



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 A61K 39/395, C07K 16/30, 16/46 // C12N 15/13, C12P 21/08, (C12P 21/08, C12R 1:91)</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO98/35698</p> <p>(43) 国際公開日 1998年8月20日(20.08.98)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/00568</p> <p>(22) 国際出願日 1998年2月12日(12.02.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/41410 1997年2月12日(12.02.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 中外製薬株式会社 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒115-8543 東京都北区浮間5丁目5番1号 Tokyo, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および</p> <p>(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 小石原保夫(KOISHIHARA, Yasuo)[JP/JP] 吉村康史(YOSHIMURA, Yasushi)[JP/JP] 〒412-8513 静岡県御殿場市駒門1丁目135番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 石田 敬, 外(ISHIDA, Takashi et al.) 〒105-8423 東京都港区虎ノ門三丁目5番1号 虎ノ門37森ビル 青和特許法律事務所 Tokyo, (JP)</p>	<p>(81) 指定国 AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, GW, HU, ID, IL, IS, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	
<p>(54) Title: <b>REMEDIES FOR LYMPHOCYTIC TUMORS</b></p> <p>(54) 発明の名称 リンパ球系腫瘍の治療剤</p> <p>(57) Abstract Remedies for lymphocytic tumors excluding myeloma which contain as the active ingredient an antibody binding specifically to a protein having the amino acid sequence represented by SEQ ID NO:1 and having a cytotoxic activity,</p>		

(57) 要約

配列番号：1 に示すアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性を有する抗体を有効成分として含有する、リンパ球系腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード（参考情報）

AL	アルバニア	FI	フィンランド	LT	リトアニア	SN	セネガル
AM	アルメニア	FR	フランス	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
AT	オーストリア	GA	ガボン	LV	ラトヴィア	TD	チャド
AZ	アゼルバイジャン	GB	英国	MC	モナコ	TG	トーゴ
BB	バルバドス	GE	ジョージア	MD	モルドバ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GM	ギニア	MK	マケドニア共和国	TR	トルコ
BJ	ベナン	GN	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	GW	ギニア・ビサオ	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	GR	ギリシャ	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CA	カナダ	HU	ハンガリー	MW	モザンビーク	US	米国
CF	中央アフリカ共和国	ID	インドネシア	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IE	アイルランド	NE	ニジェール	VN	ベトナム
CH	スイス	IL	イスラエル	NL	オランダ	VU	ヴニエラ
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NO	ノルウェー	YU	ユーゴスラヴィア
CM	カメルーン	IT	イタリア	NZ	ニュージーランド	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	PL	ポーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PT	ポルトガル		
CY	キプロス	KG	韓国	RO	ルーマニア		
CZ	チェコスロヴァキア	KR	韓国	RU	ロシア		
DE	ドイツ	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
DK	デンマーク	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		
EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール		
ES	スペイン	LR	リベリア	SI	スロベニア		
		LS	レソト	SK	スロバキア		
				SL	シエラレオネ		

## 明 細 書

## リンパ球系腫瘍の治療剤

## 技術分野

本発明は、リンパ球系腫瘍に発現される蛋白質に特異的に結合する抗体を有効成分として含有するリンパ球系腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤に関する。また、本発明は、T細胞腫瘍またはB細胞腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤に関する。さらに、本発明は、リンパ球系腫瘍に発現される蛋白質に特異的に結合し、細胞障害活性を有する抗体に関する。

## 背景技術

リンパ球系細胞は、生体において主に免疫を担当する細胞である。リンパ球系細胞は全て同じ血液幹細胞に由来し、骨髄中あるいはその他の器官で様々な分化誘導因子、または増殖因子の作用を受けて分化を繰り返した後、末梢血中へ放出される。この分化の違いによりリンパ球系細胞はB細胞とT細胞に大別される。B細胞は抗体産生能を、T細胞は抗原提示能、細胞障害能その他様々な能力を有していると考えられている。この分化段階で何らかの原因により腫瘍化し、骨髄中、リンパ組織中、末梢血中等で異常増殖するようになったものが、リンパ球系腫瘍である。

近年の新しい技術導入、特に細胞表面の分化抗原に対するモノクローナル抗体を用いた技術の進歩により、リンパ球系細胞の由来や分化段階の同定が可能になった。それに伴い、リンパ球系腫瘍についてもその腫瘍細胞の由来がT細胞なのかB細胞なのかだけでなく、成熟度の同定までもが可能になった。

リンパ球系腫瘍はその腫瘍細胞の起源あるいは成熟度により B 細胞腫瘍および T 細胞腫瘍に大別される。B 細胞腫瘍は腫瘍細胞の成熟度によって、急性 B リンパ性白血病 (B-ALL)、慢性 B リンパ性白血病 (B-CLL)、pre-B リンパ腫、Burkitt リンパ腫、濾胞性リンパ腫、濾胞外套リンパ腫、びまん性リンパ腫等に分類される。また、T 細胞腫瘍はその腫瘍細胞の成熟度によって、急性 T リンパ性白血病 (T-ALL)、慢性 T リンパ性白血病 (T-CLL)、成人 T 細胞白血病 (ATL)、非 ATL 末梢性 T リンパ腫 (PNTL) 等に分類される (図解臨床〔癌〕シリーズ No.17 白血病・リンパ腫、杉村隆ら、MEDICAL VIEW社、1987、B 細胞腫瘍、高月清、西村書店、1991)。

近年の医療技術の進歩にも関わらず、リンパ球系腫瘍の治療に関しては未だ不十分であると言わざるを得ない。例えば、急性リンパ性白血病 (ALL) の治癒率は 20% 以下である。また、リンパ腫の場合、B リンパ腫は多剤併用療法の進歩により比較的治癒率は高いとはいうものの、進行期での治癒率は 50% 程度である。さらに T リンパ腫はより難治性であり、治癒率は約 30%、成人 T 細胞白血病 (ATL) に至っては 10% にも満たないのが現状である。

一方、Goto, T. らは、ヒト骨髄腫細胞をマウスに免疫して得られたモノクローナル抗体 (抗 HM1.24 抗体) を報告している (Blood (1994) 84, 1922-1930)。ヒト骨髄腫細胞を移植したマウスに抗 HM1.24 抗体を投与すると、この抗体が腫瘍組織に特異的に集積したこと (小阪昌明ら、日本臨床 (1995) 53, 627-635) から、抗 HM1.24 抗体はラジオアイソトープ標識による腫瘍局在の診断や、ラジオイムノセラピーなどのミサイル療法に応用することが可能であることが示唆されている。しかし、抗 HM1.24 抗体が他のリンパ球系腫瘍の治療に有用であることは知られていない。

## 発明の開示

現在行われているリンパ球系腫瘍の治療には、種々の化学療法、X線療法、骨髄移植等が挙げられるが、上記のごとく、いずれの治療法も未だ完全ではなく、リンパ球系腫瘍を寛解に導き、患者の生存期間を延長させる画期的な治療剤あるいは治療法が待たれている。

従って、本発明の目的は、骨髄腫を除くリンパ球系腫瘍に対する新しい治療剤を提供することである。

本発明者らは、かかる治療剤を提供すべく、抗HM1.24抗体（Goto, T.ら Blood (1994) 84. 1922-1930）を用いて、FCM（フローサイトメトリー）解析、ADCC活性、CDC活性のような細胞障害活性の測定等のイン・ビトロでの研究、イン・ビボでの抗腫瘍効果の検討、さらには抗HM1.24抗体が特異的に結合する抗原蛋白質単離の研究を重ねた結果、抗HM1.24抗体が認識する抗原タンパク質がリンパ球系腫瘍に発現していること、および抗HM1.24抗体がリンパ球系腫瘍に対し抗腫瘍効果を有することを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性を有する抗体を有効成分として含有する、リンパ球系腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤を提供する。

また、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性を有する抗体を有効成分として含有する、T細胞腫瘍治療剤、またはB細胞腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤を提供する。

また、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性を有するモノクローナル抗

体を有効成分として含有する、T細胞腫瘍治療剤、またはB細胞腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤を提供する。

また、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性としてADCC活性またはCDC活性を有する抗体を有効成分として含有する、T細胞腫瘍治療剤、またはB細胞腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤を提供する。

また、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性を有し、定常領域としてヒト抗体のC $\gamma$ を有する抗体を有効成分として含有する、T細胞腫瘍治療剤、またはB細胞腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤を提供する。

また、本発明は配列番号1に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性を有するキメラ抗体またはヒト型化抗体を有効成分として含有する、T細胞腫瘍治療剤、またはB細胞腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤を提供する。

また、本発明は抗HM1.24抗体が認識するエピトープと特異的に結合する抗体を有効成分とする、T細胞腫瘍治療剤、またはB細胞腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤を提供する。

また、本発明は抗HM1.24抗体を有効成分として含有するT細胞腫瘍治療剤、またはB細胞腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤を提供する。

さらに、本発明はリンパ球系腫瘍に発現される蛋白質に特異的に結合し、細胞障害活性を有する抗体に関する。

#### 図面の簡単な説明

図1は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図2は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接

法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図3は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図4は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図5は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図6は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図7は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図8は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図9は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すB細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図10は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間接法により図に示すT細胞株をFCM解析したときのヒストグラムを示す。

図11は、抗HM1.24抗体およびコントロールマウスIgG2aで、間

接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 1 2 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 1 3 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 1 4 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 1 5 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 1 6 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 1 7 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 1 8 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 1 9 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す T 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 2 0 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間



接法により図に示す非 T 非 B 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 2 1 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す非 T 非 B 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 2 2 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す非 T 非 B 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 2 3 は、抗 HM1.24 抗体およびコントロールマウス IgG2a で、間接法により図に示す非 T 非 B 細胞株を FCM 解析したときのヒストグラムを示す。

図 2 4 は、抗 HM1.24 抗体が T 細胞腫瘍株である CCRF-CEM, CCRF-HSB-2 および HPB-MLT に対して、濃度依存的に細胞障害を引き起こしていることを示すグラフである。

図 2 5 は、抗 HM1.24 抗体が B 細胞腫瘍株である EB-3, MC116 および CCRF-SB に対して、濃度依存的に細胞障害を引き起こしていることを示すグラフである。

図 2 6 は、ヒトリンパ球系腫瘍移植マウスにおいて、抗 HM1.24 抗体投与群は、コントロールマウス IgG2a 投与群に比べ、腫瘍体積の増加が抑制されていることを示すグラフである。

図 2 7 は、ヒトリンパ球系腫瘍移植マウスにおいて、抗 HM1.24 抗体投与群は、コントロールマウス IgG2a 投与群に比べ、生存期間が延長していることを示すグラフである。

## 発明の実施の形態

### 1. 抗体の作製

#### 1-1. ハイブリドーマの作製

本発明で使用される抗体を産生するハイブリドーマは、基本的には公知技術を使用し、以下のようにして作製できる。すなわち、HM1.24抗原蛋白質やHM1.24抗原を発現する細胞を感作抗原として使用して、これを通常の免疫方法にしたがって免疫し、得られる免疫細胞を通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合させ、通常のスクリーニング法により、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって作製できる。

具体的には、モノクローナル抗体を作製するには次のようにすればよい。例えば、抗体取得の感作抗原であるHM1.24抗原発現細胞としては、ヒト多発性骨髄腫細胞株であるKPMM2（特開平7-236475）やKPC-32（Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400）を用いることができる。また、感作抗原として配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質、あるいは抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを使用することができる。

なお、感作抗原として使用される、配列番号1に示すアミノ酸配列を有する蛋白質のcDNAはpUC19ベクターのXbaI切断部位の間に挿入されて、プラスミドpRS38-pUC19として調製されている。このプラスミドpRS38-pUC19を含む大腸菌（*E. coli*）は、平成5年（1993年）10月5日付で工業技術院生命工学工業技術研究所に、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$ （pRS38-pUC19）として、受託番号FERM BP-4434としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている（特開平7-196694参照）。このプラスミドpRS38-pUC19に含まれるcDNA断片を用いて遺伝子工学的手法により、抗HM1.24抗体が認識するエピトープを含むペプチドまたはポリペプチドを作製することができる。

感作抗原で免疫される哺乳動物としては、特に限定されるものではないが、細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択す

るのが好ましく、一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター等が使用される。

感作抗原を動物に免疫するには、公知の方法にしたがって行われる。例えば、一般的方法として、感作抗原を哺乳動物の腹腔内または、皮下に注射することにより行われる。具体的には、感作抗原をPBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適量に希釈、懸濁したものを所望により通常のアジュバント、例えば、フロイント完全アジュバントを適量混合し、乳化後、哺乳動物に4-21日毎に数回投与するのが好ましい。また、感作抗原免疫時に適当な担体を使用することができる。

このように免疫し、血清中に所望の抗体レベルが上昇するのを確認した後に、哺乳動物から免疫細胞が取り出され、細胞融合に付される。細胞融合に付される好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が挙げられる。

前記免疫細胞と融合される他方の親細胞としての哺乳動物のミエローマ細胞は、すでに、公知の種々の細胞株、例えば、P3X63Ag8.653 (J. Immunol. (1979) 123: 1548-1550), P3X63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81: 1-7), NS-1 (Kohler, G. and Milstein, C. Eur. J. Immunol. (1976) 6: 511-519), MPC-11 (Margulies, D. H. et al., Cell (1976) 8: 405-415), SP2/0 (Shulman, M. et al., Nature (1978) 276: 269-270), FO (de St. Groth, S. F. et al., J. Immunol. Methods (1980) 35: 1-21), S194 (Trowbridge, I. S. J. Exp. Med. (1978) 148: 313-323), R210 (Galfré, G. et al., Nature (1979) 277: 131-133) 等が適宜使用される。

前記免疫細胞とミエローマ細胞の細胞融合は基本的には公知の方法、たとえば、ミルステインらの方法 (Kohler, G. and Milstein,

C., Methods Enzymol. (1981) 73: 3-46 ) 等に準じて行うことができる。

より具体的には、前記細胞融合は例えば、細胞融合促進剤の存在下に通常の栄養培養液中で実施される。融合促進剤としては例えば、ポリエチレングリコール (PEG)、センダイウィルス (HVJ) 等が使用され、更に所望により融合効率を高めるためにジメチルスルホキシド等の補助剤を添加使用することもできる。

免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は、例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1-10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用可能であり、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。

細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め、37°C程度に加温したPEG溶液、例えば、平均分子量1000-6000程度のPEG溶液を通常、30-60% (w/v) の濃度で添加し、混合することによって目的とする融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。続いて、適当な培養液を逐次添加し、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等を除去できる。

当該ハイブリドーマは、通常の実験培養液、例えば、HAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択される。当該HAT培養液での培養は、目的とするハイブリドーマ以外の細胞 (非融合細胞) が死滅するのに十分な時間、通常数日~数週間継続する。ついで、通常の実験希釈法を実施し、目的とする抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが行われる。

また、ヒト以外の動物に抗原を免疫して上記ハイブリドーマを得る他に、ヒトリンパ球をin vitroでHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞で感作し、感作リンパ球をヒトミエローマ細胞、例えばU266と融合させ、HM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞への結合活性を有する所望のヒト抗体を得ることもできる（特公平1-59878 参照）。さらに、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物に抗原となるHM1.24抗原またはHM1.24抗原発現細胞を投与し、前述の方法に従い所望のヒト抗体を取得してもよい（国際特許出願公開番号WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096, WO 96/33735参照）。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、通常の培養液中で継代培養することが可能であり、また、液体窒素中で長期保存することが可能である。

当該ハイブリドーマからモノクローナル抗体を取得するには、当該ハイブリドーマを通常の方法にしたがい培養し、その培養上清として得る方法、あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖させ、その腹水として得る方法などが採用される。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに適しており、一方、後者の方法は、抗体の大量生産に適している。

具体的には、抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマの作製は、Goto, T.らの方法（Blood（1994）84. 1922-1930）により行うことができる。工業技術院生命工学工業技術研究所（茨城県つくば市東1丁目1番3号）に、平成7年9月14日にFERM BP-5233としてブタペスト条約に基づき国際寄託された抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマをBALB/cマウス（日本クレア製）の腹腔内に注入して腹水を得、この腹水から抗HM1.24抗体を精製する方法や、本ハイブリドーマを適当な培地、例えば、10%ウシ胎児血清、5%BM-Condimed H1（Boehring

er Mannheim 製) 含有RPMI1640培地、ハイブリドーマSFM 培地 (GIBCO-BRL 製)、PFHM-II 培地 (GIBCO-BRL 製) 等で培養し、その培養上清から抗HM1.24抗体を精製する方法で行うことができる。

#### 1-2. 組換え型抗体

本発明では、モノクローナル抗体として、抗体遺伝子をハイブリドーマからクローニングし、適当なベクターに組み込んで、これを宿主に導入し、遺伝子組換え技術を用いて産生させた組換え型抗体を用いることができる (例えば、Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, Published in the United Kingdom by MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990 参照)。

具体的には、目的とする抗体を産生するハイブリドーマから、抗体の可変 (V) 領域をコードするmRNAを単離する。mRNAの単離は、公知の方法、例えば、グアニジン超遠心法 (Chirgwin, J. M. ら、Biochemistry (1979) 18, 5294-5299)、AGPC法 (Chomczynski, P. ら、Analytical Biochemistry, (1987) 162, 156-159) 等により全RNAを調製し、mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) 等を使用してmRNAを調製する。また、QuickPrep mRNA Purification Kit (Pharmacia 製) を用いることによりmRNAを直接調製することができる。

得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域のcDNAを合成する。cDNAの合成は、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit 等を用いて行うことができる。また、cDNAの合成および増幅を行うには5'-Ampli FINDER RACE Kit (Clontech製) およびPCRを用いた5'-RACE法 (Frohman, M. A. ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988) 85, 8998-9002; Belyavsky, A. ら、Nucleic Acids Res. (1989) 17, 2919-2932) を使用することができる。

る。得られたPCR産物から目的とするDNA断片を精製し、ベクターDNAと連結する。さらに、これより組換えベクターを作成し、大腸菌等に導入してコロニーを選択して所望の組換えベクターを調製する。目的とするDNAの塩基配列を公知の方法、例えば、デオキシ法により確認する。

目的とする抗体のV領域をコードするDNAが得られれば、これを所望の抗体定常領域(C領域)をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターへ組み込む。または、抗体のV領域をコードするDNAを、抗体C領域のDNAを含む発現ベクターへ組み込んでもよい。

本発明で使用される抗体を製造するには、後述のように抗体遺伝子を発現制御領域、例えば、エンハンサー、プロモーターの制御のもとで発現するよう発現ベクターに組み込む。次に、この発現ベクターにより宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させることができる。

### 1-3. 改変抗体

本発明では、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体、例えば、キメラ(Chimeric)抗体、ヒト型化(Humanized)抗体などを使用できる。これらの改変抗体は、既知の方法を用いて製造することができる。

キメラ抗体は、前記のようにして得た抗体V領域をコードするDNAをヒト抗体C領域をコードするDNAと連結し、これを発現ベクターに組み込んで宿主に導入し産生させることにより得られる(欧州特許出願公開番号EP 125023、国際特許出願公開番号WO 96/02576参照)。この既知の方法を用いて、本発明に有用なキメラ抗体を得ることができる。

例えば、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖V領域およびH鎖V領域をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々Escherichi

a coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-g $\kappa$ ) および *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成8年8月29日に、各々 FERM BP-5646 および FERM BP-5644 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている (特願平9-271536 参照)。

ヒト型化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称され、ヒト以外の哺乳動物、たとえばマウス抗体の相補性決定領域 (CDR; complementarity determining region) をヒト抗体の相補性決定領域へ移植したものであり、その一般的な遺伝子組換え手法も知られている (欧州特許出願公開番号 EP 125023、国際特許出願公開番号 WO 96/02576 参照)。

具体的には、マウス抗体の CDR とヒト抗体のフレームワーク領域 (framework region; FR) を連結するように設計した DNA 配列を、末端部にオーバーラップする部分を有するように作製した数個のオリゴヌクレオチドから PCR 法により合成する。得られた DNA をヒト抗体 C 領域をコードする DNA と連結し、次いで発現ベクターに組み込んで、これを宿主に導入し産生させることにより得られる (欧州特許出願公開番号 EP 239400、国際特許出願公開番号 WO 96/02576 参照)。

CDR を介して連結されるヒト抗体の FR は、相補性決定領域が良好な抗原結合部位を形成するものが選択される。必要に応じ、再構成ヒト抗体の相補性決定領域が適切な抗原結合部位を形成するように抗体の可変領域のフレームワーク領域のアミノ酸を置換してもよい (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856)。

例えば、ヒト型化抗 HM1.24 抗体の L 鎖 V 領域 a バージョン (配列番号: 2) および H 鎖 V 領域 r バージョン (配列番号: 3) をコードする DNA を含むプラスミドを有する大腸菌は、各々 *Escherichia*



coli DH5 $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-g $\kappa$ ) および *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成8年8月29日に、各々 FERM BP-5645 および FERM BP-5643 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている (特願平9-271536参照)。また、ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖V領域sバージョン (配列番号: 4) をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1) として、工業技術院生命工学工業技術研究所 (茨城県つくば市東1丁目1番3号) に、平成9年 (1997年) 9月29日に FERM BP-6127 としてブダペスト条約に基づき国際寄託されている (特願平9-271536参照)。

キメラ抗体、ヒト型化抗体には、ヒト抗体C領域が使用され、細胞障害活性を呈するヒト抗体C領域として、ヒトC $\gamma$ 例えば、C $\gamma$ 1, C $\gamma$ 2, C $\gamma$ 3, C $\gamma$ 4を使用することができる。これらのうち、特にC $\gamma$ 1, C $\gamma$ 3を有する抗体が強力な細胞障害活性、すなわち、ADCC活性、CDC活性を有し、本発明に好適に使用される。

キメラ抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の可変領域とヒト抗体由来のC領域からなり、ヒト型化抗体はヒト以外の哺乳動物由来抗体の相補性決定領域とヒト抗体由来のフレームワーク領域 (framework region; FR) およびC領域からなり、ヒト体内における抗原性が低下しているため、本発明の治療剤の有効成分として有用である。

本発明に使用されるヒト型化抗体の好ましい具体例としては、ヒト型化抗HM1.24抗体が挙げられる (特願平9-271536参照)。ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖V領域の好ましい具体例としては、配列番号2に示される塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有するものが挙げられる。また、ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖V領域の好ま

しい具体例としては、配列番号 3 及び 4 に示される塩基配列によりコードされるアミノ酸配列を有するものが挙げられる。

#### 1-4. 発現および産生

前記のように構築した抗体遺伝子は、公知の方法により発現させ、取得することができる。哺乳類細胞の場合、常用される有用なプロモーター、発現される抗体遺伝子、その 3' 側下流にポリ A シグナルを機能的に結合させた DNA あるいはそれを含むベクターにより発現させることができる。例えばプロモーター／エンハンサーとしては、ヒトサイトメガロウィルス前期プロモーター／エンハンサー (human cytomegalovirus immediate early promoter/enhancer) を挙げるることができる。

また、その他に本発明で使用される抗体発現に使用できるプロモーター／エンハンサーとして、レトロウィルス、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、シミアンウィルス 40 (SV 40) 等のウィルスプロモーター／エンハンサーやヒトエロンゲーションファクター 1  $\alpha$  (HEF1  $\alpha$ ) などの哺乳類細胞由来のプロモーター／エンハンサーを用いればよい。

例えば、SV 40 プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mulliganらの方法 (Nature (1979) 277, 108)、また、HEF1  $\alpha$  プロモーター／エンハンサーを使用する場合、Mizushima らの方法 (Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322) に従えば容易に実施することができる。

大腸菌の場合、常用される有用なプロモーター、抗体分泌のためのシグナル配列、発現させる抗体遺伝子を機能的に結合させて発現させることができる。例えばプロモーターとしては、lacZプロモーター、araBプロモーターを挙げるることができる。lacZプロモーターを使用する場合、Wardらの方法 (Nature (1978) 271, 544-546; FA

SEB J. (1992) 6, 2422-2427)、araBプロモーターを使用する場合、Betterらの方法 (Science (1988) 240, 1041-1043) に従えばよい。

抗体分泌のためのシグナル配列としては、大腸菌のペリプラズムに産生させる場合、pelBシグナル配列 (Lei, S. P. et al J. Bacteriol. (1987) 169, 4379) を使用すればよい。ペリプラズムに産生された抗体を分離した後、抗体の構造を適切にリフォールド (refold) して使用する (例えば、W096/30394を参照)。

複製起源としては、SV 40、ポリオーマウィルス、アデノウィルス、ウシパピローマウィルス (BPV) 等の由来のものを用いることができ、さらに、宿主細胞系で遺伝子コピー数増幅のため、発現ベクターは選択マーカーとして、アミノグリコシドトランスフェラーゼ (APH) 遺伝子、チミジンキナーゼ (TK) 遺伝子、大腸菌キサンチンゲアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (Ecogpt) 遺伝子、ジヒドロ葉酸還元酵素 (dhfr) 遺伝子等を含むことができる。

本発明で使用される抗体の製造のために、任意の産生系を使用することができる。抗体製造のための産生系は、in vitroおよびin vivoの産生系がある。in vitroの産生系としては、真核細胞を使用する産生系や原核細胞を使用する産生系が挙げられる。

真核細胞を使用する場合、動物細胞、植物細胞、真菌細胞を用いる産生系がある。動物細胞としては、(1) 哺乳類細胞、例えば、CHO, COS, ミエローマ、BHK (baby hamster kidney), HeLa, Vero, (2) 両生類細胞、例えば、アフリカツメガエル卵母細胞、あるいは(3) 昆虫細胞、例えば、sf9, sf21, Tn5などが知られている。植物細胞としては、ニコティアナ (Nicotiana) 属、例えばニコティアナ・タバカム (Nicotiana tabacum) 由来の細胞が知られており、これをカルス培養すればよい。真菌細胞としては、酵母、例えば、サ

ッカロミセス (Saccharomyces) 属、例えばサッカロミセス・セレビシエ (Saccharomyces cerevisiae)、糸状菌、例えば、アスペルギルス (Aspergillus) 属、例えばアスペルギルス・ニガー (Aspergillus niger) などが知られている。

原核細胞を使用する場合、細菌細胞を用いる産生系がある。細菌細胞としては、大腸菌 (E. coli)、枯草菌が知られている。

これらの細胞に、目的とする抗体遺伝子を形質転換により導入し、形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより抗体が得られる。培養は、公知の方法に従い行う。例えば、培養液として、DMEM, MEM, RPMI1640、IMDMを使用することができ、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液を併用することもできる。また、抗体遺伝子を導入した細胞を動物の腹腔等へ移すことにより、*in vivo* にて抗体を産生してもよい。

一方、*in vivo* の産生系としては、動物を使用する産生系や植物を使用する産生系が挙げられる。動物を使用する場合、哺乳類動物、昆虫を用いる産生系がある。

哺乳類動物としては、ヤギ、ブタ、ヒツジ、マウス、ウシなどを用いることができる (Vicki Glaser, SPECTRUM Biotechnology Application, 1993)。また、昆虫としては、カイコを用いることができる。

植物を使用する場合、タバコを用いることができる。

これらの動物または植物に抗体遺伝子を導入し、動物または植物の体内で抗体を産生させ、回収する。例えば、抗体遺伝子をヤギβカゼインのような乳汁中に固有に産生される蛋白質をコードする遺伝子の途中に挿入して融合遺伝子として調製する。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片をヤギの胚へ注入し、この胚を雌のヤギへ導入する。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェ

ニックヤギまたはその子孫が産生する乳汁から所望の抗体を得る。トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、適宜ホルモンをトランスジェニックヤギに使用してもよい (Ebert, K.M. et al., Bio/Technology (1994) 12, 699-702)。

また、カイコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を挿入したバキュロウィルスをカイコに感染させ、このカイコの体液より所望の抗体を得る (Susumu, M. et al., Nature(1985)315, 592-594)。さらに、タバコを用いる場合、目的の抗体遺伝子を植物発現用ベクター、例えば pMON530 に挿入し、このベクターをアグロバクテリウム・ツメファシエンズ (*Agrobacterium tumefaciens*) のようなバクテリアに導入する。このバクテリアをタバコ、例えばニコチニア・タバカム (*Nicotiana tabacum*) に感染させ、本タバコの葉より所望の抗体を得る (Julian, K.-C. Ma et al., Eur. J. Immunol. (1994) 24, 131-138)。

上述のように *in vitro* または *in vivo* の産生系にて抗体を産生する場合、抗体重鎖 (H 鎖) または軽鎖 (L 鎖) をコードする DNA を別々に発現ベクターに組み込んで宿主を同時形質転換させてもよいし、あるいは H 鎖および L 鎖をコードする DNA を単一の発現ベクターに組み込んで、宿主を形質転換させてもよい (国際特許出願公開番号 WO 94-11523 参照)。

上述のように得られた抗体は、ポリエチレングリコール (PEG) 等の各種分子と結合させ抗体修飾物として使用することもできる。本願特許請求の範囲でいう「抗体」にはこれらの抗体修飾物も包含される。このような抗体修飾物を得るには、得られた抗体に化学的な修飾を施すことによって得ることができる。これらの方法はこの分野においてすでに確立されている。

## 2. 抗体の分離、精製

### 2-1. 抗体の分離、精製

前記のように産生、発現された抗体は、細胞内外、宿主から分離し均一にまで精製することができる。本発明で使用される抗体の分離、精製はアフィニティークロマトグラフィーにより行うことができる。アフィニティークロマトグラフィーに用いるカラムとしては、例えば、プロテインA カラム、プロテインG カラムが挙げられる。プロテインA カラムに用いる担体として、例えば、Hyper D, POR OS, Sepharose F.F. 等が挙げられる。

その他、通常のタンパク質で使用されている分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば、上記アフィニティークロマトグラフィー以外のクロマトグラフィー、フィルター、限外濾過、塩析、透析等を適宜選択、組み合わせれば、本発明で使用される抗体を分離、精製することができる。クロマトグラフィーとしては、例えば、イオン交換クロマトグラフィー、疎水クロマトグラフィー、ゲルろ過等が挙げられる。これらのクロマトグラフィーはHPLCに適用することができる。また、逆相HPLCを用いることができる。

### 2-2. 抗体の濃度測定

2-1 で得られた抗体の濃度測定は吸光度の測定またはELISA 等により行うことができる。すなわち、吸光度の測定による場合には、本発明で使用される抗体又は抗体を含むサンプルをPBS(-)で適当に希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出する。また、ELISA による場合は以下のように測定することができる。すなわち、0.1M重炭酸緩衝液 (pH9.6) で1  $\mu$ g/mlに希釈したヤギ抗ヒトIgG (BIO SOURCE製) 100  $\mu$ l を96穴プレート (Nunc製) に加え、4  $^{\circ}$ Cで一晩インキュベーションし、抗体を固層化す

る。

ブロッキングの後、適宜希釈した本発明で使用される抗体または抗体を含むサンプル、あるいは標品としてヒトIgG（CAPPEL製）100  $\mu$ l を添加し、室温にて1時間インキュベーションする。洗浄後、5000倍希釈したアルカリフォスファターゼ標識抗ヒトIgG（BIO SOURCE製）100  $\mu$ l を加え、室温にて1時間インキュベートする。洗浄後、基質溶液を加えインキュベーションの後、MICROPLATE READER Model 3550（Bio-Rad 製）を用いて405nmでの吸光度を測定し、目的の抗体の濃度を算出する。

### 3. FCM 解析

リンパ球系腫瘍と本発明で使用される抗体との反応性は、FCM（フローサイトメトリー）解析で行うことができる。細胞としては、樹立細胞株あるいは新鮮分離細胞を用いることができる。例えば樹立細胞株として、T細胞株であるRPMI 8402（ATCC CRL-1994）、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-CEM（ATCC CCL-119）、急性リンパ性白血病由来HPB-ALL（FCCH1018）、Tリンパ腫由来HPB-MLT（FCCH1019）、急性リンパ性白血病由来JM（FCCH1023）、急性リンパ芽球性白血病由来MOLT-4（ATCC CRL-1582）、急性リンパ性白血病由来Jurkat（FCCH1024）、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-HSB-2（ATCC CCL-120.1）、成人T細胞白血病由来MT-1（FCCH1043）、レンネルトリリンパ腫由来KT-3（Shimizu, S. et al., Blood (1988)71, 196-203)などを、また、B細胞株としてEBウィルス形質転換細胞CESS（ATCC TIB-190）、EBウィルス陽性B細胞SKW 6.4（ATCC TIB-215）、Bリンパ腫由来MC116（ATCC CRL-1649）、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-SB（ATCC CCL-120）、急性骨髄性白血病患者由来B細胞RPMI 6410（FCCH6047）、Burkittリンパ腫由来Daudi（ATCC CCL-213）、Burkittリンパ腫由来EB-3（ATCC CCL-85）、Bu

rkitt リンパ腫由来Jijoye (ATCC CCL-87)、Burkitt リンパ腫由来Raji (ATCC CCL-86)などを、さらに非T非B細胞株として急性骨髄性白血病由来HL-60 (ATCC CCL-240)、急性単球性白血病由来THP-1 (ATCC TIB-202)、組織球性リンパ腫由来U-937 (ATCC CRL-1593)、慢性骨髄性白血病由来K-562 (ATCC CCL-243)などを用いることができる。

上記細胞をPBS(-)で洗浄した後、FACS緩衝液(2%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウム含有PBS(-))で25 $\mu$ g/mlに希釈した抗体あるいはコントロール抗体100 $\mu$ lを加え、氷温化30分インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、25 $\mu$ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウス抗体(GAM, Becton Dickinson製)100 $\mu$ lを加え、氷温化30分間インキュベートする。FACS緩衝液で洗浄した後、600 $\mu$ lあるいは1mlのFACS緩衝液に懸濁し、FACSscan (Becton Dickinson製)で各細胞の蛍光強度を測定すればよい。

各細胞の蛍光強度の測定値から、本発明で使用される抗体と各細胞の反応性を知ることができる。すなわち、各細胞の蛍光強度の測定値から、各細胞にHM1.24抗原が発現しているか否か(陽性か陰性か)及び発現の強度を知ることができる。リンパ球系腫瘍細胞におけるHM1.24抗原の発現の有無および発現強度については、後述の実施例2.2.FCM解析に記載されている。

本発明の治療対象となるリンパ球系腫瘍の腫瘍細胞は、HM1.24抗原を発現している。より詳しくは、リンパ球系腫瘍の腫瘍細胞は、HM1.24抗原陽性のパーセンテージが5%未満ではない腫瘍細胞が好ましい。より詳しくは、リンパ球系腫瘍の腫瘍細胞は、HM1.24抗原陽性のパーセンテージが20%以上である腫瘍細胞が好ましい。より詳しくは、リンパ球系腫瘍の腫瘍細胞は、HM1.24抗原陽性のパーセンテージが50%以上である腫瘍細胞が好ましい。より詳しくは、リ



リンパ球系腫瘍の腫瘍細胞は、HM1.24抗原陽性のパーセンテージが80%以上である腫瘍細胞が好ましい。

#### 4. 細胞障害活性

##### 4-1. CDC 活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞障害活性として、例えば、CDC活性を有する抗体である。

本発明のリンパ球系腫瘍治療剤のリンパ球系腫瘍に対するCDC活性は、次のようにして測定することができる。まず標的細胞を適当な培地、例えば10% ウシ胎児血清 (GIBCO-BRL 製) 含有RPMI 1640培地 (GIBCO-BRL 製) で  $4 \times 10^5$  個/ml になるように調製する。標的細胞としてはCCRF-CEM (ATCC CCL-119), CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1)、HPB-MLT (FCCH1019), EB-3 (ATCC CCL-85), MC116 (ATCC CRL-1649), CCRF-SB (ATCC CCL-120), K-562 (ATCC CCL-243) などを用いることができる。これら細胞を96穴平底プレート (FALCON製) に50  $\mu$ l 加え、37°C CO<sub>2</sub> インキュベーター中で一晩培養する。

次いで、CDC活性を測定する抗体を加え、60分間インキュベートした後、適当に希釈した補体、例えばBaby Rabbit Complement (CEDARLANE 製) を加え、2時間インキュベートする。これにAlamar Blue (BIO SOURCE製) を各穴に10  $\mu$ l 加え、4時間インキュベートした後、各穴の蛍光強度 (励起波長530 nm、検出波長590 nm) を蛍光測定システムCytoFluor 2350 (MILLIPORE 製) で測定する。細胞障害活性 (%) は、 $(A-C) / (B-C) \times 100$  で計算することができる。なお、A は抗体存在下でインキュベートしたときの蛍光強度、B は抗体を含まず培養液のみでインキュベートしたときの蛍光強度、C は細胞を含まない穴の蛍光強度である。

##### 4-2. ADCC活性の測定

本発明に使用される抗体は、細胞障害活性として、例えば、ADCC活性を有する抗体である。

本発明のリンパ球系腫瘍治療剤のリンパ球系腫瘍に対するADCC活性は、次のようにして測定することができる。まず、ヒトの末梢血や骨髄より比重遠心法で単核球分離し、エフェクター細胞として調製する。また、標的細胞としてはCCRF-CEM (ATCC CCL-119), CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1)、HPB-MLT (FCCH1019), EB-3 (ATCC CCL-85), MC116 (ATCC CRL-1649), CCRF-SB (ATCC CCL-120), K-562 (ATCC CCL-243)などを $^{51}\text{Cr}$ により標識して、標的細胞として調製する。次いで、標識した標的細胞にADCC活性を測定する抗体を加えインキュベートし、その後、標的細胞に対し適切な比のエフェクター細胞を加えインキュベートする。

インキュベートした後上清を取り、ガンマカウンターで放射活性を測定する。その際、最大遊離放射能測定用に、1%のNP-40を用いることができる。細胞障害活性(%)は、 $(A-C) / (B-C) \times 100$ で計算することができる。なお、Aは抗体存在下において遊離された放射活性(cpm)、BはNP-40により遊離された放射活性(cpm)、Cは抗体を含まず培養液のみで遊離された放射活性(cpm)である。

#### 4-3. 細胞障害活性の増強

ADCC活性やCDC活性のような細胞障害活性を発揮するには、ヒトにおいては抗体定常領域(C領域)としてC $\gamma$ 、特にC $\gamma$ 1、C $\gamma$ 3を使用することが好ましい。さらに、抗体C領域のアミノ酸を一部付加、改変、修飾することにより、より強力なADCC活性、あるいはCDC活性を誘導することができる。

例えば、アミノ酸置換によるIgGのIgM様ポリマー化 (Smith, R. I. F. & Morrison, S. L. BIO/TECHNOLOGY(1994) 12, 683-688)

、アミノ酸付加によるIgGのIgM様ポリマー化 (Smith, R. I. F. et al., J. Immunology (1995) 154, 2226-2236)、L鎖をコードする遺伝子の直列連結での発現 (Shuford, W. et al., Science (1991) 252, 724-727)、アミノ酸置換によるIgGの二量体化 (Caron, P. C. et al., J. Exp. Med. (1992) 176, 1191-1195, Shope s, B., J. Immunology (1992) 148, 2918-2922)、化学修飾によるIgGの二量体化 (Wolff, E. A. et al., Cancer Res. (1993) 53, 2560-2565)、および抗体ヒンジ領域のアミノ酸改変によるエフェクター機能の導入 (Norderhaug, L. et al., Eur. J. Immunol. (1991) 21, 2379-2384)が挙げられる。これらは、プライマーを利用したオリゴマー部位特異的変異導入法、制限酵素切断部位を利用した塩基配列の付加、共有結合をもたらす化学修飾剤を使用することによって達成される。

#### 5. 治療効果の確認

本発明のリンパ球系腫瘍治療剤の治療効果を確認するには、本発明で使用される抗体をリンパ球系腫瘍細胞を移植した動物に投与し、抗腫瘍効果を評価することにより行うことができる。

動物に移植するリンパ球形腫瘍細胞としては、樹立細胞株あるいは新鮮分離細胞を用いることができる。例えば樹立細胞株として、T細胞株であるCCRF-CEM (ATCC CCL-119)、HPB-MLT (FCCH1019)、MOLT-4 (ATCC CRL-1582)、CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1)などを、また、B細胞株としてCESS (ATCC TIB-190)、SKW 6.4 (ATCC TIB-215)、CCRF-SB (ATCC CCL-120)、RPMI 6410 (FCCH6047)、EB-3 (ATCC CCL-85)などを用いることができる。

また、移植される動物としては、免疫機能が低下または欠失した動物が好ましく、例えば、ヌードマウス、SCIDマウス、ベージュマウス、ヌードラットなどを用いることができる。評価する抗腫瘍効

果の確認は、腫瘍体積・重量の測定や動物の生存期間などにより行うことができる。

後述の実施例に示されるように、抗HM1.24抗体の投与によりヒトリンパ球系腫瘍移植マウスにおいて、腫瘍体積の増加が抑制され、さらに腫瘍移植マウスの生存期間の延長が認められた。これらのことから、抗HM1.24抗体はリンパ球系腫瘍に対し抗腫瘍効果を有することが示された。

#### 6. 投与経路および製剤

本発明のリンパ球系腫瘍治療剤は、非経口的に全身あるいは局所的に投与することができる。例えば、点滴などの静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射を選択することができ、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。有効投与量は、一回につき体重1 Kgあたり0.01 mg から100 mgの範囲で選ばれる。あるいは、患者あたり1-1000 mg、好ましくは5-50 mgの投与量を選ぶことができる。

本発明のリンパ球系腫瘍治療剤は、投与経路次第で医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。このような担体および添加物の例として、水、医薬的に許容される有機溶媒、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、メチルセルロース、エチルセルロース、キサントガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、ジグリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン（HSA）、マンニトール、ソルビトール、ラクトース、医薬添加物として許容される界面

活性剤などが挙げられる。使用される添加物は、剤型に応じて上記の中から適宜あるいは組合せて選択されるが、これらに限定されるものではない。

本発明の治療対象疾患としては、標的とする腫瘍細胞上に本発明で使用される抗体が結合する抗原が存在する、骨髄腫を除くリンパ球系腫瘍である。具体的には、急性Bリンパ性白血病（B-ALL）、慢性Bリンパ性白血病（B-CLL）、pre-Bリンパ腫、Burkittリンパ腫、濾胞性リンパ腫、濾胞外套リンパ腫、びまん性リンパ腫、急性Tリンパ性白血病（T-ALL）、慢性Tリンパ性白血病（T-CLL）、成人T細胞白血病（ATL）、非ATL末梢性Tリンパ腫（PNTL）等が挙げられる。本発明の治療剤は、これらリンパ球系腫瘍の治療剤として有用である。

## 実施例

次に、本発明を実施例によりさらに具体的に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

### 実施例1. 抗HM1.24抗体の作製

#### 1. 抗HM1.24抗体を含むマウス腹水の調製

抗HM1.24抗体産生ハイブリドーマをGoto, Tらの方法（Blood（1994）84, 1922-1930）に従い得た。

あらかじめ11, 3日前に2, 6, 10, 14-テトラメチルペンタデカン（和光純薬工業製）をそれぞれ500  $\mu$ lずつ腹腔内に投与したBALB/cマウス（日本クレア製）に、本ハイブリドーマ $5 \times 10^6$ 個を腹腔内に注入した。ハイブリドーマ注入後10日目より、マウスの腹腔内に溜った腹水を19ゲージの留置針ハッピーキャス（メディキット製）で採取した。採取した腹水は、低速遠心機RLX-131（トミー精工製）を用いて回転数1000, 3000 rpmで2回遠心し、ハイブリドーマ、

血球等の雑排物を除去した。

## 2. マウス腹水からの抗HM1.24抗体の精製

上記マウス腹水からの抗HM1.24抗体の精製は以下の方法で行った。マウス腹水に等量のPBS(-)を加えた後、中空糸フィルターメディアプレップ (MILLIPORE 製) を用いてろ過した後、高速抗体精製装置 ConSep LC100 (MILLIPORE 製) および Hyper D Protein A カラム (カラム体積 20 ml、日本ガイシ製) を用い、付属の説明書に基づき吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 4) を用いてアフィニティー精製した。溶出画分は直ちに1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpH7.4 付近に調整した後、遠心限外濃縮器 Centriprep 10 を用いて濃縮およびPBS(-)への緩衝液置換を行い、孔径0.22  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルター MILLEX-GV (MILLIPORE 製) でろ過滅菌し、精製抗HM1.24抗体を得た。

## 3. 抗体濃度の測定

精製抗体の濃度測定は吸光度の測定により行った。すなわち、精製抗体をPBS(-)で希釈した後、280 nmの吸光度を測定し、1 mg/ml を1.35 OD として算出した。

### 実施例2. 抗HM1.24抗体のリンパ球系腫瘍細胞に対する反応性の検討

#### 1. コントロールマウスIgG2a の精製

コントロールマウスIgG2a の精製は以下の方法で行った。市販の mouse IgG2a(KAPPA)(UPC 10) ascites (CAPPEL製) を精製水およびPBS(-)で溶解した。これを孔径0.2  $\mu\text{m}$  のメンブランフィルター Acrodisc (Gelman Sciences 製) を用いてろ過した後、高速抗体精製装置 ConSep LC100 (MILLIPORE 製) および Hyper D Protein A カラム (カラム体積 20 ml、日本ガイシ製) を用い、付属の説明書に基づき吸着緩衝液としてPBS(-)、溶出緩衝液として0.1 M クエン酸ナ

トリウム緩衝液 (pH 4) を用いてアフィニティー精製した。

溶出画分は直ちに1 M Tris-HCl (pH 8.0) を添加してpH7.4 付近に調整した後、遠心限外濃縮器Centriprep 10 を用いて濃縮およびPBS(-)への緩衝液置換を行い、孔径0.22  $\mu$ m のメンブランフィルター-MILLEX-GV (MILLIPORE 製) でろ過滅菌し精製コントロールマウスIgG2a を得た。

精製コントロールマウスIgG2a の濃度測定は、上記3 の抗体濃度の測定に従った。

## 2. FCM 解析

抗HM1.24抗体のリンパ球系腫瘍細胞に対する反応性の検討は、FCM (フローサイトメトリー) 解析で行った。T細胞株であるRPMI 8402 (ATCC CRL-1995)、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-CEM (ATCC CCL-119)、急性リンパ性白血病由来HPB-ALL (FCCH1018)、Tリンパ腫由来HPB-MLT (FCCH1019)、急性リンパ性白血病由来JM (FCCH1023)、急性リンパ芽球性白血病由来MOLT-4 (ATCC CRL-1582)、急性リンパ性白血病由来Jurkat (FCCH1024)、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1)、成人T細胞白血病由来MT-1 (FCCH1043)、レンネルトリンパ腫由来KT-3 (Shimizu, S. et al., Blood (1988)71,196-203)を、

また、B細胞株としてEBウィルス形質転換細胞CESS (ATCC TIB-190)、EBウィルス陽性B細胞SKW 6.4 (ATCC TIB-215)、Bリンパ腫由来MC116 (ATCC CRL-1649)、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-SB (ATCC CCL-120)、急性骨髄性白血病患者由来B細胞RPMI 6410 (FCCH6047)、Burkittリンパ腫由来Daudi (ATCC CCL-213)、Burkittリンパ腫由来EB-3 (ATCC CCL-85)、Burkittリンパ腫由来Jijoye (ATCC CCL-87)、Burkittリンパ腫由来Raji (ATCC CCL-86) を、さらに非T非B細胞株として急性骨髄性白血病由来HL

-60 (ATCC CCL-240)、急性単球性白血病由来THP-1 (ATCC TIB-202)、組織球性リンパ腫由来U-937 (ATCC CRL-1593)、慢性骨髄性白血病由来K-562 (ATCC CCL-243)をPBS(-)で洗浄した後、FACS緩衝液(2%ウシ胎児血清、0.1%アジ化ナトリウム含有PBS(-))で25 $\mu$ g/mlに希釈した抗HM1.24抗体あるいは精製コントロールマウスIgG2a 100 $\mu$ lを加え、氷温化30分インキュベートした。

FACS緩衝液で洗浄した後、25 $\mu$ g/mlのFITC標識ヤギ抗マウス抗体(GAM) 100 $\mu$ lを加え、氷温化30分間インキュベートした。FACS緩衝液で洗浄した後、600 $\mu$ lあるいは1mlのFACS緩衝液に懸濁し、FACSscan (Becton Deckinson社製)で各細胞の蛍光強度を測定した。その結果、図1~23に示すように、T細胞株では全例で、またB細胞株でDaudi, Rajiの2種類で反応しないもののその他全てで抗HM1.24抗体と反応し、HM1.24抗原を高発現していることが確認された。一方、非T非B細胞株では全例で抗HM1.24抗体と反応せず、抗原の発現を検出できなかった。

また、図1~23の各細胞のヒストグラムにおいて、コントロールマウスIgG2aを用いた染色で陰性細胞が98%、陽性細胞が2%となるようにヒストグラムマーカーを設定し、そのヒストグラムマーカーに従って抗HM1.24抗体を用いたときのHM1.24抗原陽性の細胞のパーセンテージを算出したものが表1である。HM1.24抗原陽性細胞のパーセンテージによりHM1.24抗原発現率を-、+/-、+、++、+++の5段階に区別した結果、図1~23と同様T細胞株では全例で、またB細胞株でもDaudi、Rajiを除く全てで++あるいは+++と非常にHM1.24抗原を高発現していることが確認された。また、非T非B細胞株では全例でHM1.24抗原陽性細胞が5%未満の-であり、抗原の発現が無い、あるいは非常に少ないことが示された。



表 1

	細胞名	発現率	
B 細胞株	CESS	+++	94.5
	SKW 6.4	+++	92.8
	MC116	++	65.0
	CCRF-SB	+++	98.4
	RPMI 6410	+++	94.5
	EB-3	+++	88.3
	Ji joye	+++	92.3
	Daudi	-	2.8
	Raji	-	2.0
	T 細胞株	RPMI 8402	+++
CCRF-CEM		+++	97.8
HPB-ALL		++	63.8
HPB-MLT		+++	94.6
JM		+++	99.6
MOLT-4		+++	84.1
Jurkat		++	70.9
CCRF-HSB-2		+++	100.0
MT-1		+++	95.9
KT-3		+++	96.0
非 T 非 B 細胞株	HL-60	-	2.9
	THP-1	-	1.5
	U-937	-	1.1
	K-562	-	3.9

-, < 5 % ; +/-, 5-20 % ; +, 20-50 % ; ++, 50-80 % ; +++, > 80 %

### 実施例3. CDC 活性の測定

抗HM1.24抗体の、リンパ球系腫瘍細胞に対するCDC活性は、以下のようにして測定した。

#### 1. 標的細胞の調製

標的細胞として急性リンパ性白血病由来CCRF-CEM (ATCC CCL-119)、急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-HSB-2 (ATCC CCL-120.1)、Tリンパ腫由来HPB-MLT (FCCH1019)、Burkittリンパ腫由来EB-3 (ATCC CCL-85)、Bリンパ腫由来116 (ATCC CRL-1649)、急性リンパ性白血病由来CCRF-SB (ATCC CCL-120)、慢性骨髄性白血病由来K562 (ATCC CCL-243)を、10%ウシ胎児血清 (GIBCO-BRL製)含有RPMI 1640培地 (GIBCO-BRL製)で $4 \times 10^5$ 個/mlになるよう

に調製した。これら細胞懸濁液を96穴平底プレート（FALCON製）に50  $\mu$ l 加え、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 高湿インキュベーター（TABAI 製）中で一晩培養した。

## 2. 抗HM1.24抗体の調製

前記実施例1 で得られた精製抗HM1.24抗体を、10% ウシ胎児血清（GIBCO-BRL 製）含有RPMI 1640 培地（GIBCO-BRL 製）で0, 0.2, 2, 20  $\mu$ g/mlに調製し、上記1 で作製した96穴平底プレートの各穴に50  $\mu$ l ずつ加えた。37°C、5 % CO<sub>2</sub> 高湿インキュベーター（TABAI 製）中で60分間インキュベートした後、低速遠心機05PR-22（日立製）を用いて、1000 rpm、5 分間遠心し、上清50  $\mu$ l を除去した。

## 3. 補体の調製

Baby Rabbit Complement（CEDARLANE 製）を1 バイアルあたり1 mlの精製水で溶解し、さらにFCS 不含RPMI 1640 培地（GIBCO-BRL 製）5 mlで希釈した。これを上記2 の96穴平底プレートの各穴に50  $\mu$ l 添加し、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 高湿インキュベーター（TABAI 製）中で2 時間インキュベートした。

## 4. CDC 活性の測定

インキュベート後、上記3 の96穴平底プレートの各穴にAlamar Blue（BIO SOURCE製）を10  $\mu$ l ずつ加え、37°C、5 % CO<sub>2</sub> 高湿インキュベーター（TABAI 製）中で4 時間インキュベートした後、各穴の蛍光強度（励起波長530 nm、検出波長590 nm）を蛍光測定システムCytoFluor 2350（MILLIPORE 製）で測定した。細胞障害活性（%）は、 $(A-C) / (B-C) \times 100$  で計算した。なお、A は抗体存在下でインキュベートしたときの蛍光強度、B は抗体を含まず培養液のみでインキュベートしたときの蛍光強度、C は細胞を含まない穴の蛍光強度である。

その結果、図24および25に示すように、FCM解析で抗HM1.24抗体と反応しなかったK562は、抗HM1.24抗体を添加しても細胞障害が起きなかったのに対し、抗HM1.24抗体と反応するCCRF-CEM, CCRF-HSB-2, HPB-MLT, EB-3, MC116およびCCRF-SBでは、添加した抗HM1.24抗体の濃度依存的に細胞障害が見られた。このことから、抗HM1.24抗体は、細胞表面に抗HM1.24抗体が特異的に結合する抗原蛋白質を有するリンパ球系腫瘍に対して、CDC活性を示すことが明らかとなった。

#### 実施例4. 抗HM1.24抗体のヒトリンパ球系腫瘍移植マウスに対する抗腫瘍効果

##### 1. 投与抗体の調製

##### 1-1. 抗HM1.24抗体の調製

前記実施例1で得られた精製抗HM1.24抗体を、ろ過滅菌したPBS(-)を用いて1 mg/ml, 200  $\mu$ g/mlに調製し、以下の実験に用いた。

##### 1-2. コントロールマウスIgG2aの調製

前記実施例2で得られた精製を、ろ過滅菌したPBS(-)を用いて1 mg/mlに調製し、以下の実験に用いた。

##### 2. 抗HM1.24抗体のヒトリンパ球系腫瘍移植マウスに対する抗腫瘍効果

##### 2-1. ヒトリンパ球系腫瘍移植マウスの作製

ヒトリンパ球系腫瘍移植マウスは以下のように作製した。SCIDマウス(日本クレア)を用いてin vivo継代した急性リンパ芽球性白血病由来CCRF-HSB-2細胞(ATCC CCL 120.1)を、10%ウシ胎児血清(GIBCO-BRL製)を含むRPMI 1640培地で $1 \times 10^8$ 個/mlになるように調製した。あらかじめ前日抗アジアロGM1(和光純薬工業製)100  $\mu$ lを腹腔内投与したSCIDマウス(オス、6週令)(日本クレア)の腹部皮下に、上記で調製した細胞懸濁液を注入した。

## 2-2. 抗体投与

腫瘍移植後7日目に上記ヒトリンパ球系腫瘍移植マウスのCCRF-H SB-2移植部位の腫瘍径をノギスを用いて測定し、腫瘍体積を算出した後、各群の腫瘍体積の平均がほぼ等しくなるように群分けを行った（各群8匹、3群）。同日より上記1で調製した1 mg/ml または200  $\mu$ g/mlの抗HM1.24抗体、あるいは1 mg/ml のコントロールマウスIgG2a それぞれ100  $\mu$ l を各群に腹腔内投与した。投与は週2回、合計19回同様に行った。この間、週2回ノギスを用いて腫瘍径を測定し腫瘍体積を算出した。

## 2-3. 抗HM1.24抗体のヒトリンパ球系腫瘍移植マウスに対する抗腫瘍効果の評価

抗HM1.24抗体の抗腫瘍効果については、腫瘍体積の変化およびマウスの生存期間で評価した。その結果、図26に示すように抗HM1.24抗体投与群は、コントロールマウスIgG2a抗体投与群に比べ腫瘍体積の増加が抑制された。また、図27に示すように、抗HM1.24抗体投与群は、コントロールマウスIgG2a抗体投与群に比べマウスの生存期間の延長が見られた。これらのことから、抗HM1.24抗体はヒトリンパ球系腫瘍移植マウスに対して抗腫瘍効果を有することが示された。

### 参考例1. マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマの調製

Goto, T. et al., Blood (1994) 84, 1992-1930 に記載の方法にて、マウス抗HM1.24モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製した。

ヒト多発性骨髄腫患者骨髄由来の形質細胞株KPC-32 ( $1 \times 10^7$  個) (Goto, T. et al., Jpn. J. Clin. Hematol. (1991) 32, 1400) をBALB/Cマウス（チャールスリバー製）の腹腔内に6週間おきに2

回注射した。

このマウスを屠殺する3日前にマウスの抗体産生価をさらに上昇させるために、 $1.5 \times 10^6$  個のKPC-32をマウスの脾臓内に注射した (Goto, T. et al., Tokushima J. Exp. Med. (1990) 37, 89)。マウスを屠殺した後に脾臓を摘出し、Groth, de St. & Schreideggerの方法 (Cancer Research (1981) 41, 3465) に従い摘出した脾臓細胞とミエローマ細胞SP2/0を細胞融合に付した。

KPC-32を用いたCell ELISA (Posner, M. R. et al., J. Immunol. Methods (1982) 48, 23) によりハイブリドーマ培養上清中の抗体のスクリーニングを行った。 $5 \times 10^4$  個のKPC-32を50 mlのPBSに懸濁し、96穴プレート (U底型、Corning, Iwaki製) に分注し37℃で一晩風乾した。1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSでブロックした後、ハイブリドーマ培養上清を加え4℃にて2時間インキュベートした。次いで、4℃にて1時間ペルオキシダーゼ標識抗マウスIgGヤギ抗体 (Zymed製) を反応させ、洗浄後室温にて30分間o-フェニレンジアミン基質溶液 (Sumitomo Bakelite製) を反応させた。

2N硫酸で反応を停止させ、ELISA reader (Bio-Rad製) で492nmにおける吸光度を測定した。ヒト免疫グロブリンに対する抗体を産生するハイブリドーマを除去するために、陽性ハイブリドーマ培養上清をヒト血清にあらかじめ吸着させ、他の細胞株に対する反応性をELISAにてスクリーニングした。陽性のハイブリドーマを選択し、種々の細胞に対する反応性をフローサイトメトリーで調べた。最後に選択されたハイブリドーマクローンを二度クローン化し、これをプリスタン処理したBALB/Cマウスの腹腔に注射して、腹水を取得した。

モノクローナル抗体は、硫酸アンモニウムによる沈澱とプロテイ

ンA アフィニティークロマトグラフィーキット (Ampure PA、Amersham 製) によりマウス腹水より精製した。精製抗体は、Quick Tag FITC 結合キット (ベーリンガーマンハイム 製) を使用することにより FITC 標識した。

その結果、30 のハイブリドーマクローンが産生するモノクローナル抗体が KPC-32 および RPMI 8226 と反応した。クローニングの後、これらのハイブリドーマの培養上清と他の細胞株あるいは末梢血単核球との反応性を調べた。

このうち、3 つのクローンが形質細胞に特異的に反応するモノクローナル抗体であった。これらの 3 つのクローンのうち、最もフローサイトメトリー分析に有用であり、かつ RPMI 8226 に対する CDC 活性を有するハイブリドーマクローンを選択し、HM1.24 と名付けた。このハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体のサブクラスを、サブクラス特異的抗マウスウサギ抗体 (Zymed 製) を用いた ELISA にて決定した。抗 HM1.24 抗体は、IgG2a  $\kappa$  のサブクラスを有していた。抗 HM1.24 抗体を産生するハイブリドーマ HM1.24 は、工業技術院生命工学工業研究所 (茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号) に、平成 7 年 9 月 14 日に FERM BP-5233 としてブタペスト条約に基づき国際寄託された。

#### 参考例 2. ヒト型化抗 HM1.24 抗体の作製

ヒト型化抗 HM1.24 抗体を下記の方法により得た。

参考例 1 で作製されたハイブリドーマ HM1.24 から、常法により全 RNA を調製した。これよりマウス抗体 V 領域をコードする cDNA をポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法および 5' -RACE 法により、合成、増幅した。マウス V 領域をコードする遺伝子を含む DNA 断片を得、これらの DNA 断片を各々プラスミド pUC 系クローニングベクターに連結し、大腸菌コンピテント細胞に導入して大腸菌形質転換体を得た。

。この形質転換体から上記プラスミドを得、プラスミド中のcDNAコード領域の塩基配列を常法に従い決定し、さらに各々のV領域の相補性決定領域(CDR)を決定した。

キメラ抗HM1.24抗体を発現するベクターを作製するため、それぞれマウス抗HM1.24抗体L鎖およびH鎖のV領域をコードするcDNAをHEFベクターに挿入した。また、ヒト型化抗HM1.24抗体を作製するために、CDR移植法によりマウス抗HM1.24抗体のV領域CDRをヒト抗体へ移植した。ヒト抗体のL鎖としてヒト抗体REIのL鎖を用い、ヒト抗体H鎖としてフレームワーク領域(FR)1-3についてはヒト抗体HG3のFR1-3を用いFR4についてはヒト抗体JH6のFR4を用いた。CDRを移植した抗体が適切な抗原結合部位を形成するようにH鎖V領域のFRのアミノ酸を置換した。

このようにして作製したヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖およびH鎖の遺伝子を哺乳類細胞で発現させるために、HEFベクターに、各々の遺伝子を別々に導入し、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖またはH鎖を発現するベクターを作製した。

これら二つの発現ベクターをCHO細胞に同時に導入することにより、ヒト型化抗HM1.24抗体を産生する細胞株を樹立した。この細胞株を培養して得られたヒト型化抗HM1.24抗体のヒト羊膜由来細胞株WISHへの抗原結合活性および結合阻害活性を、Cell ELISAにて調べた。その結果、ヒト型化抗HM1.24抗体は、キメラ抗体と同等の抗原結合活性を有し、さらにビオチン化マウス抗HM1.24抗体を用いた結合阻害活性についても、キメラ抗体あるいはマウス抗体と同等の活性を有した。

なお、キメラ抗HM1.24抗体のL鎖V領域およびH鎖V領域をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24L-g $\kappa$ ) および*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (

pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1)として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5646およびFERM BP-5644としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。また、ヒト型化抗HM1.24抗体のL鎖V領域aバージョン(配列番号:2)およびH鎖V領域rバージョン(配列番号:3)をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、各々*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHM-gk)および*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1)として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成8年8月29日に、各々FERM BP-5645およびFERM BP-5643としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。また、ヒト型化抗HM1.24抗体のH鎖V領域sバージョン(配列番号:4)をコードするDNAを含むプラスミドを有する大腸菌は、*Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g $\gamma$ 1)として、工業技術院生命工学工業技術研究所(茨城県つくば市東1丁目1番3号)に、平成9年(1997年)9月29日にFERM BP-6127としてブダペスト条約に基づき国際寄託された。

### 参考例3. HM1.24 抗原蛋白質cDNAのクローニング

抗HM1.24抗体が特異的に認識するHM1.24抗原蛋白質をコードするcDNAをクローニングした。

#### 1. cDNA ライブラリーの作製

##### 1) 全RNA の調製

ヒト多発性骨髄腫細胞株KPM2から、全RNAをChirgwinら(Biochemistry, 18, 5294(1979))の方法に従って調製した。すなわち、 $2.2 \times 10^8$ 個のKPM2を20 mlの4 M グアニジンチオシアネート(ナカライテスク製)中で完全にホモジナイズさせた。

ホモジネートを遠心管中の5.3 M 塩化セシウム溶液に重層し、次にこれをBeckman SW40ローター中で31,000rpmにて20°Cで24時間遠



心分離することによりRNAを沈殿させた。RNA沈殿物を70%エタノールにより洗浄し、そして1 mM EDTA及び0.5% SDSを含有する10 mM Tris-HCl (pH7.4) 300  $\mu$ l中に溶解し、それにPronase (Boehringer製)を0.5 mg/mlとなるように添加した後、37°Cにて30分間インキュベートした。混合物をフェノール及びクロロホルムで抽出し、RNAをエタノールで沈殿させた。次に、RNA沈殿物を1 mM EDTAを含有する10 mM Tris-HCl (pH7.4) 200  $\mu$ lに溶解した。

## 2) poly(A) + RNA の調製

前記のようにして調製した全RNAの約500  $\mu$ gを材料としてFast Track 2.0 mRNA Isolation Kit (Invitrogen製)を用いてキット添付の処方に従って poly(A) + RNA を精製した。

## 3) cDNAライブラリーの構築

上記 poly(A) + RNA 10  $\mu$ g を材料としてcDNA合成キットTimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia 製)を用いてキット添付の処方に従って二本鎖 cDNA を合成し、更にDirectional Cloning Toolbox (Pharmacia 製)を用いてキット付属の EcoRIアダプターをキット添付の処方に従って連結した。EcoRI アダプターのカイネーション及び制限酵素 NotI 処理はキット添付の処方に従って行った。更に、約 500 bp 以上の大きさのアダプター付加二本鎖 cDNA を1.5% 低融点アガロースゲル (Sigma 製)を用いて分離、精製し、アダプター付加二本鎖 cDNA 約 40  $\mu$ l を得た。

このようにして作製したアダプター付加二本鎖 cDNA を、あらかじめ制限酵素 EcoRI、NotI及びアルカリフォスファターゼ (宝酒造製)処理した pCOS1ベクター (特願平8-255196)と T4 DNA リガーゼ (GIBCO-BRL 製)を用いて連結し、cDNAライブラリーを構築した。構築した cDNA ライブラリーは、大腸菌細胞株 DH5 $\alpha$  (GIBCO-BRL 製)に形質導入され、全体のサイズは約  $2.5 \times 10^6$ 個の独立した

クローンであると推定された。

## 2. 直接発現法によるクローニング

### 1) COS-7 細胞へのトランスフェクション

上記の形質導入した大腸菌約  $5 \times 10^5$  クローンを  $50 \mu\text{g/ml}$  のアンピシリンを含む 2-YT 培地 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) にて培養することにより cDNA の増幅を行い、アルカリ法 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook ら、Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) により大腸菌からプラスミド DNA を回収した。得られたプラスミド DNA は Gene Pulser 装置 (Bio-Rad 製) を用いてエレクトロポレーション法により COS-7 細胞にトランスフェクションした。

すなわち、精製したプラスミド DNA  $10 \mu\text{g}$  を  $1 \times 10^7$  細胞/ml で PBS 中に懸濁した COS-7 細胞液  $0.8 \text{ ml}$  に加え、 $1500 \text{ V}$ ,  $25 \mu\text{FD}$  の容量にてパルスを与えた。室温にて 10 分間の回復期間の後、エレクトロポレーション処理された細胞は、 $10\%$  牛胎児血清 (GIBCO-BRL 製) を含む DMEM 培養液 (GIBCO-BRL 製) にて、 $37^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$  の条件下で 3 日間培養した。

### 2) パンニングデイッシュの調製

マウス抗 HM1.24 抗体をコーティングしたパンニングデイッシュを、B. Seed ら (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 3365-3369 (1987)) の方法に従って調製した。すなわち、マウス抗 HM1.24 抗体を  $10 \mu\text{g/ml}$  になるように  $50 \text{ mM Tris-HCl}$  ( $\text{pH} 9.5$ ) に加えた。このようにして調製した抗体溶液  $3 \text{ ml}$  を直径  $60 \text{ mm}$  の細胞培養皿に加え、室温にて 2 時間インキュベートした。  $0.15 \text{ M NaCl}$  溶液にて 3 回洗浄した後、 $5\%$  牛胎児血清、 $1 \text{ mM EDTA}$ 、 $0.02\% \text{NaN}_3$  を含む PBS を加え、ブロッッキングした後、下記クローニングに用いた。

### 3) cDNAライブラリーのクローニング

前述のようにトランスフェクトした COS-7細胞は、5 mM EDTA を含むPBS にて剥がし、5%牛胎児血清を含むPBS で一回洗浄した後、約  $1 \times 10^6$ 細胞/mlとなるように5%牛胎児血清及び0.02%  $\text{NaN}_3$ を含むPBS に懸濁し、上記のように調製したパンニングディッシュに加え、室温にて約 2時間インキュベートした。5 % 牛胎児血清及び0.02 % $\text{NaN}_3$ を含むPBS で3度緩やかに洗浄した後、0.6%SDS 及び10 mM EDTAを含む溶液を用いてパンニングディッシュに結合した細胞からプラスミド DNAの回収を行った。

回収したプラスミド DNAを再び大腸菌DH5  $\alpha$ に形質導入し、前述のようにプラスミドDNA を増幅後、アルカリ法にて回収した。回収したプラスミド DNAを COS-7細胞にエレクトロポレーション法によりトランスフェクトして前述と同様に結合した細胞よりプラスミド DNA の回収を行った。同様の操作を更に1回繰り返し、回収したプラスミドDNA を制限酵素EcoRI およびNotIで消化した結果、約 0.9 kbpのサイズのインサートの濃縮が確認された。さらに、回収したプラスミドDNA の一部を形質導入した大腸菌を50  $\mu$ g/mlのアンピシリンを含む2-YTアガープレートに接種し、一晚培養後、単一のコロニーよりプラスミドDNA を回収した。制限酵素EcoRI およびNotIにて消化し、インサートのサイズが約 0.9 kbpを示すクローンp3.19を得た。

本クローンについては、PRISM, Dye Terminator Cycle Sequencingキット (PerkinElmer 製) を用いて、キット添付の処方に従い反応を行い、ABI 373A DNA Sequencer (Perkin Elmer製) にて塩基配列の決定を行った。この塩基配列および対応するアミノ酸配列を配列番号1 に示す。

## 産業上の利用可能性

FCM 解析の結果、抗HM1.24抗体はほとんどのヒトリンパ球系腫瘍由来の細胞と強く反応した。このことは、リンパ球系腫瘍の多くで、抗HM1.24抗体が認識するエピトープを有するポリペプチドが強く発現していることを示す。また、抗HM1.24抗体と反応するヒトリンパ球系腫瘍移植マウスにおいて、抗HM1.24抗体の投与により腫瘍体積の増加が抑制され、さらに生存期間の延長が認められた。これらのことから、抗H1.24抗体あるいは抗HM1.24抗体が認識するエピトープを有するポリペプチドを認識する抗体は多くのリンパ球系腫瘍に対し細胞障害活性を示し、その結果リンパ球系腫瘍患者の治療に対し非常に有用であることが示唆される。

特許協力条約第13規則の2の寄託された微生物への言及及び寄託機関

寄託機関 名称：工業技術院生命工学工業技術研究所

あて名：日本国茨城県つくば市東1丁目1-3

微生物(1) 名称：Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pRS38-pUC19)

寄託番号：FERM BP-4434

寄託日：1993年10月5日

(2) 名称：ハイブリドーマ HM1.24

寄託番号：FERM BP-5233

寄託日：1995年9月14日

(3) 名称：Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-RVHr-AHM-g $\gamma$ 1)

寄託番号：FERM BP-5643

寄託日：1996年8月29日

(4) 名称：Escherichia coli DH5 $\alpha$  (pUC19-1.24H-g $\gamma$ 1)

寄託番号 : FERM BP-5644

寄託日 : 1996年 8 月 29日

- (5) 名 称 : Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-RVLa-AHN-g  $\kappa$ )

寄託番号 : FERM BP-5645

寄託日 : 1996年 8 月 29日

- (6) 名 称 : Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-1.24L-g  $\kappa$ )

寄託番号 : FERM BP-5646

寄託日 : 1996年 8 月 29日

- (7) 名 称 : Escherichia coli DH5  $\alpha$  (pUC19-RVHs-AHM-g  $\gamma$  1)

寄託番号 : FERM BP-6127

寄託日 : 1997年 9 月 29日

## 配列表

配列番号：1

配列の長さ：1013

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直線状

配列の種類：cDNA

GAATTCGGCA CGAGGGATCT GG ATG GCA TCT ACT TCG TAT GAC TAT TGC	49
Met Ala Ser Thr Ser Tyr Asp Tyr Cys	
1 5	
AGA GTG CCC ATG GAA GAC GGG GAT AAG CGC TGT AAG CTT CTG CTG GGG	97
Arg Val Pro Met Glu Asp Gly Asp Lys Arg Cys Lys Leu Leu Leu Gly	
10 15 20 25	
ATA GGA ATT CTG GTG CTC CTG ATC ATC GTG ATT CTG GGG GTG CCC TTG	145
Ile Gly Ile Leu Val Leu Leu Ile Ile Val Ile Leu Gly Val Pro Leu	
30 35 40	
ATT ATC TTC ACC ATC AAG GCC AAC AGC GAG GCC TGC CGG GAC GGC CTT	193
Ile Ile Phe Thr Ile Lys Ala Asn Ser Glu Ala Cys Arg Asp Gly Leu	
45 50 55	
CGG GCA GTG ATG GAG TGT CGC AAT GTC ACC CAT CTC CTG CAA CAA GAG	241
Arg Ala Val Met Glu Cys Arg Asn Val Thr His Leu Leu Gln Gln Glu	
60 65 70	
CTG ACC GAG GCC CAG AAG GGC TTT CAG GAT GTG GAG GCC CAG GCC GCC	289
Leu Thr Glu Ala Gln Lys Gly Phe Gln Asp Val Glu Ala Gln Ala Ala	
75 80 85	

ACC TGC AAC CAC ACT GTG ATG GCC CTA ATG GCT TCC CTG GAT GCA GAG 337  
 Thr Cys Asn His Thr Val Met Ala Leu Met Ala Ser Leu Asp Ala Glu  
 90 95 100 105  
 AAG GCC CAA GGA CAA AAG AAA GTG GAG GAG CTT GAG GGA GAG ATC ACT 385  
 Lys Ala Gln Gly Gln Lys Lys Val Glu Glu Leu Glu Gly Glu Ile Thr  
 110 115 120  
 ACA TTA AAC CAT AAG CTT CAG GAC GCG TCT GCA GAG GTG GAG CGA CTG 433  
 Thr Leu Asn His Lys Leu Gln Asp Ala Ser Ala Glu Val Glu Arg Leu  
 125 130 135  
 AGA AGA GAA AAC CAG GTC TTA AGC GTG AGA ATC GCG GAC AAG AAG TAC 481  
 Arg Arg Glu Asn Gln Val Leu Ser Val Arg Ile Ala Asp Lys Lys Tyr  
 140 145 150  
 TAC CCC AGC TCC CAG GAC TCC AGC TCC GCT GCG GCG CCC CAG CTG CTG 529  
 Tyr Pro Ser Ser Gln Asp Ser Ser Ser Ala Ala Ala Pro Gln Leu Leu  
 155 160 165  
 ATT GTG CTG CTG GGC CTC AGC GCT CTG CTG CAG TGA GATCCCAGGA 575  
 Ile Val Leu Leu Gly Leu Ser Ala Leu Leu Gln \*\*\*  
 170 175 180  
 AGCTGGCACA TCTTGAAGG TCCGTCCTGC TCGGCTTTTC GCTTGAACAT TCCCTTGATC 635  
 TCATCAGTTC TGAGCGGGTC ATGGGGCAAC ACGGTTAGCG GGGAGAGCAC GGGGTAGCCG 695  
 GAGAAGGGCC TCTGGAGCAG GTCTGGAGGG GCCATGGGGC AGTCCTGGGT GTGGGGACAC 755  
 AGTCGGGTTG ACCCAGGGCT GTCTCCCTCC AGAGCCTCCC TCCGGACAAT GAGTCCCCCC 815  
 TCTTGTCTCC CACCCTGAGA TTGGGCATGG GGTGCGGTGT GGGGGGCATG TGCTGCCTGT 875  
 TGTTATGGGT TTTTTTTGCG GGGGGGTTG CTTTTTCTG GGGTCTTTGA GCTCCAAAAA 935  
 AATAAACACT TCCTTTGAGG GAGAGCACAC CTAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAAA 995  
 AAAATTCGGG CGGCCGCC 1013

配列番号 : 2





ACT CCA TTC ACG TTC GGC CAA GGG ACC AAG GTG GAA ATC AAA C 379  
 Thr Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 95 100 105

配列番号 : 3

配列の長さ : 4 1 8

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
 -15 -10 -5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT 240  
 Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser  
 50 55 60

CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATG ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC 288  
 Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
 65 70 75

ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG 336  
 Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
 80 85 90

TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC 384  
 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr  
 95 100 105

TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G 418  
 Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 110 115 120

配列番号 : 4

配列の長さ : 4 1 8

配列の型 : 核酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : c D N A

配列

ATG GAC TGG ACC TGG AGG GTC TTC TTC TTG CTG GCT GTA GCT CCA GGT 48  
 Met Asp Trp Thr Trp Arg Val Phe Phe Leu Leu Ala Val Ala Pro Gly  
 -15 -10 -5

GCT CAC TCC CAG GTG CAG CTG GTG CAG TCT GGG GCT GAG GTG AAG AAG 96  
 Ala His Ser Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 -1 1 5 10

CCT GGG GCC TCA GTG AAG GTT TCC TGC AAG GCA TCT GGA TAC ACC TTC 144  
 Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe  
 15 20 25

ACT CCC TAC TGG ATG CAG TGG GTG CGA CAG GCC CCT GGA CAA GGG CTT 192  
 Thr Pro Tyr Trp Met Gln Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu  
 30 35 40 45

GAG TGG ATG GGA TCT ATT TTT CCT GGA GAT GGT GAT ACT AGG TAC AGT	240
Glu Trp Met Gly Ser Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Ser	
50 55 60	
CAG AAG TTC AAG GGC AGA GTC ACC ATC ACC GCA GAC AAG TCC ACG AGC	288
Gln Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser	
65 70 75	
ACA GCC TAC ATG GAG CTG AGC AGC CTG AGA TCT GAG GAC ACG GCC GTG	336
Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val	
80 85 90	
TAT TAC TGT GCG AGA GGA TTA CGA CGA GGG GGG TAC TAC TTT GAC TAC	384
Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Leu Arg Arg Gly Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr	
95 100 105	
TGG GGG CAA GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA G	418
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser	
110 115 120	

## 請 求 の 範 囲

1. 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性を有する抗体を有効成分として含有する、リンパ球系腫瘍（骨髄腫を除く）治療剤。
2. リンパ球系腫瘍が T 細胞腫瘍である、請求項 1 に記載の治療剤。
3. リンパ球系腫瘍が B 細胞腫瘍（骨髄腫を除く）である、請求項 1 に記載の治療剤。
4. 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 に記載の治療剤。
5. 細胞障害活性が A D C C 活性である、請求項 1 に記載の治療剤。
6. 細胞障害活性が C D C 活性である、請求項 1 に記載の治療剤。
7. 抗体がヒト抗体定常領域 C  $\gamma$  を有する、請求項 4 に記載の治療剤。
8. ヒト抗体定常領域 C  $\gamma$  が C  $\gamma$  1 または C  $\gamma$  3 である、請求項 7 に記載の治療剤。
9. 抗体が抗 HM1.24 抗体である、請求項 4 に記載の治療剤。
10. 抗体がキメラ抗体またはヒト型化抗体である、請求項 4 に記載の治療剤。
11. 抗体がキメラ抗 HM1.24 抗体である、請求項 9 に記載の治療剤。
12. 抗体がヒト型化抗 HM1.24 抗体である、請求項 9 に記載の治療剤。
13. 抗体が抗 HM1.24 抗体が認識するエピトープと特異的に結合

する、請求項 1 に記載の治療剤。

1 4 . 配列番号 1 に示されるアミノ酸配列を有する蛋白質に特異的に結合し、かつ細胞障害活性を有する抗体。

1 5 . 細胞障害活性が A D C C 活性である、請求項 1 3 に記載の抗体。

1 6 . 細胞障害活性が C D C 活性である、請求項 1 3 に記載の抗体。

Fig.1

**B-1**

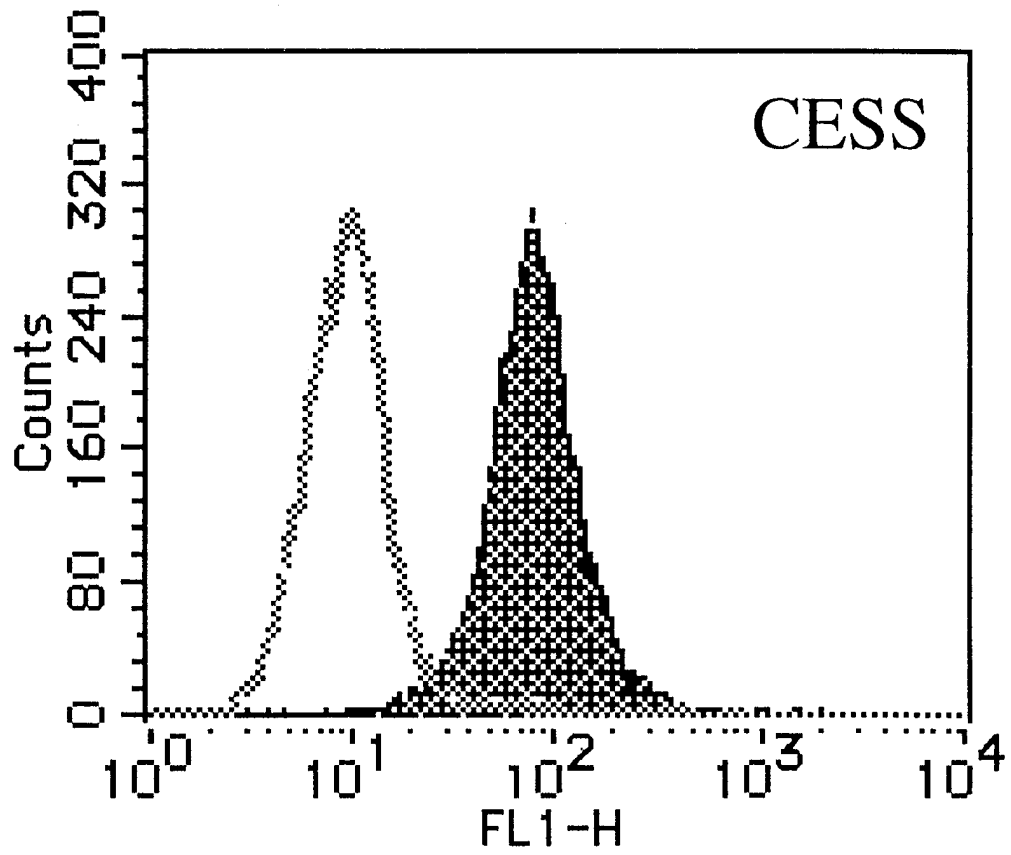


Fig.2

B-2

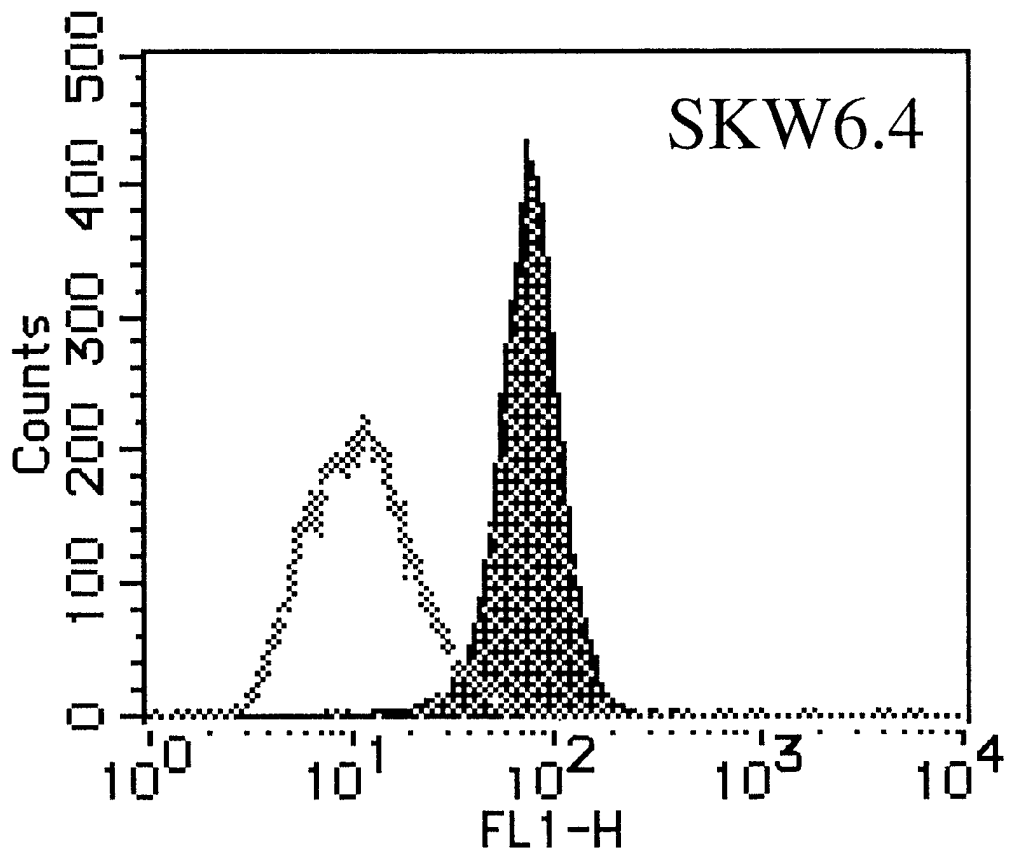


Fig.3

**B-3**

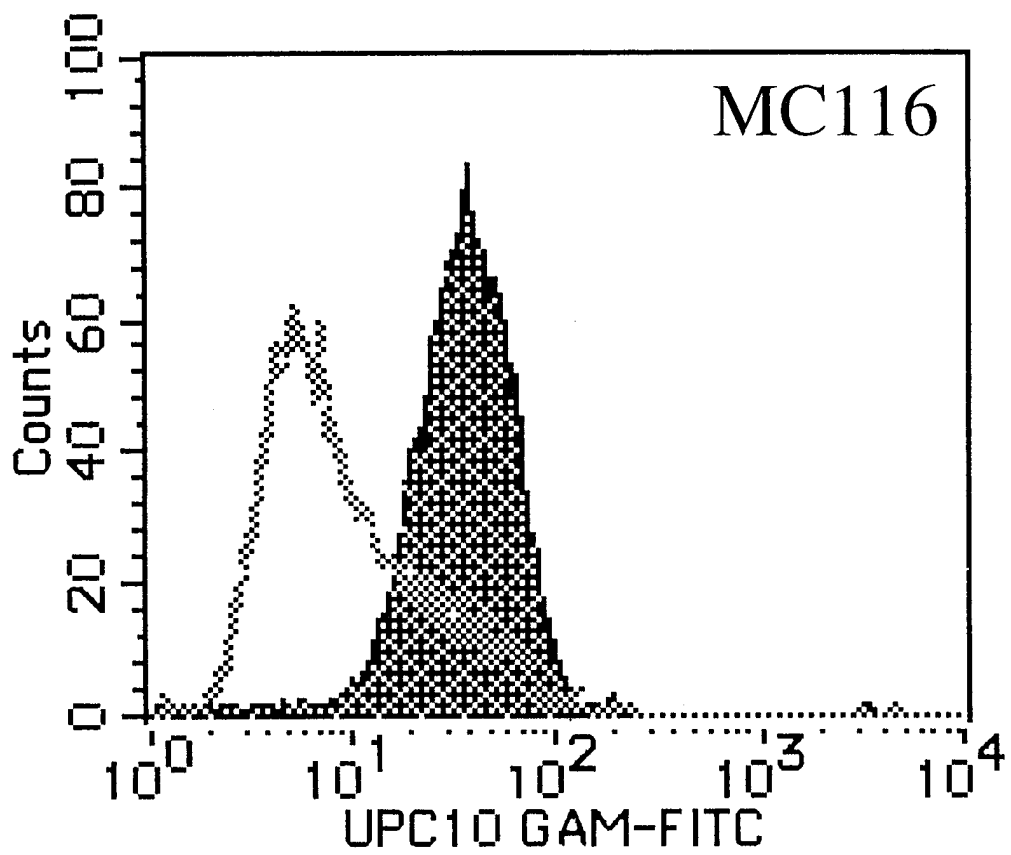




Fig.4

**B-4**

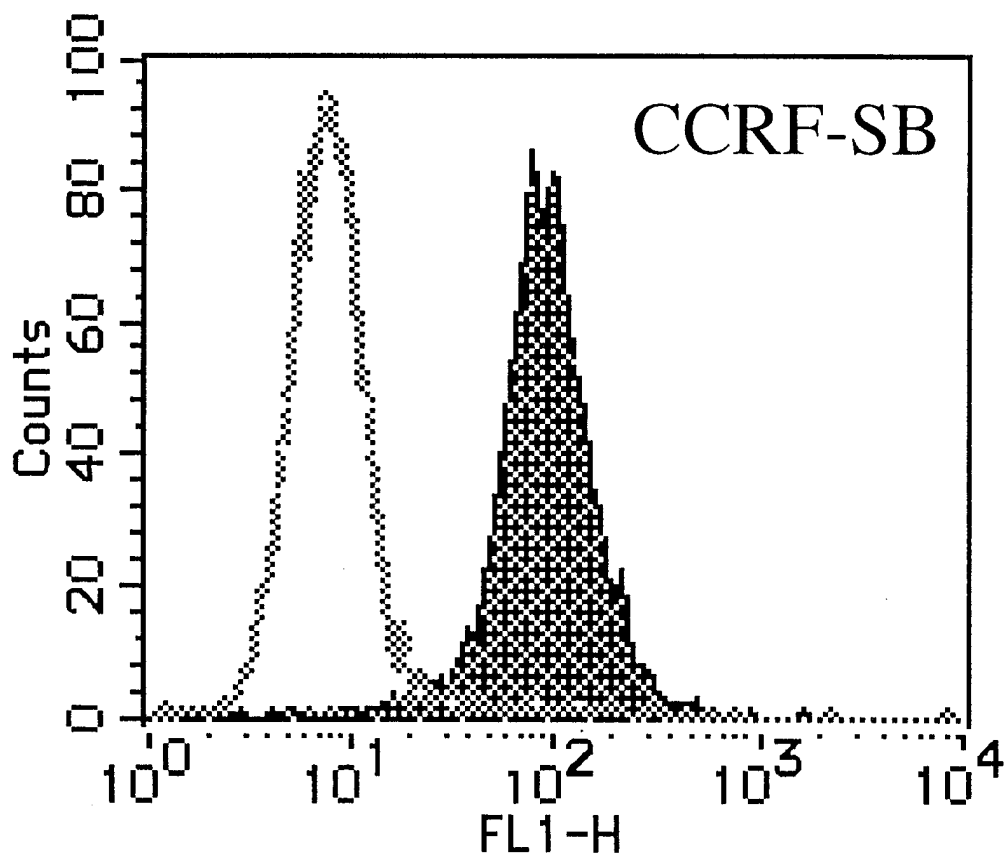


Fig.5

**B-5**

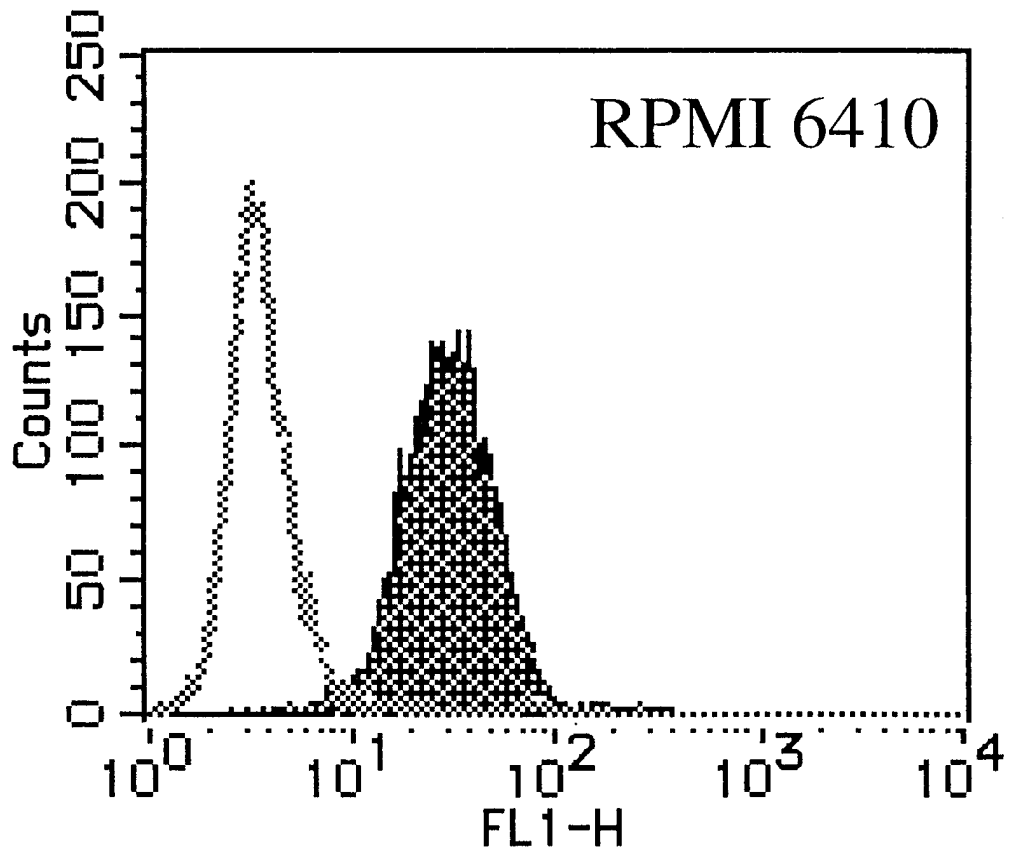


Fig.6

**B-6**

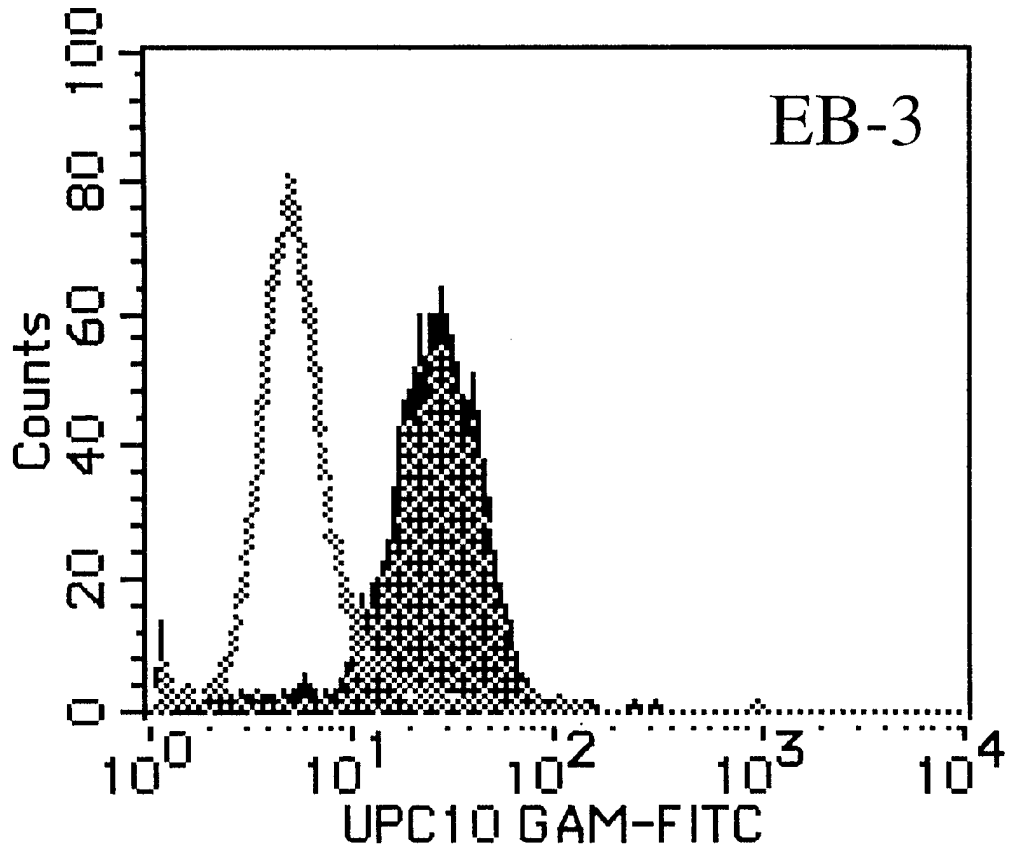


Fig.7

B-7

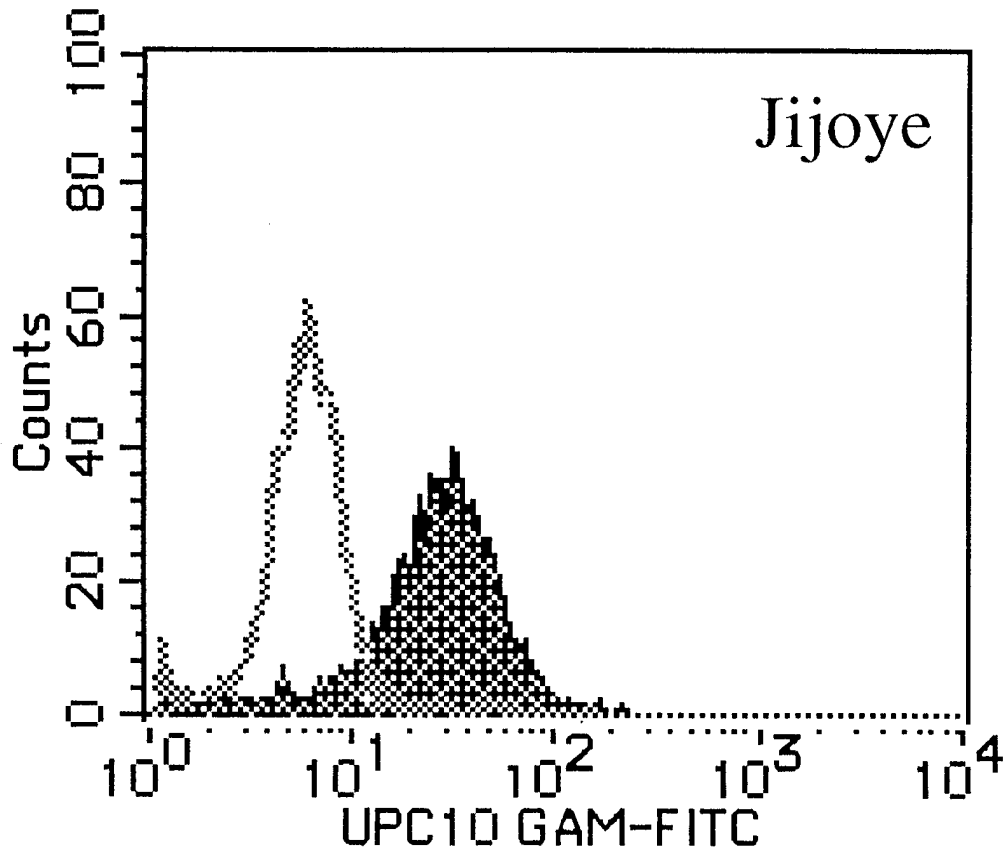


Fig.8

**B-8**

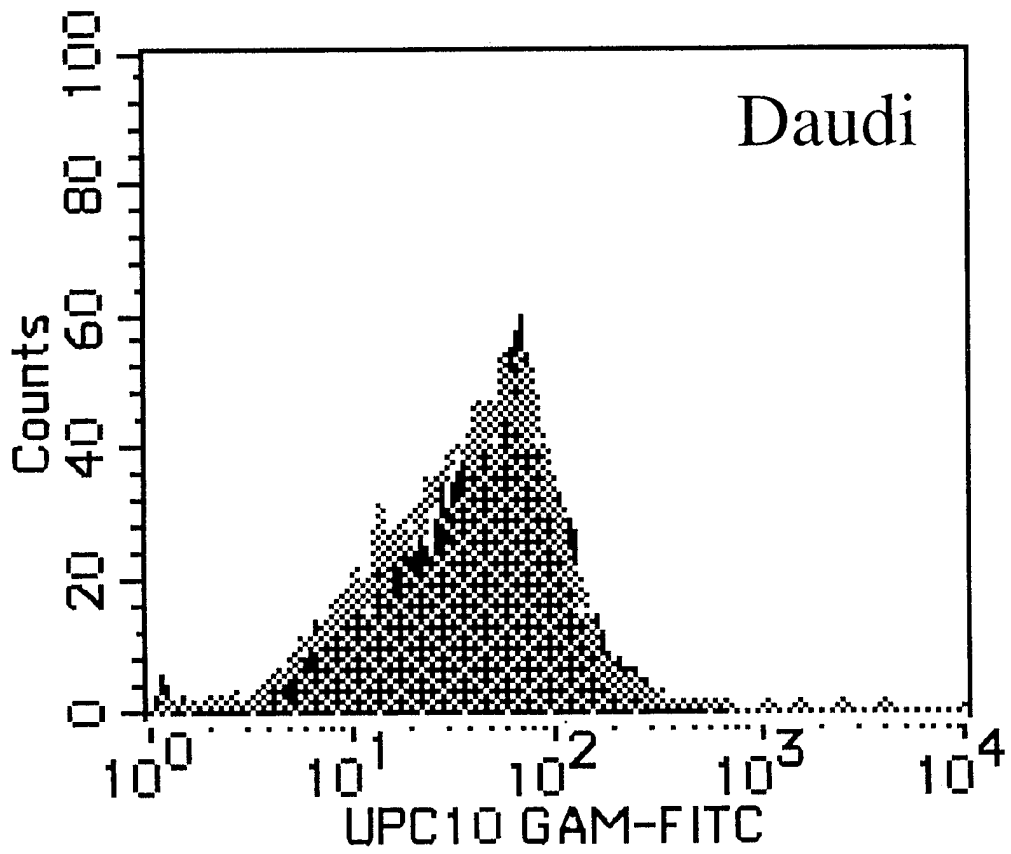


Fig.9

B-9

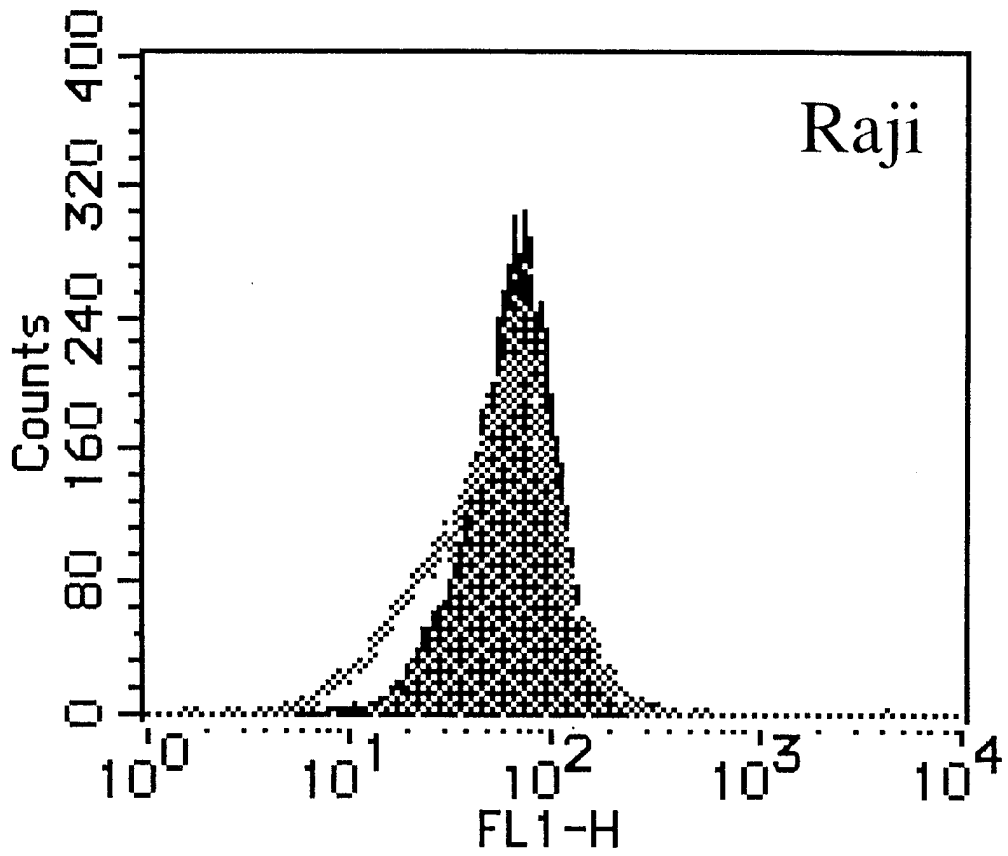


Fig.10

T-1

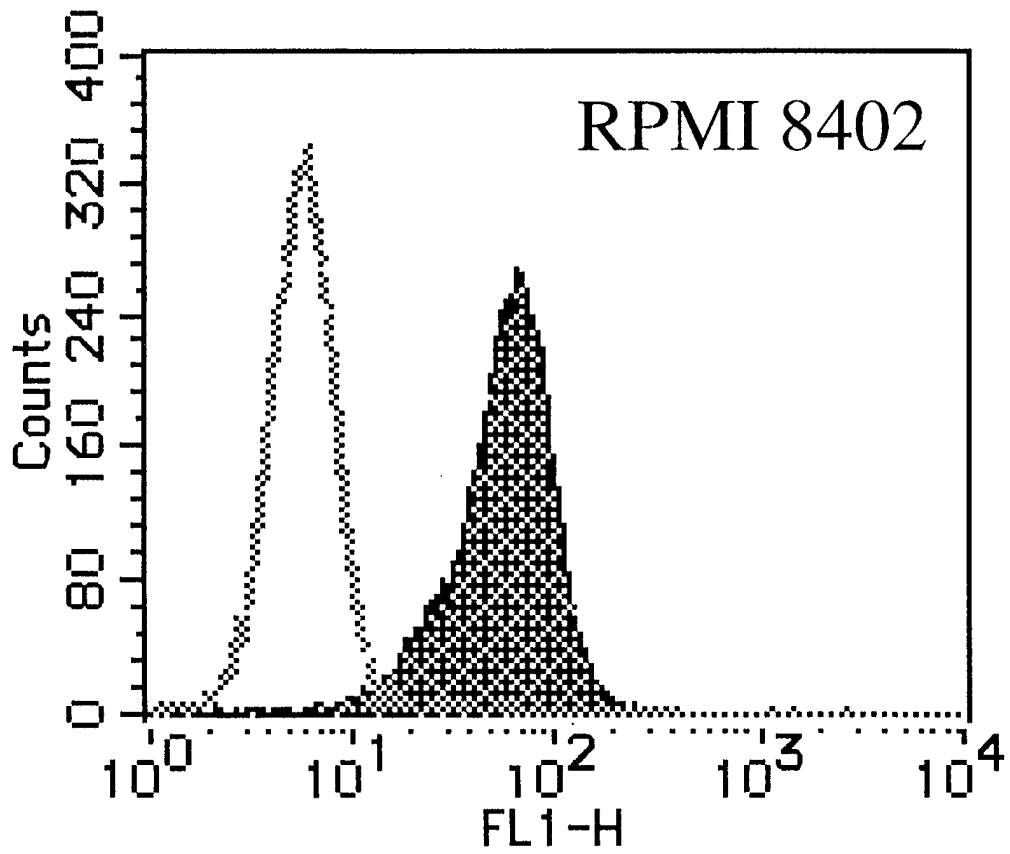


Fig.11

T-2

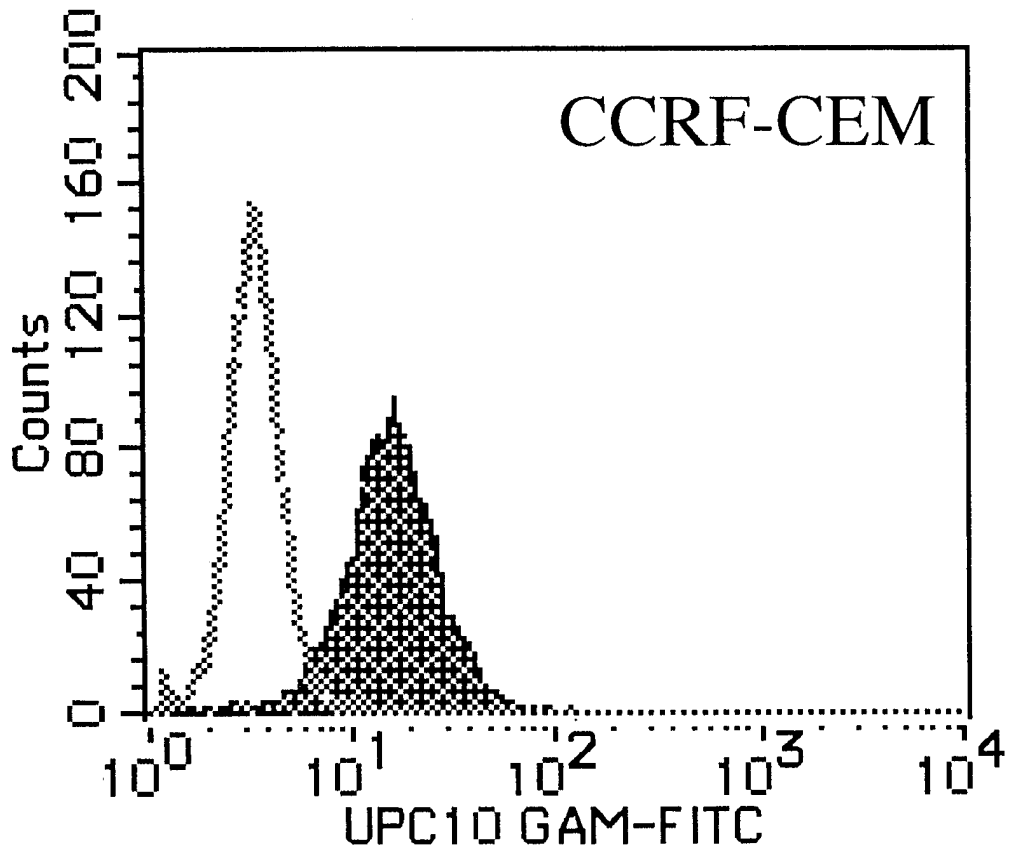




Fig.12

T-3

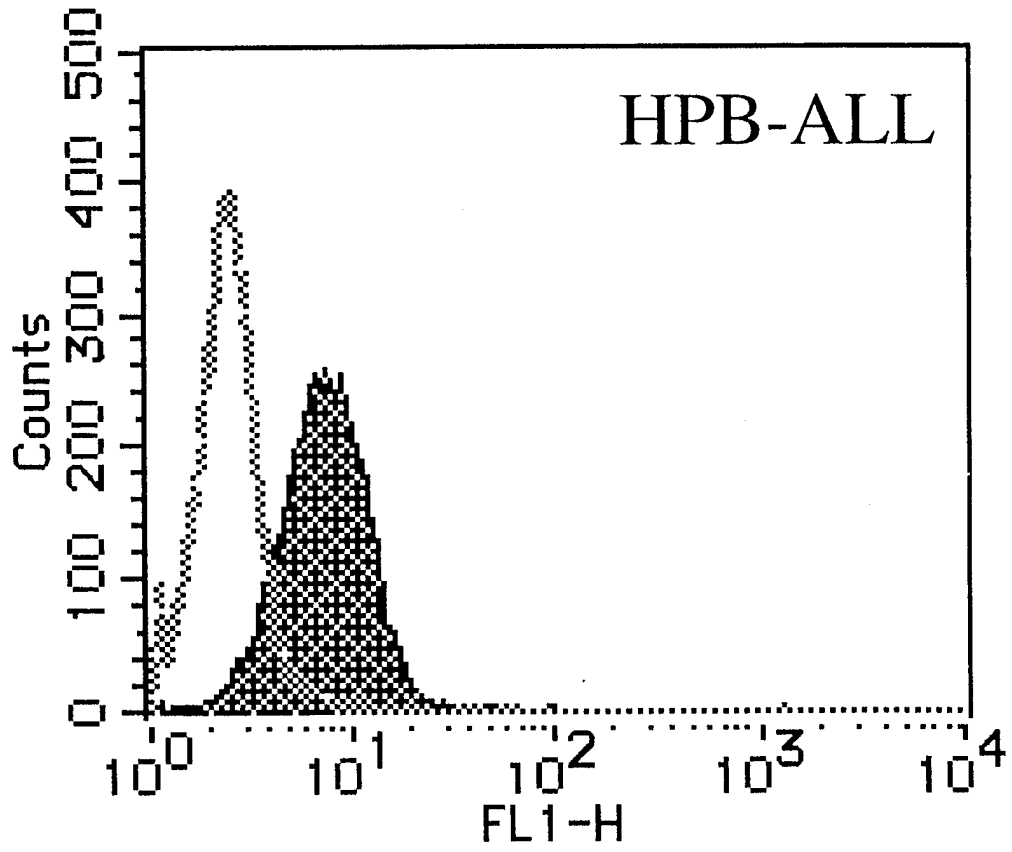


Fig.13

T-4

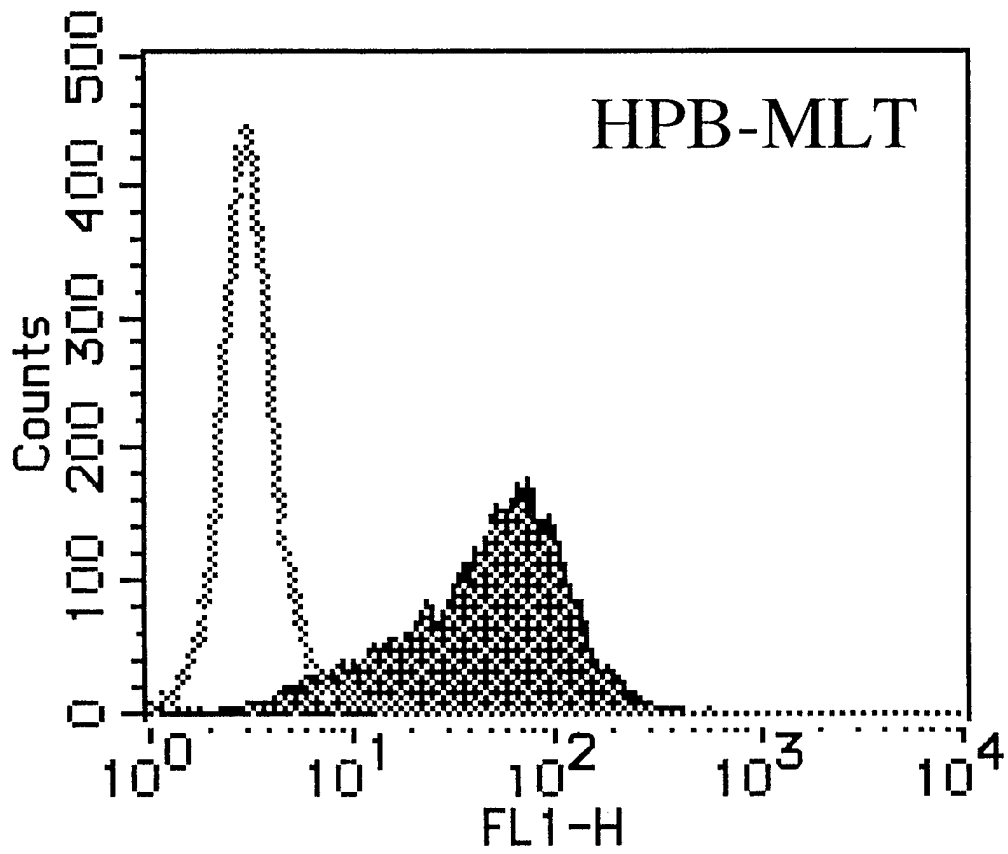


Fig.14

T-5

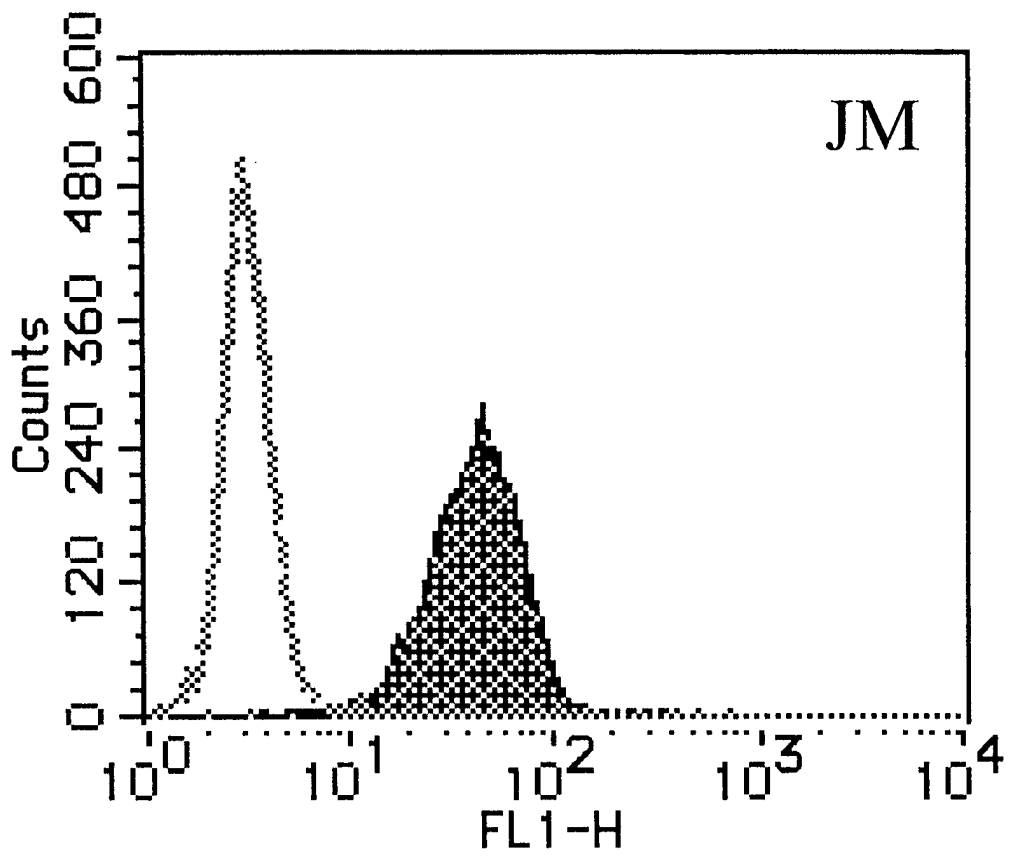


Fig.15

T-6

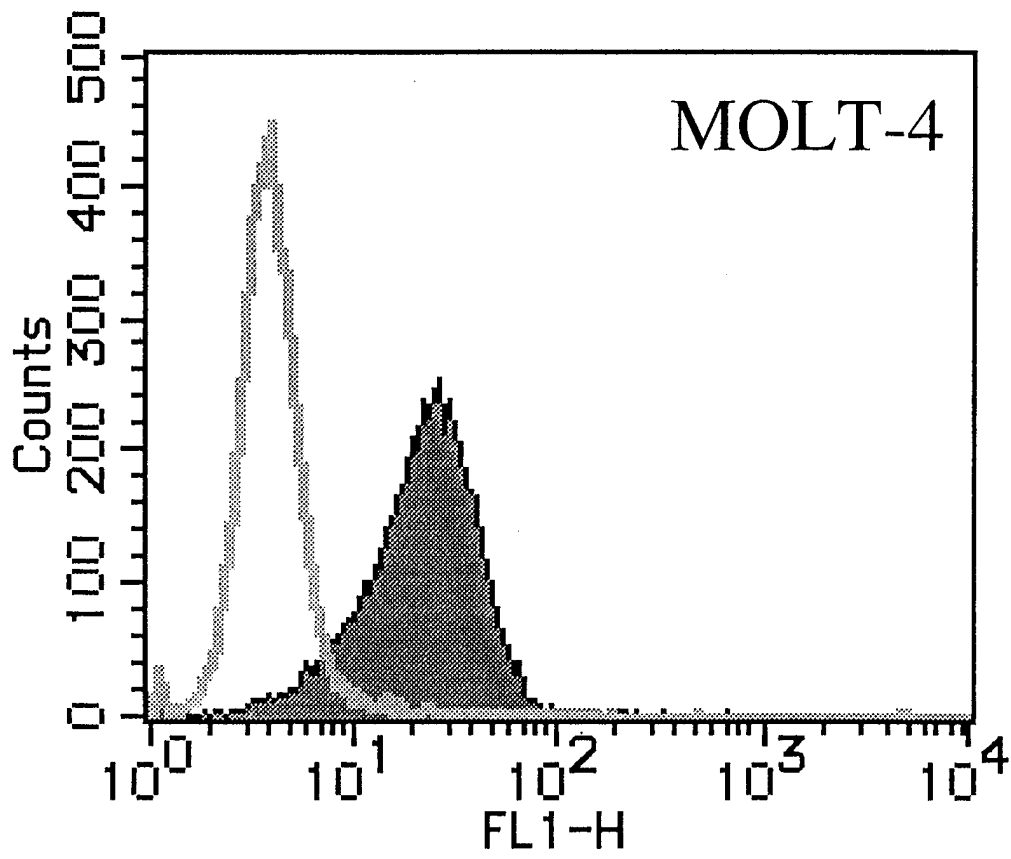


Fig.16

T-7

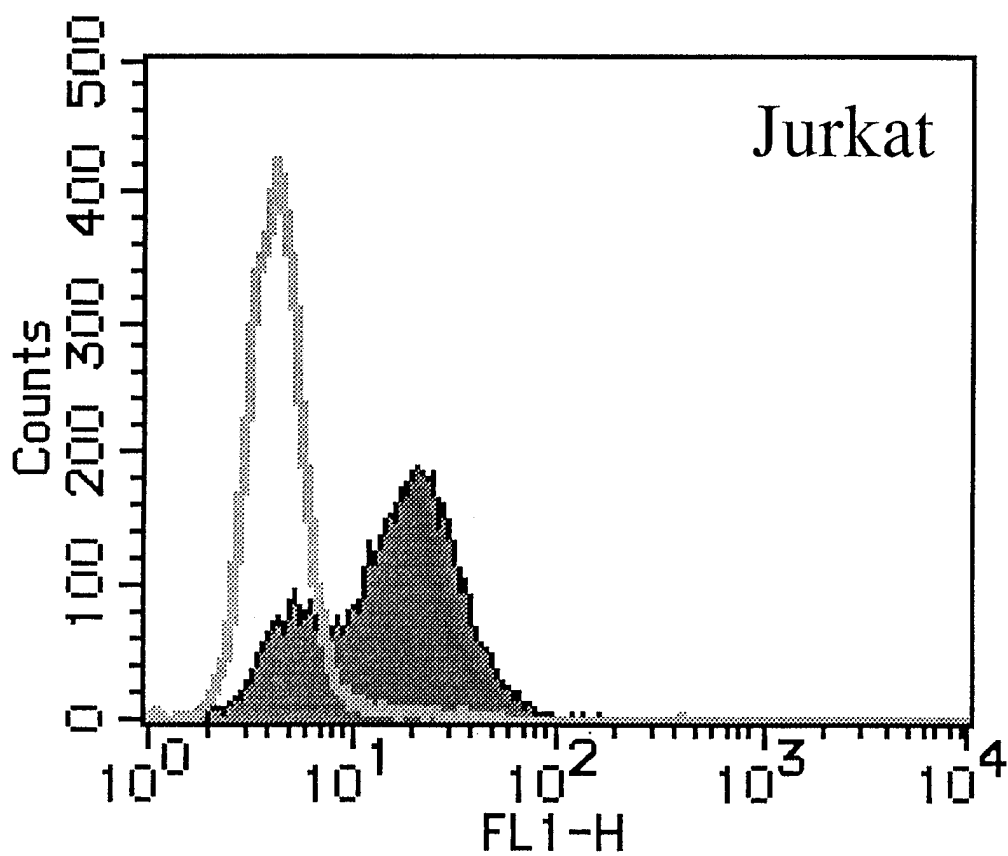


Fig.17

T-8

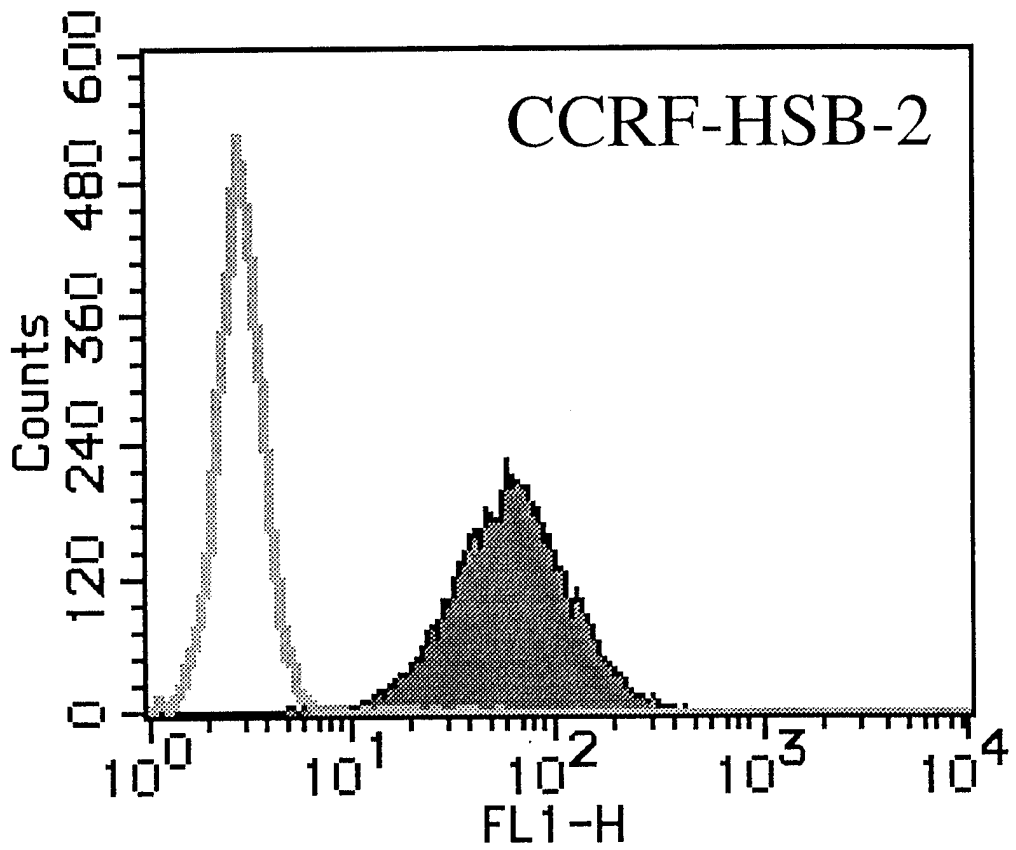


Fig.18

T-9

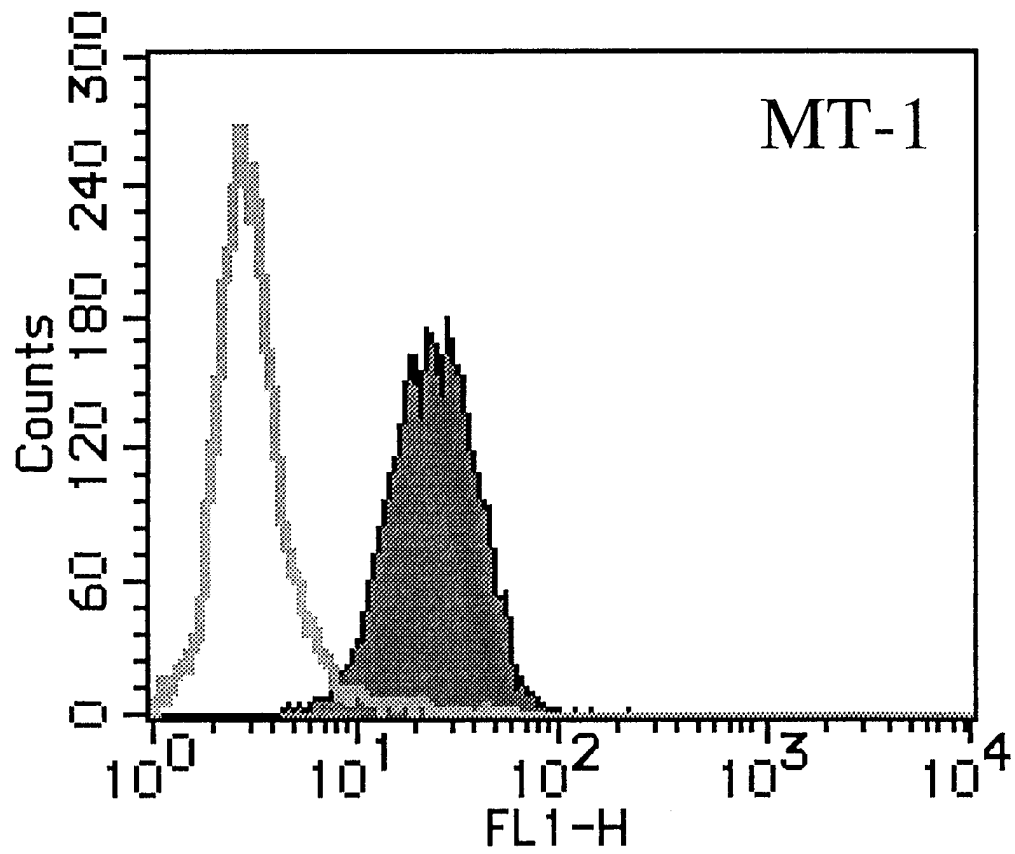


Fig.19

T-10

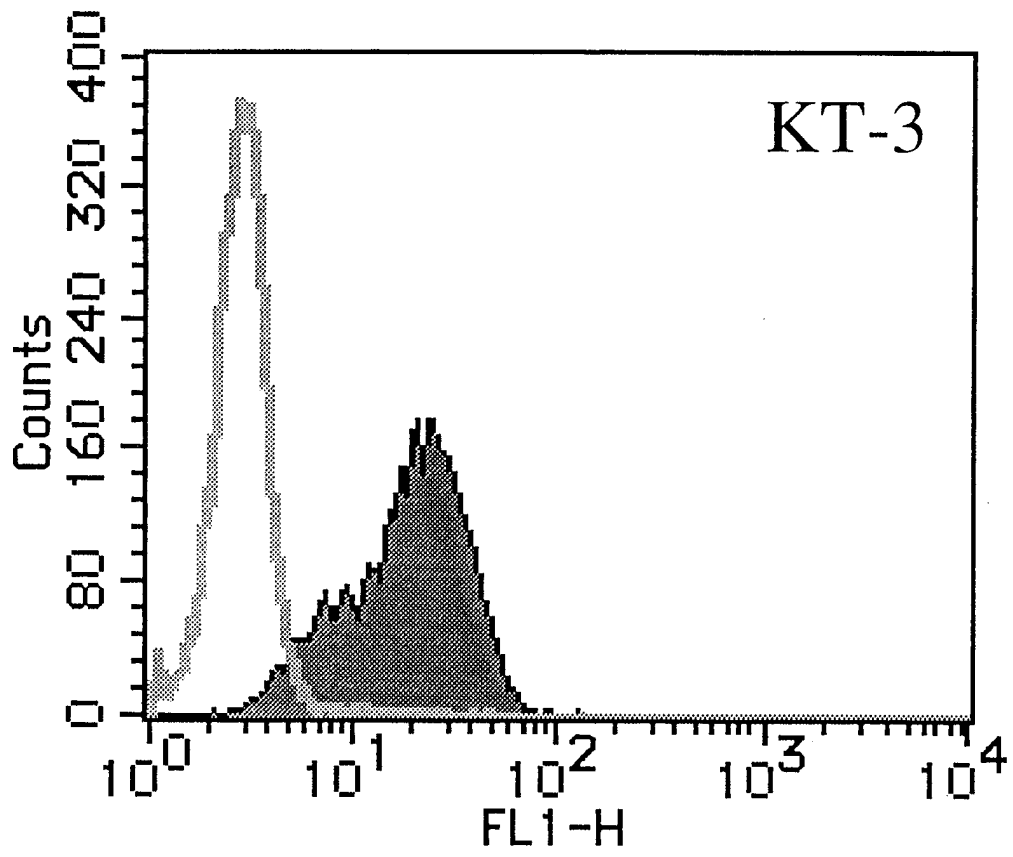




Fig.20

N-1

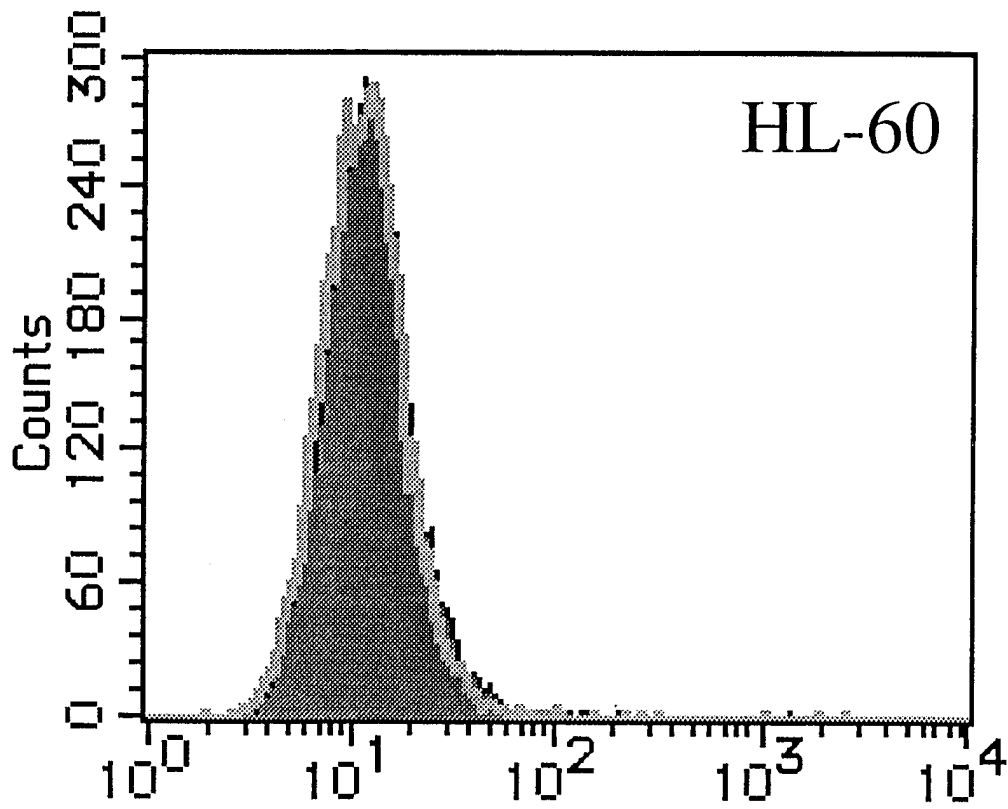


Fig.21

N-2

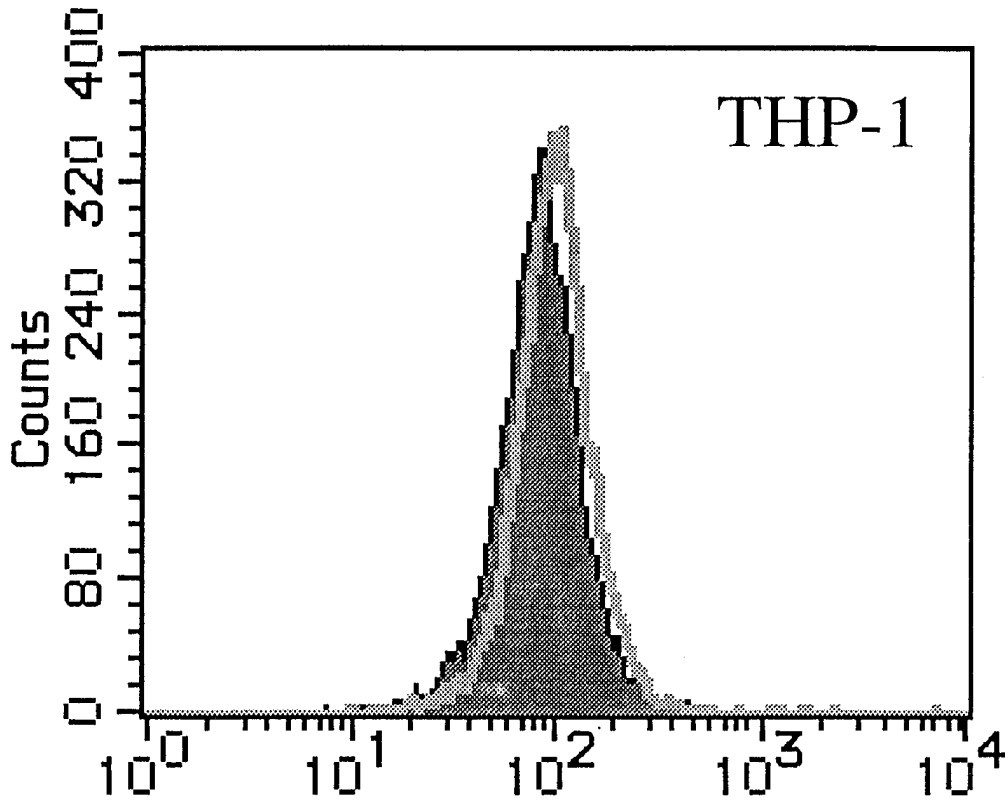


Fig.22

**N-3**

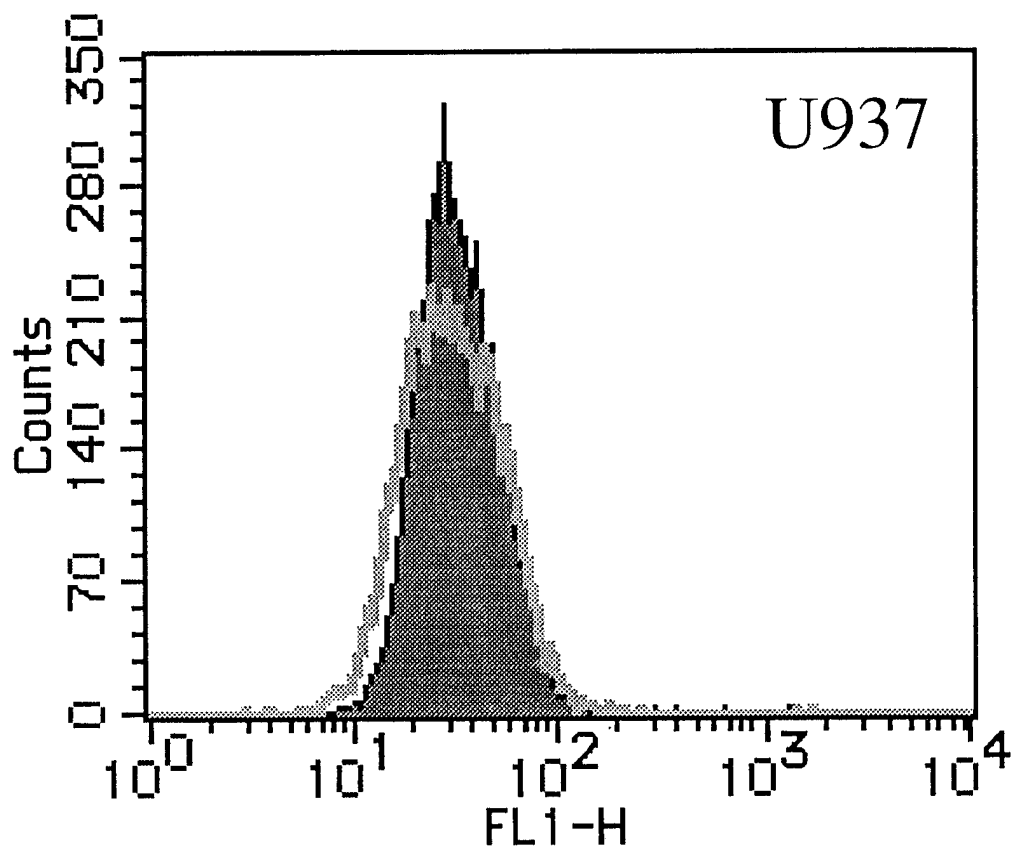


Fig.23

N-4

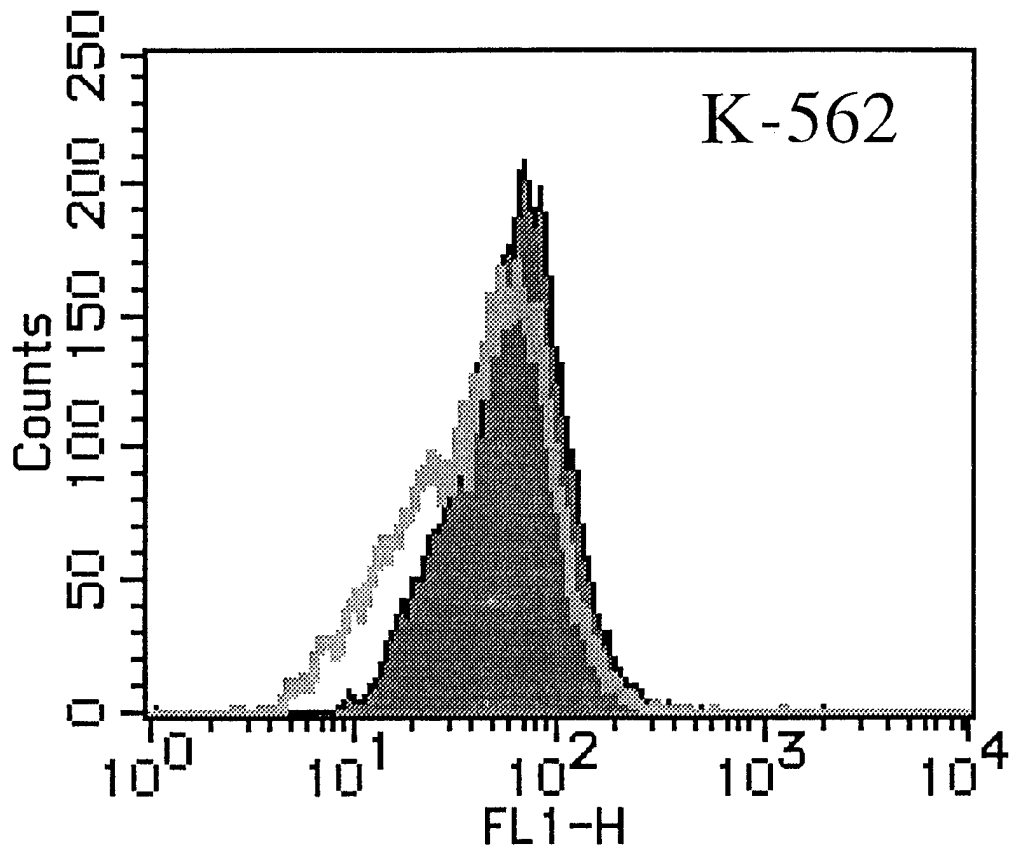


Fig. 24

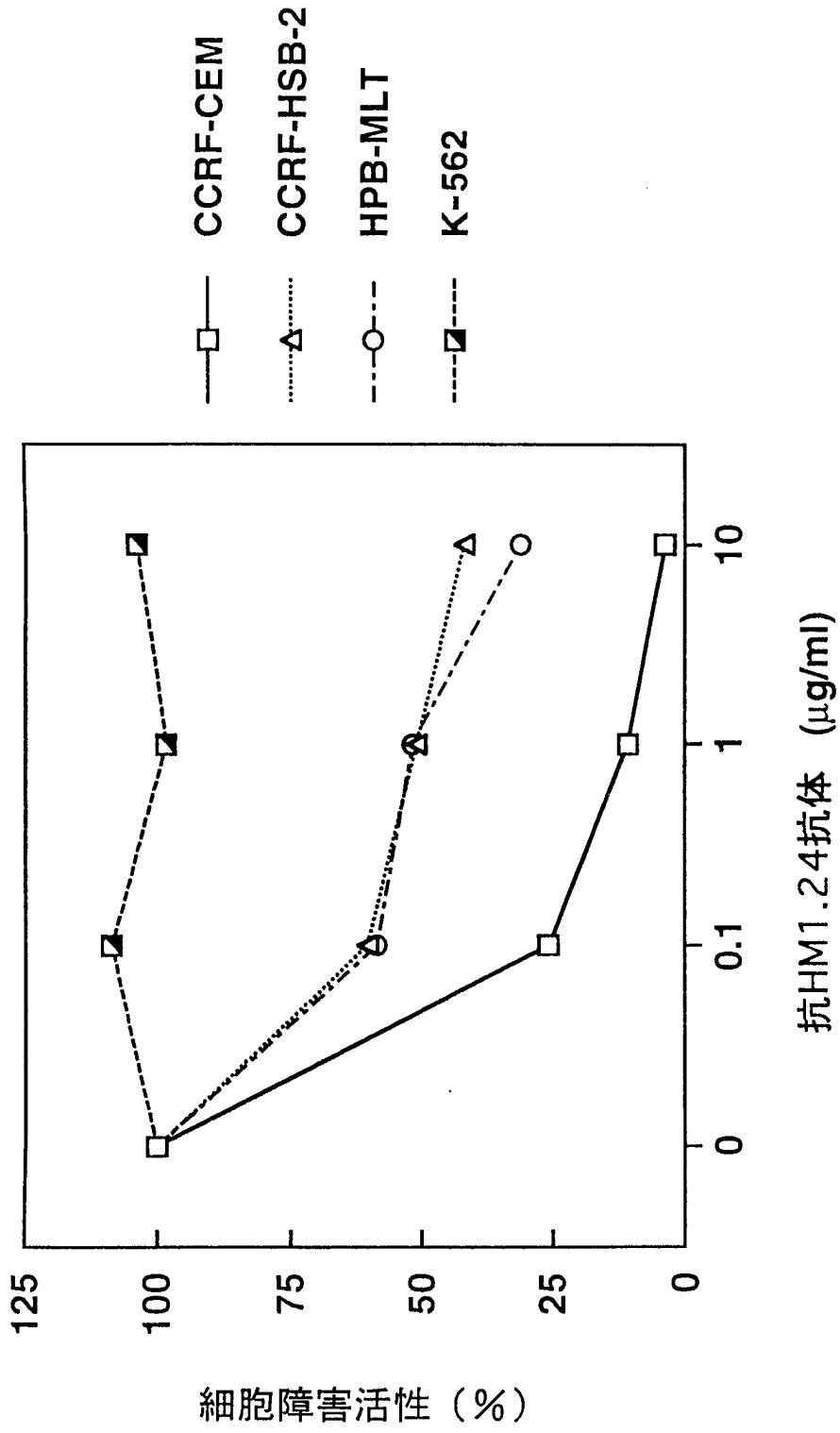


Fig. 25

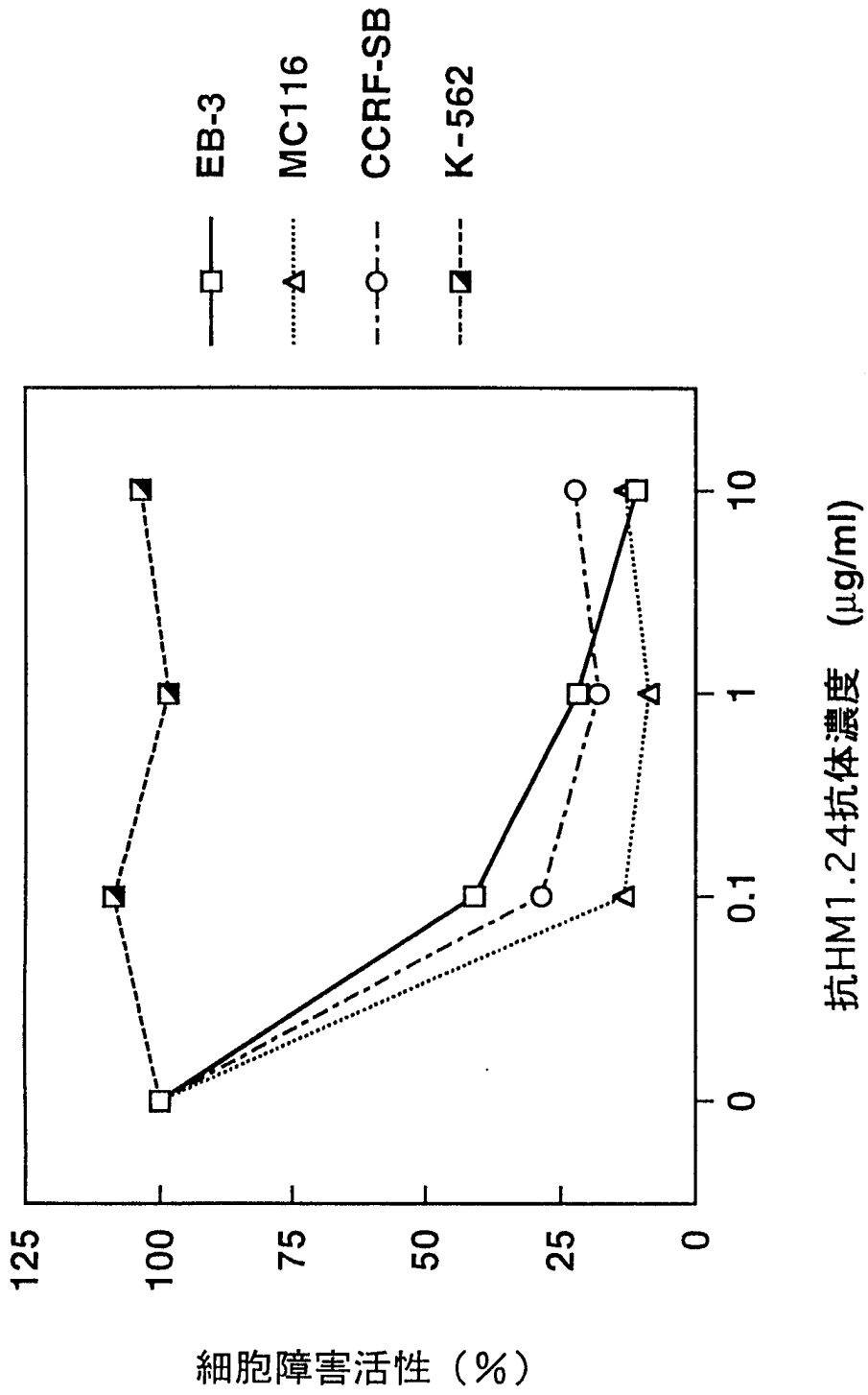


Fig.26

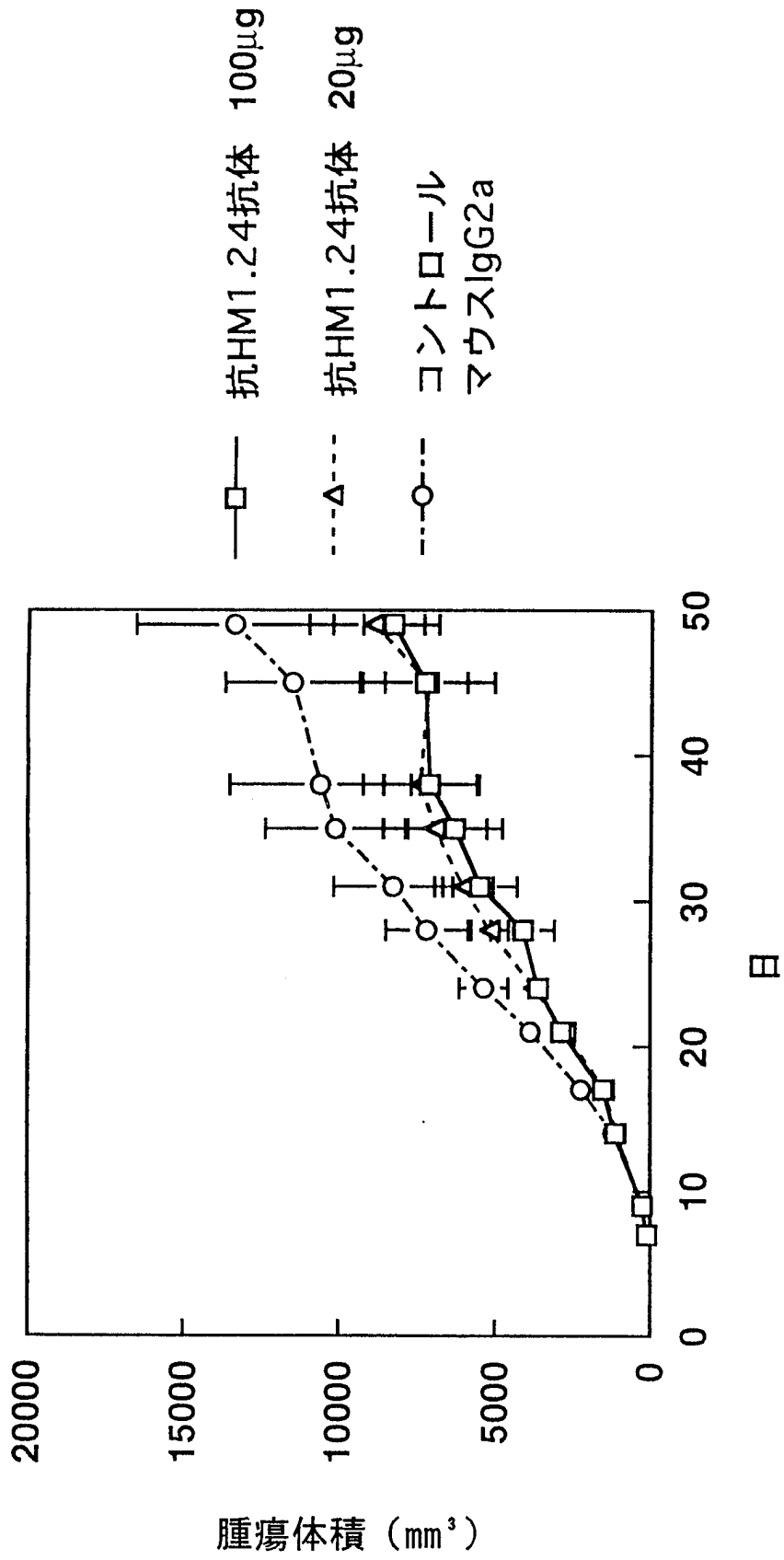
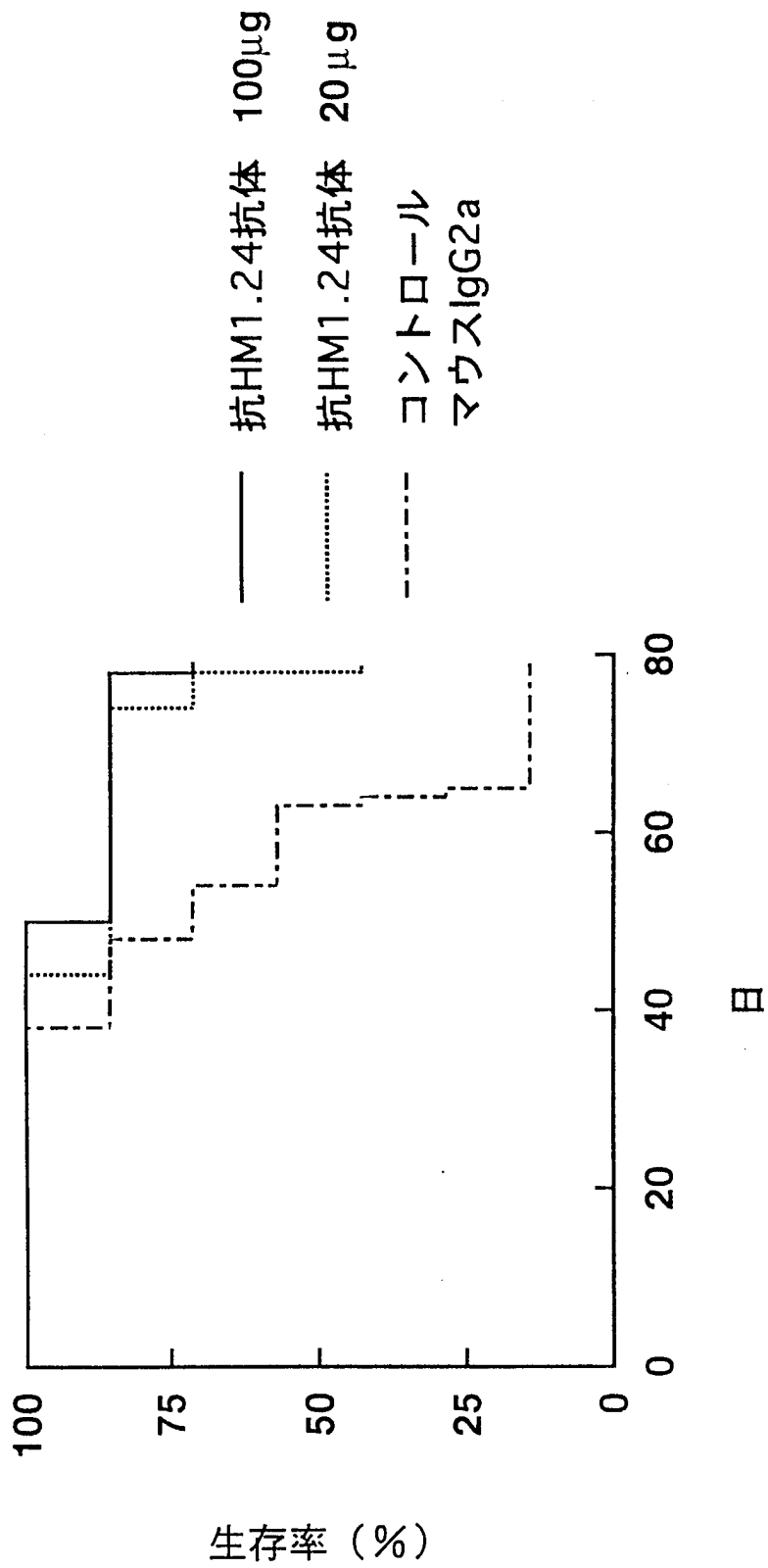


Fig. 27





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/00568

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>6</sup> A61K39/395, C07K16/30, C07K16/46 // C12N15/13, C12P21/08,  
(C12P21/08, C12R1:91)

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

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>6</sup> A61K39/395, C07K16/30, C07K16/46, C12N15/13, C12P21/08

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

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

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), GenBank/EMBL/DBJ (GENETYX)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/X	Blood, Vol. 84, No. 6, (1994), T. Goto, et al., "A Novel Membrane Selectively Expressed on Terminally Differentiated Human B Cells.", see p.1922-1930	1-13/14-16
Y	Tokushima Journal of Experimental Medicine, Vol. 43, (1996), Ozaki K. et al., "Localization and imaging of human plasmacytoma xenografts in severe combined immunodeficiency mice by a new murine monoclonal antibody, nti-hml. 24", see p.7-15	1-13
PA	Blood, Vol. 90, No. 8, (1997), Osaki S. et al., "Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, HM1.24", see p.3179-3186	1-16

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

\* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
May 11, 1998 (11. 05. 98)Date of mailing of the international search report  
May 19, 1998 (19. 05. 98)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> A61K 39/395, C07K 16/30, C07K 16/46 // C12N 15/13, C12P 21/08, (C12P 21/08, C12R 1:91)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl<sup>6</sup> A61K 39/395, C07K 16/30, C07K 16/46, C12N 15/13, C12P 21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(DIALOG)、WPI(DIALOG)、GenBank/EMBL/DDBJ(GENETYX)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y/ X	Blood, Vol.84, No.6, (1994), T.Goto, et al., "A Novel Membrane Selectively Expressed on Terminally Differentiated Human B Cells.", see p.1922-1930	1-13 / 14-16
Y	Tokushima Journal of Experimental Medicine, Vol.43, (1996), Ozaki K. et al., "Localization and imaging of human plasmacytoma xenografts in severe combined immunodeficiency mice by a new murine monoclonal antibody, nti-hml.24", see p.7-15	1-13
PA	Blood, Vol.90, No.8, (1997), Osaki S, et al., "Immunotherapy of multiple myeloma with a monoclonal antibody directed against a plasma cell-specific antigen, Hml.24", see p.3179-3186	1-16

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
- 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

11.05.98

国際調査報告の発送日

1905.98

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)  
郵便番号100-8915  
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)  
齊藤真由美 印

4B 8931

電話番号 03-3581-1101 内線 3448