した。調べた3つの患者試料のうちの1つから代表的なデータを示した。各棒は、3通りの試料からの D i O C <sub>6</sub> <sup>h i</sup> / P I <sup>n e</sup> <sup>s</sup> 生存細胞の平均比率を示す。エラーバーは、S E M を示す。\* は、チューキーの多重比較検定の後に一方向 A N O V A を用いて分析した差の統計的有意性を示す。

10

20

30

40

50

#### 【 0 1 7 7 】

A l e x 6 4 7 とコンジュゲートした R G 7 3 5 6 に結合すると、3 7 のインキュベーションから 1 0 分後には細胞表面 C D 4 4 の迅速な内在化が検出され、2 時間までには 4 0 % を超える平均蛍光強度 (M F I) の減少が表示された (図 6 A)。2 4 時間までは、処理に関係なく表面 I g M の減少が観察されなかったことから (データは図示せず)、R G 7 3 5 6 が C D 4 4 に特異的であることが証明される。R G 7 3 5 6 で処理した C L L 細胞における総 C D 4 4 タンパク質レベルのウェスタンプロット分析からも、著しい減少が明らかになった (図 6 B)。興味深いことに、R G 7 3 5 6 処理の 6 時間には Z A P - 7 0 の発現レベルも著しく減少し、1 2 時間までには Z A P - 7 0 のレベルは少なくとも 3 0 ~ 5 0 % 減少した (図 6 C ~ D)。免疫沈降分析の結果は、Z A P - 7 0 および C D 4 4 は、検査した全ての Z A P - 7 0 <sup>+</sup> C L L 細胞において複合体を形成したが、Z A P - 7 0 - 症例では形成しなかったことを示し (図 6 E)、Z A P - 7 0 が C L L 細胞における C D 4 4 生存シグナルに恐らく関与していることが示唆される。実際、図 6 F に示すように、R G 7 3 5 6 による処理は、Z A P - 7 0 / C D 4 4 複合体を妨害した。続いて、B C R 下流のシグナル伝達、例えば、細胞内カルシウム流も阻害された (図 6 G)。さらに、対照抗体による処理と比較して、R G 7 3 5 6 処理によって抗 I g M 刺激の生存促進性効果が抑制された (図 6 H)。

#### 【 0 1 7 8 】

異種移植片動物モデルにおいて、R G 7 3 5 6 が C L L 細胞の生存を妨げる R G 7 3 5 6 T の i n v i v o での有効性を評価するために、我々は、高度に免疫不全な R A G 2 / 鎖ノックアウトマウス (R a g 2 <sup>- / -</sup> / c <sup>- / -</sup>) を用いて異種移植片 C L L

のパーキング動物モデルを確立し、残留するCLL細胞を定量的に決定することを可能にした。

#### 【0179】

図7に示すように、mAb注射の1日前に、Rag2<sup>-/-</sup>c<sup>-/-</sup>マウスの腹腔にCLL細胞を注射した。細胞の注射から7日後に腹腔洗浄液を回収し、ヒト特異的なCD5、CD19、およびCD45の染色の後、細胞カウントおよびFACS分析による残留CLLの測定に供した。図7Aは、低用量または高用量のいずれかのmAbで処理した2つの代表的なCLL試料の等高線プロットを示す。右下ゲートの細胞はヒトCLL細胞であり、図7Bに示す棒グラフを作成するためにこれらの数を用いた。図7Bのグラフ中の各棒は、異なる濃度の抗CD44 mAbで処理した後にマウスから採取し、100%としての対照hIgGで処理したマウスからのものに正規化した、残留CLL細胞の割合を表す。示されるデータは、3人の異なる患者からの平均値+/-SEMである(各群n=3)。Pは、スチューデントt検定によって計算した抗CD44 mAb処理とhIgG処理との間の統計的に有意な差を示す。

10

#### 【0180】

用量漸増試験は、ZAP-70+ CLL細胞が、わずか0.01mg/体重Kgの単回低用量でZAP-70-細胞よりもRG7356処理により高い反応を示すという、我々の以前の観察を支持した(図7A)。それにもかかわらず、ZAP-70の発現レベルに関係なく、回収率100%としての対照hIgGと比較して、90%を超えるCLL細胞が1mg/KgのRG7356で処理したマウスから除去された(図7B)ことから、患者の疾患の特徴に関係なく、RG7356は、ニッチ依存性様式でCLL細胞を除去する上で非常に効率的であることが示唆される。

20

#### 【0181】

RG7356の作用機序は、抗体依存性細胞食作用(ADCP)であるRag2<sup>-/-</sup>c<sup>-/-</sup>マウスはB、T、およびNK細胞を欠損するが、残留マクロファージは腹腔内になおも存在する。ZAP-70- CLL細胞でRG7356によって媒介される細胞毒性における腹腔マクロファージの役割をさらに評価するために、チオグリコレート誘発マウス腹腔マクロファージの存在下または非存在下で細胞を処理し、食作用アッセイおよび細胞生存率アッセイに供した。

#### 【0182】

図8は、氷上で30分間、指定された濃度の抗CD44 mAb、対照hIgG Ab、またはリツキシマブでプレインキュベートしたCLL試料を示す。単独で(白抜きの棒)、または1:5の比率のマクロファージの存在下で(グレーの棒)、またはウサギ補体(右)で、3時間以上37°Cで細胞をさらにインキュベートした。細胞を回収し、染色し、フローサイトメリーにより生存CLL細胞(Pi<sup>neg</sup>DiOC<sub>6</sub><sup>hi</sup>)について分析した。示されるデータは、群当たり5人の異なる患者からの平均+/-SEMを、100%の生存率としての対応する対照試料に正規化したものである。\*はP<0.05を示し、\*\*はP<0.01を示す(チューキーの多重比較検定の後、一方向ANOVA)。

30

#### 【0183】

RG7356またはリツキシマブのいずれかで3時間インキュベーションした後、細胞生存率は、腹腔マクロファージと共培養した細胞においてのみ約50%顕著に減少したが(図8、グレーの棒)、細胞単独においては減少しなかったことから(白抜きの棒)、システムに活性な食作用が生じたことが示唆される。しかしながら、陽性対照としてリツキシマブで処理した細胞と比較して、RG7356で処理した細胞には補体媒体性の細胞毒性は観察されなかった(図8、塗りつぶした棒)。

40

#### 【0184】

抗CD44 mAbまたはリツキシマブで処理したCLL細胞の生存率CLL細胞における表面CD44タンパク質の高レベルの発現によって自信を得た我々は、新たに開発されたヒト化抗CD44 mAb(RG7356)のCLL細胞に対する細胞毒性活性を評価した。

50

## 【0185】

図9において、左のグラフ上の各点は、CD19 + CD5 + B細胞にゲートをかけた個々のCLL患者からのB細胞によるCD44の発現レベル(MFIR)を表している。線は、各群ごとに、CD44の発現レベルの中央値を示す。右のグラフ上の各点は、50  $\mu$ g/ml 抗CD44 mAbとともに24時間培養した1人の患者からの細胞の相対生存率を表す。生存細胞パーセントを、対照mAbで処理した細胞の生存率に正規化した。線は、各群ごとに、抗CD44 mAbで処理した細胞の中央値または生存率を示す。スチューデントt検定を用いて統計的優位性を決定した。

## 【0186】

わずか10  $\mu$ g/mlのRG7356が、高い直接殺細胞効果を示し、それは、アポトーシス促進活性を誘導しない同様の用量のリツキシマブと比較して明らかに優れていた(図10A)。しかしながら、高い用量のこのRG7356で処理した正常B細胞の生存にはほとんど影響が観察されなかったことから、この抗CD44 mAbは、正常B細胞に対して比較的安全であることが示唆される。さらに、抗CD44 mAbによるアポトーシス性殺細胞は、IgGの架橋を必要としないため、抗CD44 mAbによって誘導される直接細胞死誘導の様式は、いわゆるII型CD20 mAbの様式に類似する。

10

## 【0187】

II型CD20 mAbは、I型mAbと比較して、CDC活性を媒介する能力の低さによって特徴付けられるが、それらのB細胞枯渇活性に関してはI型mAbよりも優れていることが証明されている(Mossner et al. Blood 2010, 115:4393-4402; Beers et al. Blood 2008, 112:4170-4177)。これに関連して、抗CD44 mAbも同様にCDC活性が欠落していることは興味深い。

20

## 【0188】

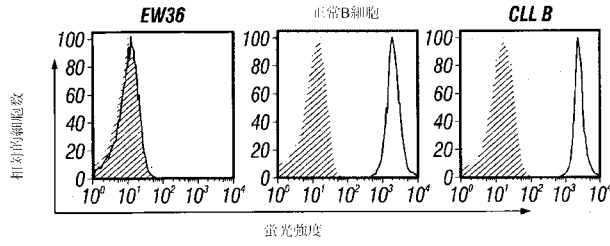
図10Aは、抗CD44 mAb、リツキシマブ、または抗体(10  $\mu$ g/ml)で24時間インキュベートしたCLL試料(n=4)を示す。CLL細胞を採取し、DiOC6/PIで染色し、フローサイトメトリーにより分析した。示されるデータは、DiOC6 + PI - 生存細胞のパーセントを表している。Pは、ダネットの多重比較検定を用いて分析した差の統計的有意性を意味する。図10Bは、CLL細胞に対するmAb処理の表現型分析を表す。細胞培養培地中で、50  $\mu$ g/mlの濃度の抗CD44、リツキシマブ、またはヒトIgG対照抗体とともに37°Cで原発性CLL細胞をインキュベートし、指定された時点で顕微鏡写真を記録した(20 $\times$ 位相差対物レンズ)。

30

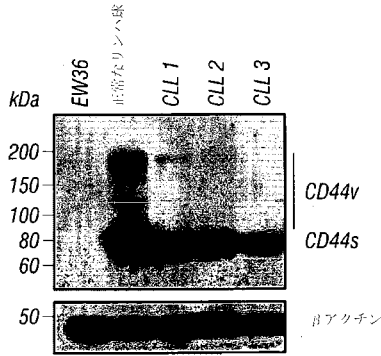
## 【0189】

抗CD44 mAbでインキュベーションした後の急速な同型凝集(図10B)は、抗CD44 mAbが、II型mAbと見なされてもよく、非常に効果的な直接殺細胞と関連しているという証拠を提供する(Alduaij et al. Blood 2011, 117:4519-4529)。

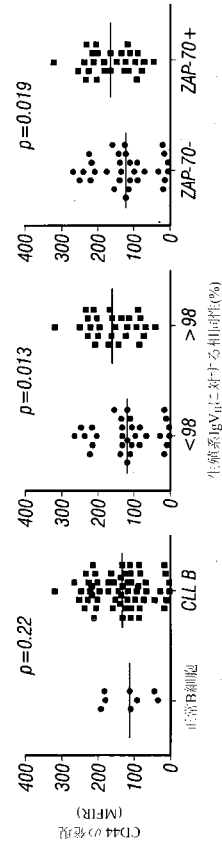
【 図 1 A 】



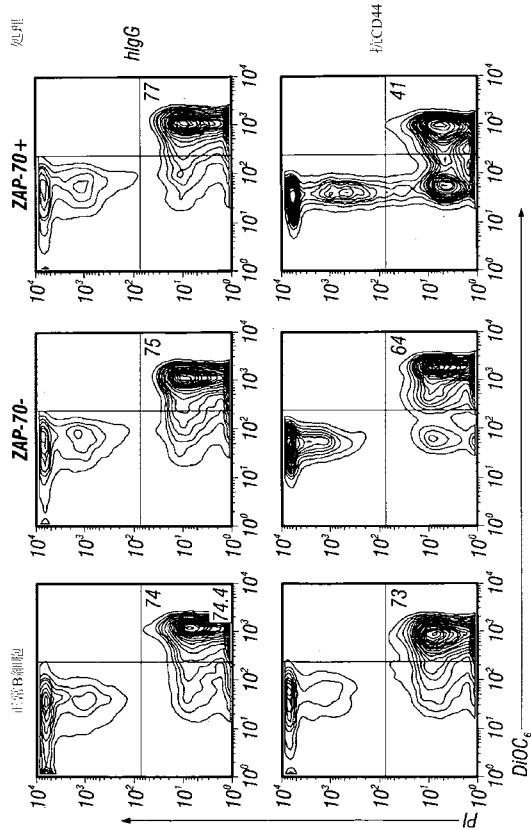
【 図 1 B 】



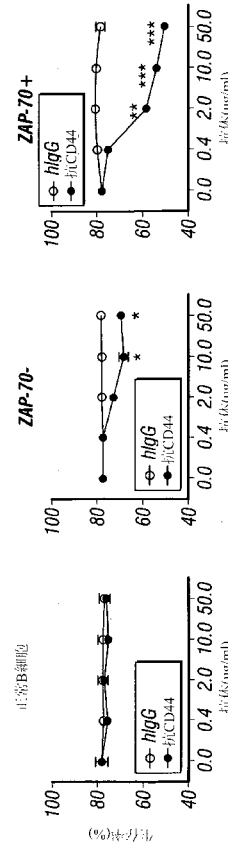
【 図 1 C 】



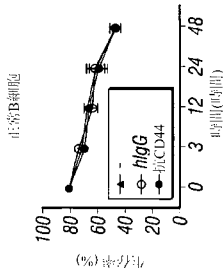
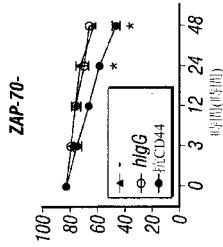
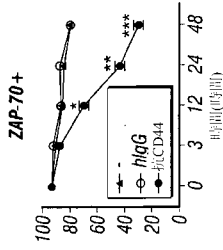
【 図 2 A 】



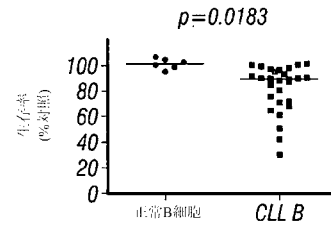
【 図 2 B 】



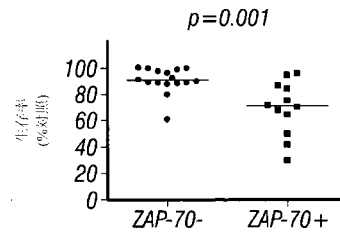
【 図 2 C 】



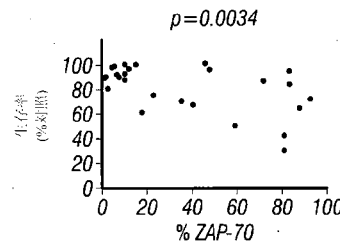
【 図 2 D 】



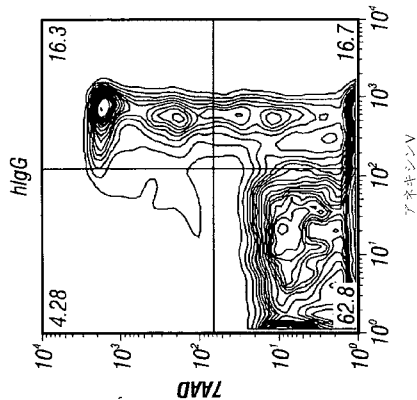
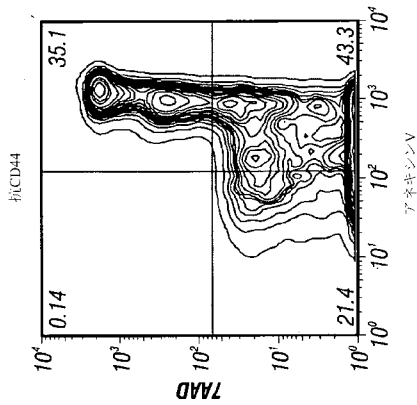
【 図 2 E 】



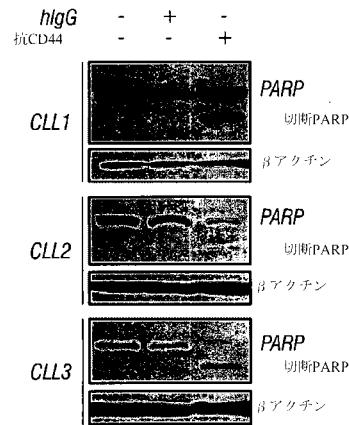
【 図 2 F 】



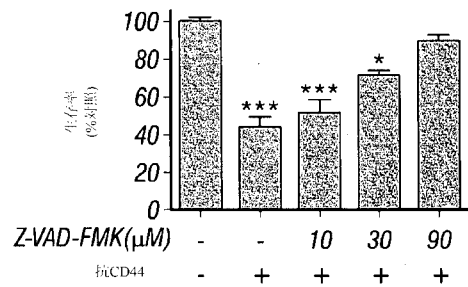
【 図 3 A 】



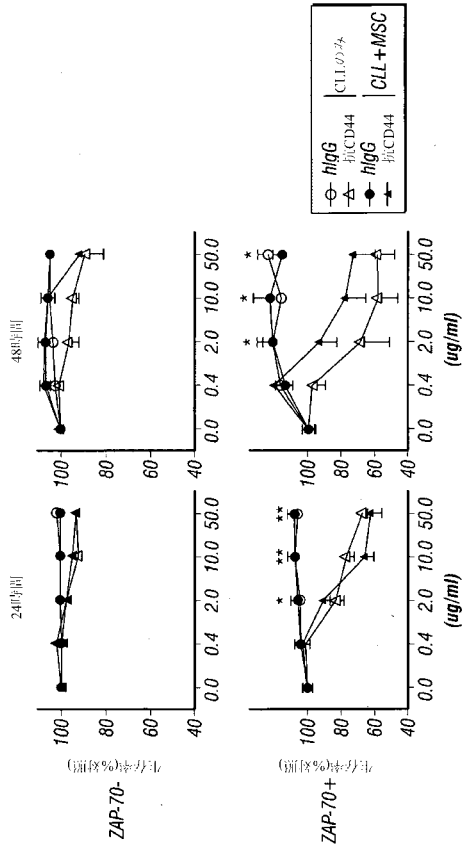
【 図 3 B 】



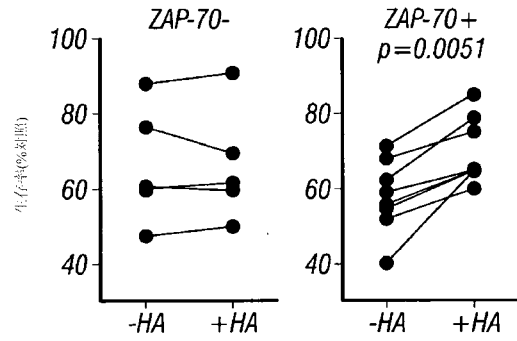
【 図 3 C 】



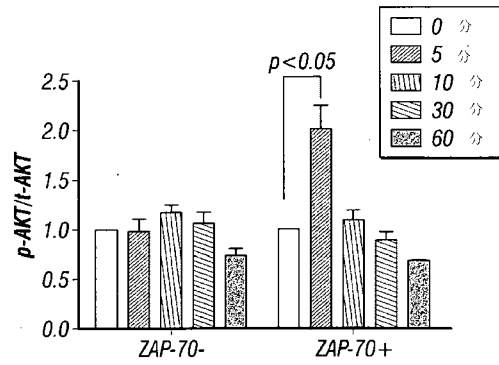
【 図 4 】



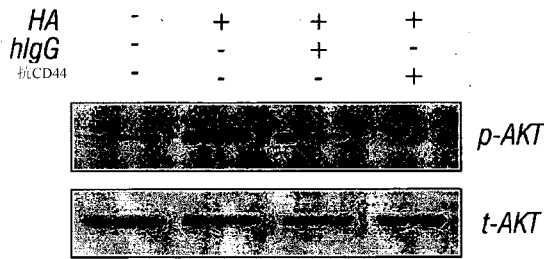
【 図 5 A 】



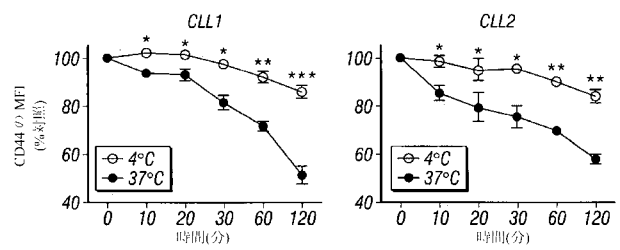
【 図 5 B 】



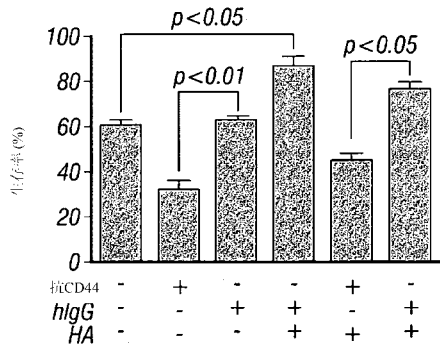
【 図 5 C 】



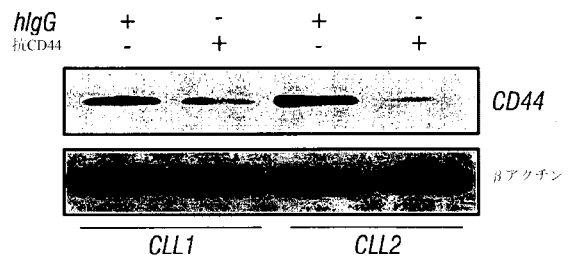
【 図 6 A 】



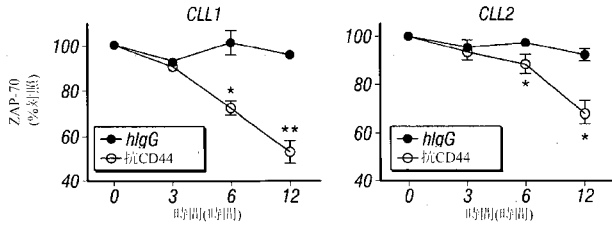
【 図 5 D 】



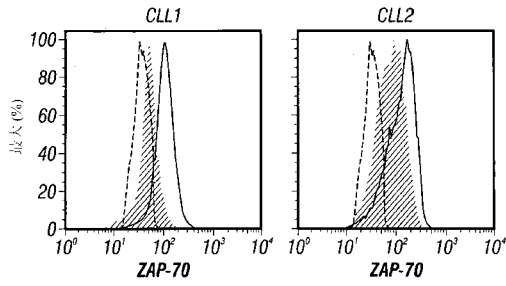
【 図 6 B 】



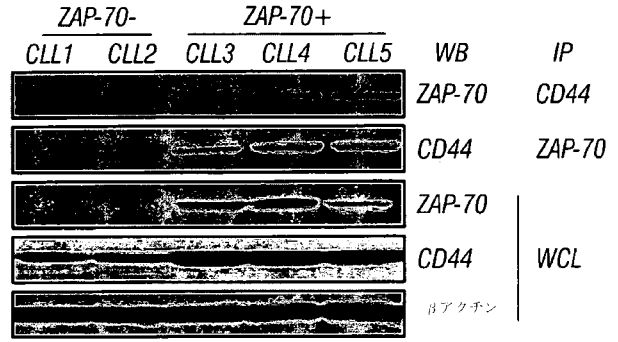
【 図 6 C 】



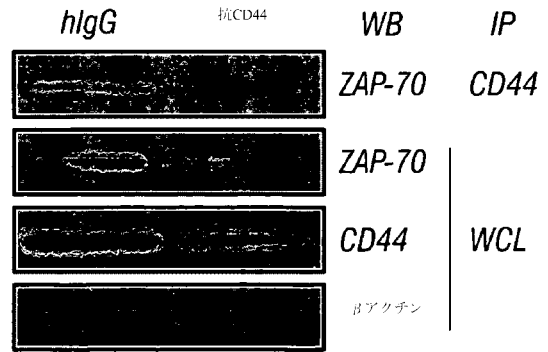
【 図 6 D 】



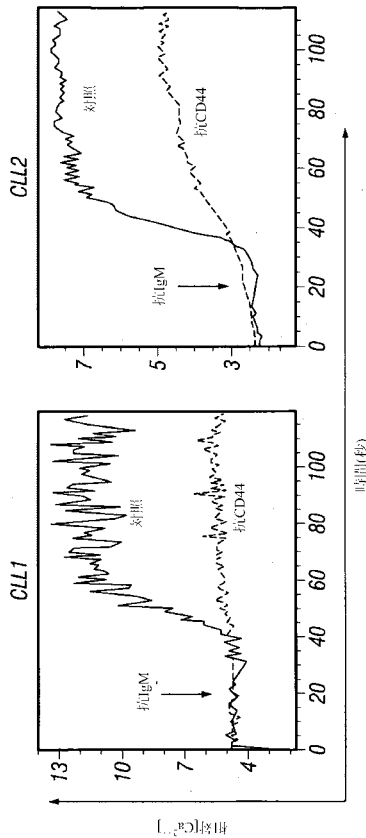
【 図 6 E 】



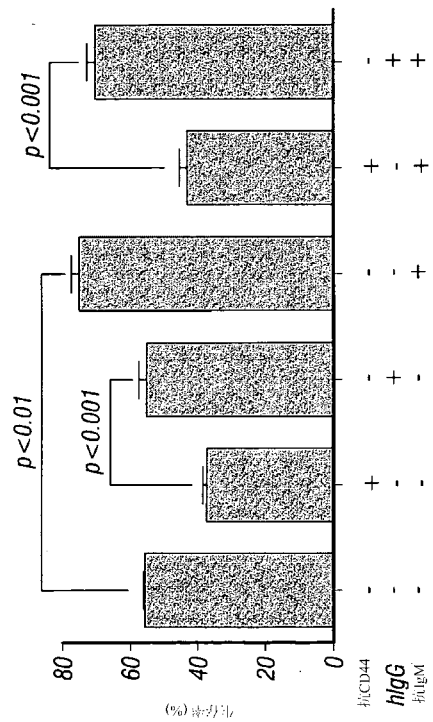
【 図 6 F 】



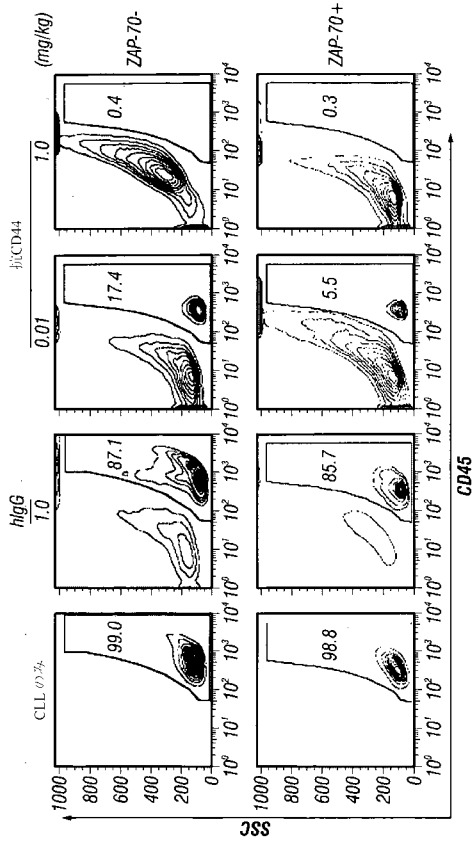
【 図 6 G 】



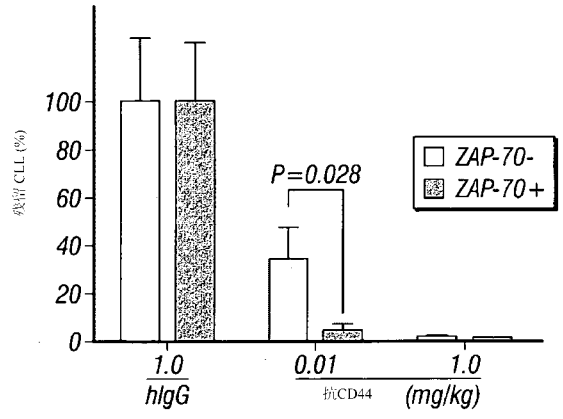
【 図 6 H 】



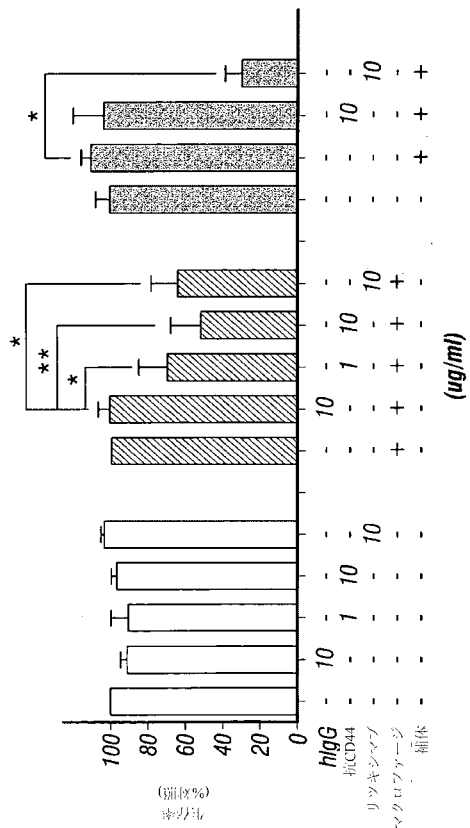
【 図 7 A 】



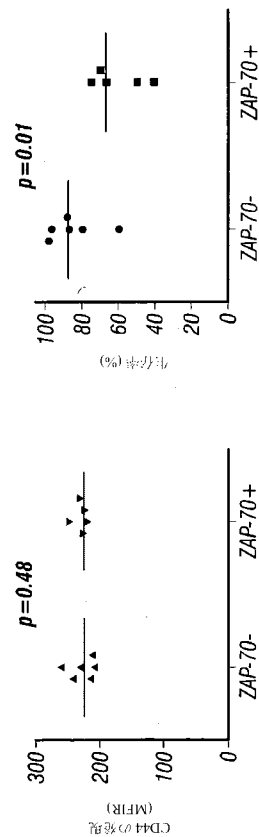
【 図 7 B 】



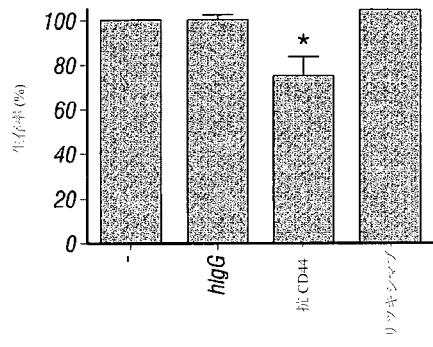
【 図 8 】



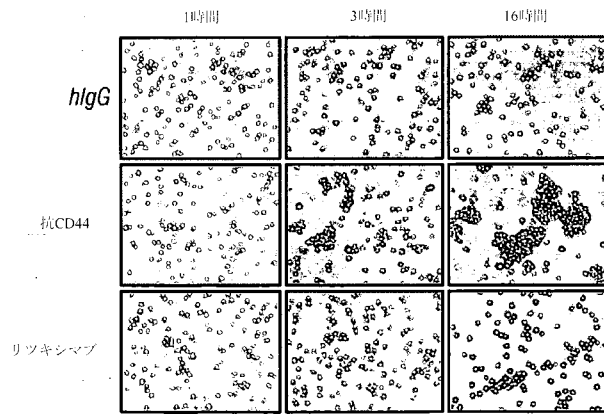
【 図 9 】



【図10A】



【図10B】



## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

|   |
|---|
| International application No<br>PCT/US2012/062266 |
|---|

|  |   |  |
|--|---|--|
| <b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>   |   |  |
| INV. C07K16/28   | A61P35/02   | A61P35/00 A61K39/395   |
| ADD.   |   |  |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC  |   |  |
| <b>B. FIELDS SEARCHED</b>  |   |  |
| Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)<br>C07K  |   |  |
| 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)<br>EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE   |   |  |
| <b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>  |   |  |
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.  |
| X  | WO 2008/109992 A1 (ARIUS RES INC [CA];<br>YOUNG DAVID S F [CA]; SAYEGH DAAD [CA];<br>FAN SHEUNG) 18 September 2008 (2008-09-18) | 1-11   |
| Y  | abstract<br>page 21, line 27 - page 22, line 2<br>page 23, lines 13-16<br>page 28, lines 1-15<br>claim 17                       | 12-25  |
| X  | WO 2008/144890 A1 (ARIUS RES INC [CA])<br>4 December 2008 (2008-12-04)  | 1-11   |
| Y  | abstract<br>page 28, line 26 - page 29, line 23<br>claims 38,39   | 12-25  |
|  | -----<br>-/--   |  |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.  |   |  |
| * Special categories of cited documents :  |   |  |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance<br>*E* earlier application or patent but published on or after the international filing date<br>*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)<br>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means<br>*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<br>*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<br>*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<br>*&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search<br><br>11 January 2013   |   | Date of mailing of the international search report<br><br>01/02/2013   |
| Name and mailing address of the ISA/<br>European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2<br>NL - 2280 HV Rijswijk<br>Tel. (+31-70) 340-2040,<br>Fax: (+31-70) 340-3016   |   | Authorized officer<br><br>Irion, Andrea  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/062266

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |  |                         |
|--|--|-------------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No.   |
| X  | WO 2011/095498 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; UNIV MIAMI [US]; DA CRUZ LUIS A G [CA]; FRANZM) 11 August 2011 (2011-08-11)   | 1-11                    |
| Y  | abstract<br>page 23, lines 13-34<br>page 34, line 32 - page 35, line 2<br>page 32, lines 7-16  | 12-25                   |
| X  | -----<br>MCCONKEY FORTUNATA ET AL: "Chimerized functional anti-CD44 monoclonal antibody, ARH460-16-2, is more apogenic and has greater in vivo efficacy", AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 47, 1 April 2006 (2006-04-01), page 152, XP009166080, ISSN: 0197-016X                          | 1-8,11                  |
| Y  | abstract   | 9,10,<br>12-25          |
| X  | -----<br>MCCONKEY FORTUNATA ET AL: "Functional monoclonal antibody, ARH460-16-2, inhibits tumor growth and prolongs survival by inducing apoptosis through CD44", AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 46, 1 April 2005 (2005-04-01), page 416, XP009166086, ISSN: 0197-016X                  | 1-8,11                  |
| Y  | abstract   | 9,10,<br>12-25          |
| X  | -----<br>DA CRUZ LUIS A G ET AL: "Anti-CD44 antibody, ARH460-16-2, binds to human AML CD34+CD38-cancer stem cells and demonstrates anti-tumor activity in an AML xenograft model", AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 49, 1 April 2008 (2008-04-01), page 945, XP009166090, ISSN: 0197-016X | 1-8,<br>11-14,<br>16-23 |
| Y  | abstract   | 9,10,15                 |
|  | -----<br>-/--  |                         |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/062266

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                         |
|--|---|-------------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |
| X  | DA CRUZ LUIS A G ET AL: "Preclinical development of huARH460-16-2, a humanized antibody to the CD44 cancer stem cell target",<br>AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH. PROCEEDINGS OF THE ANNUAL MEETING, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US,<br>vol. 49, 1 April 2008 (2008-04-01), pages 944-945, XP009166093,<br>ISSN: 0197-016X | 1-8,11                  |
| Y  | abstract  | 9,10,<br>12-25          |
| X  | -----<br>DEONARAIN MAHENDRA P ET AL: "Antibodies targeting cancer stem cells A new paradigm in immunotherapy?",<br>MABS,<br>vol. 1, no. 1, January 2009 (2009-01),<br>pages 12-25, XP002690109,<br>ISSN: 1942-0862  | 1-8,<br>11-14,<br>16-23 |
| Y  | table 1<br>page 17, right-hand column, paragraph 1 -<br>page 18, left-hand column, paragraph 3  | 9,10,15,<br>24,25       |
| X  | -----<br>ZÖLLER MARGOT: "CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule?",<br>NATURE REVIEWS. CANCER APR 2011,<br>vol. 11, no. 4, April 2011 (2011-04),<br>pages 254-267, XP002690110,<br>ISSN: 1474-1768  | 1-8,<br>11-14,<br>16-23 |
| Y  | abstract<br>page 255, right-hand column, paragraph 3<br>page 263, left-hand column, paragraph 1   | 9,10,15,<br>24,25       |
| X  | -----<br>MISAGHIAN N ET AL: "Targeting the leukemic stem cell: the Holy Grail of leukemia therapy",<br>LEUKEMIA (BASINGSTOKE),<br>vol. 23, no. 1, January 2009 (2009-01),<br>pages 25-42, XP002690111,<br>ISSN: 0887-6924   | 1-8,<br>11-14,<br>16-23 |
| Y  | abstract<br>page 27, left-hand column, paragraph 2<br>page 30, left-hand column, paragraph 5<br>page 34, right-hand column, paragraph 1   | 9,10,15,<br>24,25       |
|  | -----<br>-/--   |                         |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/062266

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                         |
|--|---|-------------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No.   |
| X  | JIN LIQING ET AL: "Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells",<br>NATURE MEDICINE, NATURE PUBLISHING GROUP, NEW YORK, NY, US,<br>vol. 12, no. 10,<br>1 October 2006 (2006-10-01), pages 1167-1174, XP002457833,<br>ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/NM1483        | 1-8,<br>11-14,<br>16-23 |
| Y  | the whole document  | 9,10,15,<br>24,25       |
| X  | -----<br>PEDERSEN IRENE M ET AL: "Protection of CLL B cells by a follicular dendritic cell line is dependent on induction of Mcl-1",<br>BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US,<br>vol. 100, no. 5,<br>1 September 2002 (2002-09-01), pages 1795-1801, XP009166012,<br>ISSN: 0006-4971 | 1-8,<br>11-25           |
| Y  | abstract<br>page 1798, left-hand column, paragraph 3<br>page 1799, left-hand column, paragraph 5  | 9,10                    |
| X  | -----<br>LIU JIANING ET AL: "CD44 and hematologic malignancies",<br>CELLULAR & MOLECULAR IMMUNOLOGY, CHINESE SOCIETY OF IMMUNOLOGY, CH,<br>vol. 3, no. 5, 1 October 2006 (2006-10-01), pages 359-365, XP002587092,<br>ISSN: 1672-7681   | 1-8,<br>11-14,<br>16-23 |
| Y  | table 1<br>page 361, left-hand column, paragraph 2<br>page 361, right-hand column, paragraph 3 -<br>page 362, left-hand column, paragraph 1<br>page 362, right-hand column, paragraph 3 -<br>page 363, left-hand column, paragraph 3  | 9,10,15,<br>24,25       |
| X  | -----<br>EP 1 532 984 A1 (INST NAT SANTE ET DE LA RECH ME [FR]; UNIV HEALTH NETWORK [CA])<br>25 May 2005 (2005-05-25)   | 1-8,<br>11-14,<br>16-23 |
| Y  | abstract<br>paragraph [0019]  | 9,10,15,<br>24,25       |
| X  | -----<br>WO 2005/046597 A2 (BRIGHAM & WOMENS HOSPITAL [US]; SACKSTEIN ROBERT [US])<br>26 May 2005 (2005-05-26)  | 1-8,11                  |
| Y  | page 17, paragraph 3<br>page 58, paragraph 2-3  | 9,10,<br>12-25          |
| X  | -----<br>WO 2010/058396 A1 (YISSUM RES DEV CO [IL]; NAOR DAVID [IL]; NEDVETZKI SHLOMO [IL]; GOLAN)<br>27 May 2010 (2010-05-27)  | 1-8,11                  |
| Y  | page 24, lines 1-5  | 9,10,<br>12-25          |
|  | -----<br>-/--   |                         |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/US2012/062266

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT |   |                       |
|--|---|-----------------------|
| Category*  | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages  | Relevant to claim No. |
| X,P  | ZHANG SUPING ET AL: "A Monoclonal Antibody Specifically Targeting CD44 Inhibits B-Cell Chronic Lymphocytic Leukemia Cell Survival In Vitro and In Vivo",<br>BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US,<br>vol. 118, no. 21,<br>1 November 2011 (2011-11-01), page 422,<br>XP009166013,<br>ISSN: 0006-4971<br>[retrieved on 2011-11-18]<br>abstract<br>----- | 1-25                  |
| X,P  | WEIGAND STEFAN ET AL: "Global Quantitative Phosphoproteome Analysis of Human Tumor Xenografts Treated with a CD44 Antagonist",<br>CANCER RESEARCH,<br>vol. 72, no. 17, September 2012 (2012-09),<br>pages 4329-4339, XP002690112,<br>example 4<br>page 6, paragraph 4<br>-----  | 1-12                  |

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2012/062266

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2008109992 A1                       | 18-09-2008       | CA 2679050 A1           | 18-09-2008       |
|  |                  | EP 2117593 A1           | 18-11-2009       |
|  |                  | JP 2010521426 A         | 24-06-2010       |
|  |                  | SG 178787 A1            | 29-03-2012       |
|  |                  | US 2007248538 A1        | 25-10-2007       |
|  |                  | US 2012020880 A1        | 26-01-2012       |
|  |                  | WO 2008109992 A1        | 18-09-2008       |
|  |                  | -----                   |                  |
| WO 2008144890 A1                       | 04-12-2008       | AU 2008255527 A1        | 04-12-2008       |
|  |                  | CA 2687583 A1           | 04-12-2008       |
|  |                  | CN 101687930 A          | 31-03-2010       |
|  |                  | CO 6241160 A2           | 20-01-2011       |
|  |                  | CR 11125 A              | 29-12-2009       |
|  |                  | EC SP099769 A           | 28-12-2009       |
|  |                  | EP 2164874 A1           | 24-03-2010       |
|  |                  | JP 2010529955 A         | 02-09-2010       |
|  |                  | KR 20100006163 A        | 18-01-2010       |
|  |                  | MA 31662 B1             | 01-09-2010       |
|  |                  | NZ 581507 A             | 30-03-2012       |
|  |                  | NZ 597067 A             | 31-08-2012       |
|  |                  | RU 2009148600 A         | 10-07-2011       |
|  |                  | US 2008219919 A1        | 11-09-2008       |
|  |                  | US 2012201751 A1        | 09-08-2012       |
|  |                  | WO 2008144890 A1        | 04-12-2008       |
| ZA 200908344 A                         | 25-08-2010       |                         |                  |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| WO 2011095498 A1                       | 11-08-2011       | AU 2011212485 A1        | 19-07-2012       |
|  |                  | CA 2786337 A1           | 11-08-2011       |
|  |                  | CN 102741292 A          | 17-10-2012       |
|  |                  | EP 2531527 A1           | 12-12-2012       |
|  |                  | SG 182704 A1            | 30-08-2012       |
|  |                  | WO 2011095498 A1        | 11-08-2011       |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| EP 1532984 A1                          | 25-05-2005       | AT 480565 T             | 15-09-2010       |
|  |                  | AU 2004290918 A1        | 02-06-2005       |
|  |                  | CA 2484459 A1           | 19-05-2005       |
|  |                  | CA 2546566 A1           | 02-06-2005       |
|  |                  | CN 1898268 A            | 17-01-2007       |
|  |                  | EP 1532984 A1           | 25-05-2005       |
|  |                  | EP 1692183 A2           | 23-08-2006       |
|  |                  | EP 2275444 A1           | 19-01-2011       |
|  |                  | JP 2007513610 A         | 31-05-2007       |
|  |                  | KR 20060126659 A        | 08-12-2006       |
|  |                  | US 2005147606 A1        | 07-07-2005       |
|  |                  | US 2007184051 A1        | 09-08-2007       |
|  |                  | US 2007237761 A1        | 11-10-2007       |
|  |                  | US 2010040540 A1        | 18-02-2010       |
| WO 2005049082 A2                       | 02-06-2005       |                         |                  |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| WO 2005046597 A2                       | 26-05-2005       | AU 2004289265 A1        | 26-05-2005       |
|  |                  | CA 2544598 A1           | 26-05-2005       |
|  |                  | EP 1689781 A2           | 16-08-2006       |
|  |                  | JP 2007510735 A         | 26-04-2007       |
|  |                  | US 2005214283 A1        | 29-09-2005       |
| WO 2005046597 A2                       | 26-05-2005       |                         |                  |
| -----                                  |                  |                         |                  |
| WO 2010058396 A1                       | 27-05-2010       | NONE                    |                  |
| -----                                  |                  |                         |                  |

## フロントページの続き

| (51)Int.Cl.                     |  | F I     |        | テーマコード(参考) |
|---------------------------------|--|---------|--------|------------|
| <b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>  |  | A 6 1 P | 35/02  |            |
| <b>G 0 1 N 33/53 (2006.01)</b>  |  | A 6 1 K | 39/395 | N          |
| <b>G 0 1 N 33/574 (2006.01)</b> |  | G 0 1 N | 33/53  | D          |
|                                 |  | G 0 1 N | 33/574 | A          |

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

(72)発明者 キップス, トーマス ジェー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア, サンディエゴ, カミント メンディオラ 1 3 1 7 5

(72)発明者 チャン, スーピン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 1 2 2, サンディエゴ, コスタ ヴェルデ ブールヴァード 8 9 5 0 アパートメント 4 1 2 7

(72)発明者 ウー, クリティーナ シー.  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 0 2 6, エスコンディード, ダグラストン グレン 2 3 9 2

Fターム(参考) 4B024 AA01 BA53 CA04 DA06 EA04  
4B064 AG27 CA02 CA19 DA01  
4C085 AA13 AA14 DD21 DD62 EE01 GG01  
4H045 AA11 DA76 EA20 FA74

|                |  |         |            |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译)        | CD44单克隆抗体用于治疗B细胞慢性淋巴细胞白血病和其他血液恶性肿瘤   |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">JP2014534221A</a>  | 公开(公告)日 | 2014-12-18 |
| 申请号            | JP2014539084   | 申请日     | 2012-10-26 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 加利福尼亚大学董事会   |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 加州大学董事会  |         |            |
| [标]发明人         | キップストーマスジェー<br>チャンスピー<br>ウークリティーナシー  |         |            |
| 发明人            | キップス, トーマス ジェー.<br>チャン, スーピン<br>ウー, クリティーナ シー.   |         |            |
| IPC分类号         | C07K16/28 C12N15/09 C12N15/00 C12P21/08 A61K39/395 A61P35/02 G01N33/53 G01N33/574  |         |            |
| CPC分类号         | C07K16/2884 A61K2039/505 C07K2317/24 C07K2317/73 C07K2317/77 G01N33/57426 G01N33/57492   |         |            |
| FI分类号          | C07K16/28 C12N15/00.A C12N15/00.ZNA C12P21/08 A61K39/395.D A61P35/02 A61K39/395.N G01N33/53.D G01N33/574.A   |         |            |
| F-TERM分类号      | 4B024/AA01 4B024/BA53 4B024/CA04 4B024/DA06 4B024/EA04 4B064/AG27 4B064/CA02 4B064/CA19 4B064/DA01 4C085/AA13 4C085/AA14 4C085/DD21 4C085/DD62 4C085/EE01 4C085/GG01 4H045/AA11 4H045/DA76 4H045/EA20 4H045/FA74 |         |            |
| 优先权            | 61/551852 2011-10-26 US  |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a>  |         |            |

摘要(译)

提供了包含CD44特异性抗体的组合物。这些抗体特异性结合血液恶性肿瘤细胞。还提供了使用CD44抗体靶向表达CD44的细胞用于治疗 and 诊断目的的方法。(图1A, 图1B, 图1C)

